

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5570974号
(P5570974)

(45) 発行日 平成26年8月13日(2014.8.13)

(24) 登録日 平成26年7月4日(2014.7.4)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/02	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A C
C 07 K 16/00	(2006.01)	C 07 K 16/00	
A 01 K 67/027	(2006.01)	A 01 K 67/027	
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P 21/08	

請求項の数 17 (全 84 頁)

(21) 出願番号 特願2010-509681 (P2010-509681)
 (86) (22) 出願日 平成20年5月30日 (2008.5.30)
 (65) 公表番号 特表2010-527622 (P2010-527622A)
 (43) 公表日 平成22年8月19日 (2010.8.19)
 (86) 國際出願番号 PCT/DK2008/050127
 (87) 國際公開番号 WO2008/145140
 (87) 國際公開日 平成20年12月4日 (2008.12.4)
 審査請求日 平成23年5月25日 (2011.5.25)
 (31) 優先権主張番号 PA200700795
 (32) 優先日 平成19年5月31日 (2007.5.31)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(73) 特許権者 507316398
 ゲンマブ エー／エス
 デンマーク コペンハーゲン ケー ブレ
 ドグード 34イー
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】一価ヒト抗体を産生するトランスジェニック動物およびこれらの動物から得ることのできる抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、選択された抗原に結合する一価IgG4抗体：

- 以下を含む重鎖

(i) ヒト V_H 領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一の C_H 領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、かつ C_H 3領域が SEQ ID NO: 16に示される配列において一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われた配列を有する、ヒト C_H 領域：234位のThr (T) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；277位のArg (R) がAla (A) により置換されている、

ならびに

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒト V_L 領域、および(ii) ヒト C_L 領域。

【請求項 2】

以下を含む、選択された抗原に結合する一価IgG4抗体：

- 以下を含む重鎖

10

20

(i) ヒト V_H 領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一の C_H 領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、かつ C_H 3 領域が SEQ ID NO: 16 に示される配列における 225 位の Glu (E) が Ala (A) により置換されている配列を有する、ヒト C_H 領域、

ならびに

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒト V_L 領域、および

(ii) ヒト C_L 領域。

【請求項 3】

234 位の Thr (T) が Ala (A) によりさらに置換されている、請求項 2 記載の一価 IgG4 抗体。
。

【請求項 4】

236 位の Leu (L) が Ala (A) 、 Val (V) 、 Glu (E) 、または Gly (G) によりさらに置換されている、請求項 2 または 3 記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 5】

238 位の Lys (K) が Ala (A) によりさらに置換されている、請求項 2 から 4 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 6】

267 位の Asp (D) が Ala (A) によりさらに置換されている、請求項 2 から 5 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 7】

273 位の Phe (F) が Ala (A) または Leu (L) によりさらに置換されている、請求項 2 から 6 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 8】

273 位の Phe (F) が Asp (D) によりさらに置換され、かつ / または 275 位の Tyr (Y) が Glu (E) によりさらに置換されている、請求項 2 から 6 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 9】

273 位の Phe (F) が Thr (T) によりさらに置換され、かつ / または 275 位の Tyr (Y) が Glu (E) によりさらに置換されている、請求項 2 から 6 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 10】

275 位の Tyr (Y) が Ala (A) によりさらに置換されている、請求項 2 から 7 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 11】

CH2 領域が、SEQ ID NO: 16 に示される配列において 118 位の Thr (T) が Gln (Q) により置換されている配列を有し、かつ / または 296 位の Met (M) が Leu (L) によりさらに置換されている、請求項 2 から 10 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 12】

CH2 領域において、以下の置換のうち一つ、二つ、または三つ全てがさらに行われている、請求項 2 から 11 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体：120 位の Met (M) が Tyr (Y) により置換されている；122 位の Ser (S) が Thr (T) により置換されている；および 124 位の Thr (T) が Glu (E) により置換されている。

【請求項 13】

302 位の Asn (N) が Ala (A) によりさらに置換されている、請求項 2 から 12 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 14】

302 位の Asn (N) が Ala (A) によりさらに置換され、かつ 175 位の Thr (T) が Ala (A) によりさらに置換され、かつ 248 位の Glu (E) が Ala (A) によりさらに置換されている、請求項 2 から 13 のいずれか一項記載の一価 IgG4 抗体。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

抗原刺激を受けると、選択された抗原に結合する、以下を含む一価IgG4抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物：

- 以下を含む重鎖

(i) ヒト V_H 領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一の C_H 領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、かつ C_H3 領域が、SEQ ID NO: 16に示される配列において一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われた配列を有する、ヒト C_H 領域：234位のThr (T) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；277位のArg (R) がAla (A) により置換されている、

ならびに

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒト V_L 領域、および

(ii) ヒト C_L 領域。

【請求項 16】

以下の工程を含む、選択された抗原に結合する一価IgG4抗体の作製方法：

(i) 選択された抗原、選択された抗原を発現する細胞、もしくは選択された抗原をコードする核酸構築物、またはその組み合せを用いて、請求項15記載の動物を免疫する工程、
B細胞を得る工程、

(iii) 該B細胞からハイブリドーマを作製する工程

(iv) B細胞またはハイブリドーマにより產生される一価IgG4抗体の、選択された抗原に対する結合を試験する工程、および

(v) 選択された抗原に対して結合する能力のある一つまたは複数の一価IgG4抗体を同定する工程。

【請求項 17】

請求項16記載の方法によって得ることのできる一価IgG4抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書に引用される全ての特許、継続中の特許出願、および他の出版物は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価抗体を產生する能力のある新規の非ヒトトランスジェニック動物、改変された重鎖トランスジーン、非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法、非ヒトトランスジェニック動物を免疫する方法、およびそのような免疫方法によって得ることのできる一価抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ネイティブの抗体および免疫グロブリンは通常、二つの同一の軽(L)鎖および二つの同一の重(H)鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各々の軽鎖は、一つの共有結合性ジスルフィド結合によって重鎖に連結されているが、ジスルフィド結合の数は様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖によって異なる。各々の軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書中では V_L と省略する)および軽鎖定常領域(本明細書中では C_L と省略する)から構成される。各々の重鎖は、重鎖可変領域(V_H)ならびに C_H1 、 C_H2 、および C_H3 の三つのドメインからなる重鎖定常領域(C_H)から構成される。重鎖の

10

20

30

40

50

C_{H1} および C_{H2} は、いわゆるヒンジ領域によって相互に隔てられている。ヒンジ領域は通常、一つまたは複数のシステイン残基を含み、これが抗体分子におけるもう一方の重鎖のヒンジ領域のシステイン残基とジスルフィド結合を形成し得る。

【 0 0 0 4 】

近年、抗体は治療適用に関して大いに注目される領域となり、多くの抗体医薬が承認されているかまたは治療薬としての使用に関して承認を受けるプロセスにある。治療用抗体の所望の特徴は、処置される個別の状態に従い変化し得る。いくつかの適応、例えば、抗体の治療効果が、抗原と、そうでなければ抗原に結合できる一つまたは複数の特定分子との間の相互作用をブロックすることである場合においては、抗原結合性のみが必要とされる。このような適応においては、その唯一の機能が抗原に結合することであるFabフラグメントの使用が好ましい場合がある。他の適応においては、さらなる効果、例えば補体活性化を誘導する能力および/またはFc受容体に結合する能力、異化から保護する能力、免疫細胞を動員する能力等もまた必要とされ得る。このような用途においては、抗体分子の他の部分、例えばFc領域が必要とされ得る。いくつかの全長抗体は、Fabフラグメントとして使用された場合はアンタゴニストとして作用するにもかかわらず、標的抗原への結合に対してアゴニスト効果（これは望ましくないものとされる場合がある）を示し得る。いくつかの例において、この効果は、二価抗体の「架橋」の原因となり得、この架橋はその後標的の二量体化を促進し、標的の二量体化は、特に標的が受容体である場合に活性化をもたらし得る。可溶性抗原の場合、二量体化は望ましくない免疫複合体を形成し得る。

【 0 0 0 5 】

いくつかの場合、例えばFc RIの場合における抗原への一価結合はアポトーシスシグナルを誘導し得る（Kanamura et al., Blood, 2006年9月25日オンライン出版）。

【 0 0 0 6 】

このように、いくつかの適応においては、一価抗体が好ましい場合がある。現在入手可能なFabフラグメントは、それらのサイズが小さく腎臓に侵入できることおよびそれらがブランベル受容体（Brambell receptor）FcRnと相互作用できないことに起因して不十分な薬物動態を示し（Junghans RP et al., Proc Natl Acad Sci USA 93(11), 5512-6(1996)）、従ってインビボで不安定でありかつ投与後非常に迅速にクリアランスされる。

【 0 0 0 7 】

Fc領域が二つのFcポリペプチドを含む、二量体の一価抗体（Fab/c）もまた記載されている（GenentechによるWO200563816およびParham P, J Immunol. 131(6), 2895-902(1983)）。

【 0 0 0 8 】

このように、治療剤として使用するための安定な一価抗体に対する要望がある。

【 0 0 0 9 】

全長抗体の一つまたは複数のドメイン、例えばその抗体においてジスルフィド架橋を形成または非共有結合性の重鎖間接触を提供するのに必要なアミノ酸残基を含む領域を含むドメインの欠失は、一価抗体を構築する一つの方法であり得る。

【 0 0 1 0 】

Igarashiら（Igarashi, TM. et al., Biochemistry 29, 5727(1990)）は、 C_{H1} ドメイン全体が欠失されているがヒンジ領域はインタクトなままのマウスIgG2a分子の構造を記載した。この C_{H1} 欠失抗体は、比較的小さいヒンジ角を有する伸びた構造（elongated structure）として存在することが示されている。しかしこの分子は、IgGにおいて想定される、二つの軽鎖および二つの重鎖からなる正規の四量体構成を維持しており、従って依然として二価であり、 C_{H1} の欠失は変異型抗体の親和性に影響するものではなかった。

【 0 0 1 1 】

Larsonら（Larson, SB. et al., J Mol Biol 348, 1177(2005)）は、 C_{H2} ドメインが欠失されたヒト化IgG1抗体の構造を記載した。このような抗体は、A形態およびB形態と呼ばれる二つの分子形態で存在する。A形態は、ヒンジにおいて二つの鎖間ジスルフィド結合を含むが、Bは鎖間ジスルフィド結合を含まない。B形態は約122 kDaの分子として存在し

10

20

30

40

50

、C_H3ドメイン内の非共有結合性相互作用によって一体性が保たれているようである。この抗体は、FcRn受容体への結合およびそれを通じたリサイクルができないため、迅速な血清クリアランスを示す。

【 0 0 1 2 】

一つのみの軽鎖および一つのみの重鎖からなる二量体構造を有するIg半分子(half-molecules)は、ヒトおよびマウスのプラスマ細胞腫における稀な欠失の結果物として記載されている。髄外軟部組織プラスマ細胞腫(extramedullary soft-tissue plasmacytoma)、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、形質細胞性白血病、および多発性骨髄腫に罹患した一部の患者は、尿中にIgG半分子が排出される。半分子はまた、その血清中にも存在することが見出された。これらの半分子の生化学的性質の研究は、これらが、重鎖C_H1、ヒンジ、およびC_H2領域は正常のようであるが、C_H3領域に欠失が見られるIgG1分子からなることを示した。Spiegelbergによって分析されたIgG1半分子におけるC_H3定常領域における欠失は、5,000~8,000ダルトンを含むことが示され、そのヒンジペプチド配列は野生型IgG1と同一であった。変異はC_H3に存在するようであり、ヒンジペプチドは正常のようであった(Hobbs, JR et al., Clin Exp Immunol 5, 199(1969); Hobbs, JR, Br Med J 2, 67(1971); Spiegelberg, HL et al., Blood 45, 305(1975); Spiegelberg, HL et al., Biochemistry 14, 2157(1975); Seligmann ME et al., Ann Immunol (Paris) 129C, 855-870(1978); Gallango, ML et al., Blut 48, 91(1983))。このヒトIgG1半分子は迅速に異化され(男性における半減期は4.3日であった)、かつ单量体形態においてはC1qまたはヒトリンパ球、単球、もしくは好中球のFc受容体に結合できないことも示された(Spiegelberg, HL. J Clin Invest 56, 588(1975))。これらの研究から、IgG1半分子はIgG重鎖のFc部分に対する非共有結合性相互作用性を欠いておりこれがこの分子を不安定化させていること、およびIgG重鎖間の相互作用を維持するにはC_H3ドメインが特に重要なことを結論付けた。10

【 0 0 1 3 】

体細胞変異によって作製されたマウスIgA半分子もまた記載されている(Mushinski, JF, J Immunol 106, 41(1971); Mushinski, JF et al., J Immunol 117, 1668(1976); Potter, M et al., J Mol Biol 93, 537(1964); Robinson, EA et al., J Biol Chem 249, 6605(1974); Zack, DJ et al., J Exp Med 154, 1554(1981))。これらの分子は全て、C_H3ドメインの欠失またはC_H2~C_H3間の境界に変異を含むことが示された。ヒトIgA半分子はまた、多発性骨髄腫患者においても検出された。これらの分子もまた、C_H3領域に欠失を有することが見出された(Spiegelberg, HL et al., J Clin Invest 58, 1259(1976); Kwai et al., Ann Acad Med Singapore 9, 50(1980); Sakurabayashi, I. et al., Blood 53, 269(1979); Biewenga, J. et al., Clin Exp Immunol 51, 395(1983))。20

【 0 0 1 4 】

ヒンジが欠失したヒトIgG1変異体が記載され結晶化されている(Saphire, EO. et al., J Mol Biol 319, 95(2002))。DobおよびMcgは、ヒンジ領域が欠失したヒトIgG1サブクラスのヒト骨髄腫タンパク質である。これらのヒンジ欠失IgG1分子は、二つの重鎖および二つの軽鎖からなる構造を有する安定なIgを形成し、これは典型的な抗体のヘテロ四量体構造であるが、軽鎖間で鎖間ジスルフィド結合を形成して分子を立体配座的に強く拘束するため、エフェクター機能をほとんど~全く示さない分子である(Burton DR et al., J Mol Biol 319, 9(2002); Steiner, A et al., Biochemistry 18, 4068(1979); Silverton, EW et al., Proc Natl Acad Sci USA 74, 5140(1977); Rajan, SS et al., Mol Immunol 20 787(1983); Guddat, W et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 4271(1993); Sarma et al., J. Applied Cryst. 15, 476(1982); Klein, M., et al., Proc Natl Acad Sci USA 78, 524(1981))。30

【 0 0 1 5 】

ヒンジ領域の上部分および中央部分またはヒンジ領域全体が欠失されたIgG3分子が設計されている(Brekke, OH et al., Nature 363, 628(1993); Brekke, OH et al., Nature 383, 103(1996))。この完全ヒンジ欠失分子は、非還元型SDS-PAGEにおける分析により、40

半分子の存在を示した。完全IgG3ヒンジの上部および下部が単一のシステインで置換され IgG3ヒンジの下部が単一のAlaの欠失を含む第二のヒンジ欠失分子もまた、SDS-PAGEによる分析によれば、半分子を含むものであった。しかし、その結果は、生理学的条件下では、IgG3 C_H3ドメイン間の非共有結合性相互作用によって二つの重鎖-軽鎖の半分子が一体化し；従ってインタクトなIgG分子が形成されていたことを示す。

【0016】

対応するキメラIgG1およびIgG4抗体のセットもまた、調製されている(Horgan, C. et al., J Immunol 150, 5400(1993))。抗体の抗原結合におけるIgGヒンジ領域の役割を調査するため、ヒンジ領域を欠失したIgG1およびIgG4の両方の変異体を調製した。この変異体は、IgG1およびIgG4重鎖遺伝子からヒンジ領域のエクソンを欠失させることによってDNAレベルで作製された。IgG1およびIgG4の両方のヒンジ欠失分子は二価であり、従って典型的なヘテロ四量体構造を有することが報告された。これを支持するものとして、ヒンジ欠失IgG4の機能的親和性は野生型IgG4よりも抗原に対する結合が良いことを示し、このことはヒンジ欠失分子のアビディティがこのようにして作製されたヒンジ欠失によって影響を受けないことを示している。

【0017】

ヒトIgG4分子は様々な分子形態で存在し、これはヒンジ領域における重鎖間ジスルフィド結合の非存在または存在によって異なる。このように、二つ、一つ、またはゼロの重鎖間ジスルフィド結合が形成されたIgG4分子が存在する(Schuurman, J. et al., Mol Immunol 38, 1(2001))。生理学的条件下では、これらのIgG4の分子形態は、相互と平衡状態となり得る。ヒトIgG4は、溶液中では、これらの鎖間ジスルフィド結合の非存在または存在に関係なく、免疫グロブリンG分子において一般的な二つのIg重鎖および二つの軽鎖からなる四量体として存在する(Schuurman 2001 前出; Gregory, L. et al., Mol Immunol 24, 821(1987))。SDS-PAGE等のサイズ決定分析により実証されるように、二つの非共有結合的に結合した半分子は、非還元条件下で変性させた場合のみ解離する(Schuurman, J. et al., Mol Immunol 38, 1(2001); Deng, L. et al. Biotechnol Appl Biochem 40, 2 61(2004))。鎖間ジスルフィド結合の形成に関するヒンジ領域の残基の変異またはヒンジ領域の欠失は、溶液中で、二つの軽鎖および二つの重鎖からなる四量体分子からなるIgG4分子の均質なプールを形成させた(Schuurman, J. et al. Mol Immunol 38, 1(2001); Horgan, C. et al. J Immunol 150, 5400(1993))。IgG4ヒンジ欠失および変異抗体もまた、ネイティブIgG₄分子と比較して改善された抗原架橋能力を実証した(Horgan, C. (1993) 前出)。

【0018】

今日、多くの研究は、IgG定常領域ドメインC_H1およびC_H2の変異または欠失が、IgG分子がそれらの本来の二つの重鎖および二つの軽鎖のヘテロ四量体構成を構築するのに影響しないことを示している。重鎖の定常領域に様々な欠失を含む組換え抗体分子は、それらのエフェクター機能に影響する、例えばそれらは補体を活性化できないが抗原架橋能力は維持する、ことが示されている。さらに、一つの重鎖および一つの軽鎖を含む抗体半分子はインビボで不安定であり、かつ／またはインビボでの半減期が短くなっていることが実証されている。C_H3領域内の/C_H3領域の欠失は、ほとんどの治療目的に適合しない迅速に代謝される半分子を提供する。

【0019】

従って、抗原媒介性の活性のプロックのために一価抗体（架橋がなされない）の結合が必要となる治療適用に適した、安定な一価抗体を作製する簡単かつ向上した手順に対する要望が存在する。

【発明の概要】

【0020】

発明の概要

第一の主な局面では、本発明は抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価抗体を産生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物に関し、一価抗体は以下を含む重鎖

10

20

30

40

50

を含む：

- (i) ヒトV_H領域、および
- (ii) ヒンジ領域に対応する領域、および任意でC_H領域の他の領域、例えばC_H3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_H領域とのジスルフィド結合、または同一のC_H領域との他の共有結合性もしくは安定な非共有結合性の重鎖間結合を、形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変されている、ヒトC_H領域。

【0021】

本発明のトランスジェニック動物は、長い半減期を有する一価ヒト抗体を作製するための効率的な手段を提供する。本発明のトランスジェニック動物は、高親和性の一価抗体を入手および選択するために非常に適している。免疫の間に、一価ヒト抗体は非ヒトトランスジェニック動物において親和性成熟を行い、高親和性の抗体が作られる。

10

【0022】

本発明のトランスジェニック動物は、トランスジェニック動物を作製するために使用される周知の方法または技術を用いて作製できる。例えば、トランスジェニック動物はHuMab(商標)、KM-Mouse(商標)、TC-Mouse(商標)、またはXenomouse(商標)を作製するために上記に言及される任意の方法に類似した方法を用いて作製できる。

【0023】

さらなる主な局面では、本発明は、抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価IgG4抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物に関し、一価抗体は、

- 以下を含む重鎖

20

- (i) ヒトV_H領域、および
 - (ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一のC_H領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変されている、ヒトC_H領域、
- ならびに

- 以下を含む軽鎖

- (i) ヒトV_L領域、および
- (ii) ヒトC_L領域

を含む。

【0024】

さらなる主な局面では、本発明は、抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価IgG4抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物に関し、一価抗体は、

30

- 以下を含む重鎖

- (i) ヒトV_H領域、および
 - (ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一のC_H領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、およびC_H3領域はSEQ ID NO: 16に示される配列を有するが、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、ヒトC_H領域：234位のThr(T)がAla(A)により置換されている；236位のLeu(L)がAla(A)により置換されている；236位のLeu(L)がVal(V)により置換されている；273位のPhe(F)がAla(A)により置換されている；273位のPhe(F)がLeu(L)により置換されている；275位のTyr(Y)がAla(A)により置換されている；277位のArg(R)がAla(A)により置換されている、
- ならびに

40

- 以下を含む軽鎖

- (i) ヒトV_L領域、および
- (ii) ヒトC_L領域

を含む。

【0025】

さらなる主な局面では、本発明は、抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価IgG1抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物に関し、一価抗体は、以下を含む重鎖

50

(i) ヒト V_H 領域、および
 (ii) ヒンジ領域に対応する領域および C_H3 領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一の C_H 領域とのジスルフィド結合、または同一の C_H 領域との他の共有結合性もしくは安定な非共有結合性の重鎖間結合を、形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないよう改変されている、ヒト C_H 領域、

ならびに、以下を含む軽鎖

(i) ヒト V_L 領域、および
 (ii) ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一の C_L 領域とのジスルフィド結合または同一の C_L 領域との他の共有結合を形成する能力のあるアミノ酸を全く含まないように改変されている、ヒト C_L 領域、

を含む。

10

【0026】

さらなる主な局面では、本発明は、

(i) 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、
 (ii) ヒト C_H 遺伝子が、天然に存在するヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座よりもヒト μC_H 遺伝子の近くにある、ヒト μC_H 遺伝子および少なくとも一つの改変された C_H 遺伝子を含む、複数のヒト C_H 遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列を含む重鎖トランスジーンに関する。

【0027】

さらなる主な局面では、本発明は、

20

(i) 選択された抗原、選択された抗原を発現する細胞、もしくは選択された抗原をコードする核酸構築物、またはその組み合せを用いて本発明に従って動物を免疫する工程、
 (ii) 選択された抗原に結合する一価抗体を発現するトランスジェニック動物からB細胞を得る工程、
 (iii) 任意でB細胞からハイブリドーマを作製する工程、
 (iv) B細胞またはハイブリドーマが産生する一価抗体の、選択された抗原への結合を試験する工程、および
 (v) 選択された抗原に結合する能力のある一つまたは複数の一価抗体を同定する工程を含む、選択された抗原に結合する一価抗体を作製する方法に関する。

【0028】

30

さらなる主な局面では、本発明は、本明細書に定義される本発明に従う方法によって得ることのできる一価抗体に関する。

【0029】

さらなる主な局面では、本発明は、本明細書に定義される本発明に従う方法によって得られた一価抗体に関する。

【0030】

さらなる主な局面では、本発明は、一価抗体の作製に関して本明細書に定義される本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物の使用に関する。

【0031】

40

さらなる主な局面では、本発明は、

(i) 非ヒト動物の胚幹細胞に、本発明に従う重鎖トランスジーン構築物、および任意で本明細書に定義される軽鎖を産生する能力のある軽鎖トランスジーンを導入する工程、
 (ii) トランスジーンを発現する胚幹細胞を選択する工程、
 (iii) 形質転換した胚幹細胞を胚盤胞の内細胞塊に注入する工程、
 (iv) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に胚盤胞を移植する工程、
 (v) 子孫をトランスジーンの存在について試験する工程、および
 (vi) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程

を含む、本明細書に定義される本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法に関する。

50

【0032】

さらなる主な局面では、本発明は、

- (i) 非ヒト動物の受精卵の前核に、本発明に従うトランスジーンを含むベクター構築物、および任意で本明細書に定義される軽鎖を產生する能力のある軽鎖トランスジーンを注入する工程、
- (ii) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に受精卵を移植する工程、
- (iii) 子孫をトランスジーンの存在について試験する工程、および
- (iv) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程

を含む、本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法に関する。 10

【0033】

さらなる主な局面では、本発明は、

- (i) 既存のトランスジェニック配列を含んでいるためヒト抗体を產生できる非ヒトトランスジェニック動物の胚幹細胞に、本明細書に定義される改変を含む C_H 領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーン、および任意で、本明細書の改変を含む C_L 領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーンを導入する工程であって、

ここで、トランスジーンは、トランスジェニック動物ゲノムのゲノム組み込みならびに対応するヒト C_H 領域またはそのフラグメントの置換、および任意で、対応するヒト C_L 領域またはそのフラグメントの置換が起きると、残っている既存のトランスジェニック配列に機能的に連結するよう設計されており、それにより動物は本明細書に定義される一価抗体を产生できるようになる工程、 20

- (ii) 工程(i)で導入されたトランスジーンを発現する胚幹細胞を選択する工程、
- (iii) 形質転換した胚幹細胞を胚盤胞の内細胞塊に注入する工程、
- (iv) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に胚盤胞を移植する工程、
- (v) 子孫をトランスジーンの存在について試験する工程、および
- (vi) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程

を含む、本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法に関する。

【0034】

さらなる主な局面では、本発明は、

- (i) 既存のトランスジェニック配列を含んでいるためヒト抗体を產生できる非ヒトトランスジェニック動物の受精卵の前核に、本明細書に定義される改変を含む C_H 領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーン、および任意で、本明細書に定義される改変を含む C_L 領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーンを注入する工程であって、

ここで、トランスジーンは、トランスジェニック動物ゲノムのゲノム組み込みならびに対応するヒト C_H 領域またはそのフラグメントの置換、および任意で、対応するヒト C_L 領域またはそのフラグメントの置換が起きると、残っている既存のトランスジェニック配列に機能的に連結するよう設計されており、それにより動物は本明細書に定義される一価抗体を产生できるようになる工程、 40

- (ii) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に受精卵を移植する工程、
- (iii) 子孫を工程(i)で導入したトランスジーンの存在について試験する工程、および
- (iv) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程

を含む、本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法に関する。

【0035】

さらなる局面では、本発明は上記の方法によって得ることのできるまたは得られた非ヒトトランスジェニック動物に関する。

抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物であって、該一価抗体が以下を含む重鎖を含む、非ヒトトランスジェニック動物：

(i) ヒトV_H領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域、および任意でC_H領域の他の領域、例えばC_H3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_H領域とのジスルフィド結合、または同一のC_H領域との他の共有結合性もしくは安定な非共有結合性の重鎖間結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変されている、ヒトC_H領域。

[請求項1002]

前記一価抗体が、以下を含む軽鎖をさらに含む、請求項1001記載の非ヒトトランスジェニック動物：

10

(i) ヒトV_L領域、および

(ii) ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_L領域とのジスルフィド結合または同一のC_L領域との他の共有結合を形成する能力のあるアミノ酸を全く含まないように改変されていてもよい、ヒトC_L領域。

[請求項1003]

トランスジーンが動物のリンパ球において生産的 (productive) VDJ再構成およびアイソタイプスイッチを行う、機能的に連結された以下を含む重鎖トランスジーンをそのゲノムに含む、請求項1001または1002記載の非ヒトトランスジェニック動物：

(i) 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

20

(ii) ヒトμC_H遺伝子および少なくとも一つの改変されたC_H遺伝子を含む、複数のヒトC_H遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列。

[請求項1004]

以下を含む 軽鎖トランスジーンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物：

(i) 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

(ii) 請求項1002に定義されたC_L領域の改変をコードしていてもよい、ヒトC_L遺伝子。

[請求項1005]

以下を含む 軽鎖トランスジーンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の非ヒトトラン스ジェニック動物：

30

(i) 複数のヒトV遺伝子、少なくとも一つのヒトJ遺伝子、および

(ii) 請求項1002に定義されたC_L領域の改変をコードしていてもよい、少なくとも一つのヒトC_L遺伝子。

[請求項1006]

抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価IgG4抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物であって、該一価抗体が以下を含む、非ヒトトランスジェニック動物：

- 以下を含む重鎖

(i) ヒトV_H領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一のC_H領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変されている、ヒトC_H領域、

ならびに

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒトV_L領域、および

(ii) ヒトC_L領域。

[請求項1007]

トランスジーンが動物のリンパ球において生産的V(D)J再構成およびアイソタイプスイッチを行う、そのゲノムに以下を含む、請求項1006記載の非ヒトトランスジェニック動物：

(i) 機能的に連結された、

40

50

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および
 - ヒト μC_H 遺伝子および少なくとも一つのヒンジ改変C4遺伝子を含む、複数のヒト C_H 遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列
 を含む重鎖トランスジーン、ならびに

(iia)

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

- ヒト C_L 遺伝子、

を含む軽鎖トランスジーン、および／または

(iib)

- 複数のヒトV遺伝子、少なくとも一つのヒトJ遺伝子、および

- 少なくとも一つのヒト C_L 遺伝子

を含む軽鎖トランスジーン。

[請求項1008]

抗原刺激を受けると、選択された抗原に結合する、以下を含む一価IgG4抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物：

- 以下を含む重鎖

(i) ヒト V_H 領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一の C_H 領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、かつ C_H 3領域がSEQ ID NO: 16に示される配列を有するが、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、ヒト C_H 領域：234位のThr(T)がAla(A)により置換されている；236位のLeu(L)がAla(A)により置換されている；236位のLeu(L)がVal(V)により置換されている；273位のPhe(F)がAla(A)により置換されている；273位のPhe(F)がLeu(L)により置換されている；275位のTyr(Y)がAla(A)により置換されている；277位のArg(R)がAla(A)により置換されている、

ならびに

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒト V_L 領域、および

(ii) ヒト C_L 領域。

[請求項1009]

トランスジーンが動物のリンパ球において生産的V(D)J再構成およびアイソタイプスイッチを行う、そのゲノム中に以下を含む、請求項1008記載の非ヒトトランスジェニック動物：

(i) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

- ヒト μC_H 遺伝子および少なくとも一つの改変C4遺伝子を含む、複数のヒト C_H 遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列

を含む重鎖トランスジーン、

ならびに

(iia)

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

- ヒト C_L 遺伝子、

を含む軽鎖トランスジーン、および／または

(iib)

- 複数のヒトV遺伝子、少なくとも一つのヒトJ遺伝子、および

- 少なくとも一つのヒト C_L 遺伝子

を含む軽鎖トランスジーン。

[請求項1010]

抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する、以下を含む一価IgG1抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物：

10

20

30

40

50

以下を含む重鎖(i) ヒト V_H 領域、および(ii) ヒンジ領域に対応する領域および C_H3 領域が、ポリクローナルヒト IgG の存在下で、同一の C_H 領域とのジスルフィド結合、または同一の C_H 領域との他の共有結合性もしくは安定な非共有結合性の重鎖間結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないよう改変されている、ヒト C_H 領域、ならびに以下を含む軽鎖(i) ヒト V_L 領域、および(ii) ポリクローナルヒト IgG の存在下で、同一の C_L 領域とのジスルフィド結合または同一の C_L 領域との他の共有結合を形成する能力のあるアミノ酸を全く含まないように改変されている、ヒト C_L 領域。

10

[請求項1011]トランスジーンが動物のリンパ球において生産的 V(D)J 再構成およびアイソタイプスイッチを行う、そのゲノム中に以下を含む、請求項1010記載の非ヒトトランスジェニック動物：(i) 機能的に連結された- 複数のヒト V 遺伝子、複数のヒト D 遺伝子、複数のヒト J 遺伝子、および
- ヒト μ C_H 遺伝子および少なくとも一つの改変 C₁ 遺伝子を含む複数のヒト C_H 遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列

20

を含む重鎖トランスジーン、ならびに(iia)- 複数のヒト V 遺伝子、複数のヒト J 遺伝子、および- 改変ヒト C_L 遺伝子、を含む 軽鎖トランスジーン、および / または(iib)- 複数のヒト V 遺伝子、少なくとも一つのヒト J 遺伝子、および- 少なくとも一つの改変ヒト C_L 遺伝子を含む 軽鎖トランスジーン。

30

[請求項1012]請求項1006 ~ 1009 のいずれか一項に定義される IgG4 価抗体を產生する能力がある、請求項1010または1011記載の非ヒトトランスジェニック動物。[請求項1013]内因性動物免疫グロブリン重鎖遺伝子座が不活化されている、前記請求項のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。[請求項1014]内因性動物免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座が不活化されている、前記請求項のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。[請求項1015]

40

内因性動物免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座が不活化されている、前記請求項のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。[請求項1016]ヒト C_H 遺伝子が、天然に存在するヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座よりもヒト μ C_H 遺伝子の近くにある、前記請求項のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。[請求項1017]重鎖トランスジーンが SEQ ID NO: 19 に示される C_H3 領域を含む C_H 領域をコードするが、C_H3 領域は、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、請求項1011記載の非ヒトトランスジェニック動物：238位の Arg (R) が Gln (Q) により置換されている；239位の Asp (D) が Glu (E) により置換されている；249位の Thr (T) が Ala

50

(A)により置換されている；251位のLeu (L)がAla (A)により置換されている；251位のLeu (L)がVal (V)により置換されている；288位のPhe (F)がAla (A)により置換されている；288位のPhe (F)がLeu (L)により置換されている；290位のTyr (Y)がAla (A)により置換されている；292位のLys (K)がArg (R)により置換されている；292位のLys (K)がAla (A)により置換されている；302位のGln (Q)がGlu (E)により置換されている；および328位のPro (P)がLeu (L)により置換されている。

[請求項1018]

一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われている、請求項1017記載の非ヒトトランスジェニック動物：238位のArg (R)がGln (Q)により置換されている；239位のAsp (D)がGlu (E)により置換されている；292位のLys (K)がArg (R)により置換されている；302位のGln (Q)がGlu (E)により置換されている；および328位のPro (P)がLeu (L)により置換されている。

10

[請求項1019]

- (i) 238位のArg (R)がGln (Q)により置換されているか、
- (ii) 238位のArg (R)がGln (Q)により置換され、かつ328位のPro (P)がLeu (L)により置換されているか、または
- (iii) 9つのアミノ酸全てが置換されている、

請求項1017～1018のいずれか記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1020]

重鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 19に示されるC_H1および／またはC_H2領域をさらにコードする、前記請求項1017～1019のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

20

[請求項1021]

軽鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 18に示されるアミノ酸配列を有するカッパC_L領域をコードするが、該配列は、106位の末端システイン残基が別のアミノ酸残基で置換されるか欠失するように改変されている、前記請求項1011または1017～1020のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1022]

軽鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 17に示されるアミノ酸配列を有するラムダC_L領域をコードするが、該配列は、104位のシステイン残基が別のアミノ酸残基で置換されるか欠失するように改変されている、前記請求項1011または1017～1020のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

30

[請求項1023]

重鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 19に示されるC_H1領域をさらにコードするが、C_H1領域は、14位のSer (S)がシステイン残基により置換されるように改変されている、上記の請求項1011または1017～1020のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1024]

重鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 20に示されるC_H3領域を含むC_H領域をコードするが、C_H3領域は、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるよう改変されている、請求項1003記載の非ヒトトランスジェニック動物：234位のArg (R)がGln (Q)により置換されている；245位のThr (T)がAla (A)により置換されている；247位のLeu (L)がAla (A)により置換されている；247位のLeu (L)がVal (V)により置換されている；276位のMet (M)がVal (V)により置換されている；284位のPhe (F)がAla (A)により置換されている；284位のPhe (F)がLeu (L)により置換されている；286位のTyr (Y)がAla (A)により置換されている；288位のLys (K)がArg (R)により置換されている；288位のLys (K)がAla (A)により置換されている；298位のGln (Q)がGlu (E)により置換されている；および324位のPro (P)がLeu (L)により置換されている。

40

[請求項1025]

重鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 20に示されるC_H1および／またはC_H2領域をさらにコードする、請求項1024記載の非ヒトトランスジェニック動物。

50

[請求項1026]

重鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 21に示されるC_H3領域を含むC_H領域をコードするが、C_H3領域は、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、請求項1003記載の非ヒトトランスジェニック動物：285位のArg (R) がGln (Q) により置換されている；296位のThr (T) がAla (A) により置換されている；298位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；298位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；314位のSer (S) がAsn (N) により置換されている；322位のAsn (N) がLys (K) により置換されている；327位のMet (M) がVal (V) により置換されている；335位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；335位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；337位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；339位のLys (K) がArg (R) により置換されている；339位のLys (K) がAla (A) により置換されている；349位のGln (Q) がGlu (E) により置換されている；352位のIle (I) がVal (V) により置換されている；365位のArg (R) がHis (H) により置換されている；366位のPhe (F) がTyr (Y) により置換されている；および375位のPro (P) がLeu (L) により置換されている。

10

[請求項1027]

重鎖トランスジーンがSEQ ID NO: 21に示されるC_H1および／またはC_H2領域をさらにコードする、請求項1026記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1028]

重鎖トランスジーンが、C_H領域のヒンジ領域に対応する領域がシステイン残基を全く含まないように改変されているC_H領域をコードする、前記請求項1003～1027のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

20

[請求項1029]

重鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 14のC_H配列のアミノ酸106および109に対応するアミノ酸が欠失するように改変されているC_H領域をコードする、前記請求項1003～1027のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1030]

重鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 14のC_H配列のアミノ酸106および109に対応するアミノ酸残基の一つがシステイン以外のアミノ酸残基で置換され、かつSEQ ID NO: 14の配列のアミノ酸残基106および109に対応する他方のアミノ酸残基が欠失するように改変されているC_H領域をコードする、前記請求項1003～1027のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

30

[請求項1031]

重鎖トランスジーンが、アミノ酸残基106に対応するアミノ酸残基がシステイン以外のアミノ酸残基で置換され、かつアミノ酸残基109に対応するアミノ酸残基が欠失するように改変されているC_H領域をコードする、請求項1030記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1032]

重鎖トランスジーンが、アミノ酸残基106に対応するアミノ酸残基が欠失し、かつアミノ酸残基109に対応するアミノ酸残基がシステイン以外のアミノ酸残基で置換されるように改変されているC_H領域をコードする、請求項1030記載の非ヒトトランスジェニック動物。

40

[請求項1033]

重鎖トランスジーンが、少なくともSEQ ID NO: 14のC_H配列のアミノ酸残基106から109に対応するアミノ酸残基が欠失するように改変されているC_H領域をコードする、前記請求項1003～1027のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1034]

重鎖トランスジーンが、少なくともSEQ ID NO: 14の配列のアミノ酸残基99から110に対応するアミノ酸残基が欠失するように改変されているC_H領域をコードする、前記請求項1003～1027のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1035]

50

重鎖トランスジーンが、SEQ ID NO: 16に示されるC_H領域をコードする、前記請求項1003～1027のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1036]

重鎖トランスジーンが、ヒンジ領域全体が欠失するように改変されているC_H領域をコードする、前記請求項1003～1027のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1037]

動物が、10⁻⁷ Mまたはそれ以下、例えば10⁻⁸ M、10⁻⁹ M、10⁻¹⁰ M、または10⁻¹¹ Mもしくはそれ以下の解離定数 (k_d) で、選択された抗原、例えばc-Metに結合する一価抗体を産生する能力がある、前記請求項のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1038]

ラクダ科の動物、例えばラマもしくはラクダ、または齧歯類の動物、例えばマウス、ウサギ、モルモット、もしくはラットのような、哺乳動物である、前記請求項のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1039]

C57BL/6J、CBA/J、DBA/2J、129/sv、またはSJL/J系統に由来するマウスのような、マウスである、請求項1038記載の非ヒトトランスジェニック動物。

[請求項1040]

以下を含む重鎖トランスジーン：

(i) 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

(ii) ヒト C_H遺伝子が天然に存在するヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座よりもヒト μ C_H遺伝子の近くにある、ヒト μ C_H遺伝子および少なくとも一つの改変 C_H遺伝子を含む、複数のヒト C_H遺伝子および関連アイソタイプスイッチ配列。

[請求項1041]

以下の工程を含む、選択された抗原に結合する一価抗体の作製方法：

(i) 選択された抗原、選択された抗原を発現する細胞、もしくは選択された抗原をコードする核酸構築物、またはその組み合せを用いて、前記請求項1001～1039のいずれか一項記載の動物を免疫する工程、

(ii) トランスジェニック動物から、選択された抗原に結合する一価抗体を発現するB細胞を得る工程、

(iii) 任意で、該B細胞からハイブリドーマを作製する工程

(iv) B細胞またはハイブリドーマにより產生される一価抗体の、選択された抗原に対する結合を試験する工程、および

(v) 選択された抗原に対して結合する能力のある一つまたは複数の一価抗体を同定する工程。

[請求項1042]

さらに以下の工程を含む、請求項1041記載の方法：

(vi) 一価抗体のコード配列を同定する工程、および

(vii) 組み換え発現系において一価抗体を产生する工程。

[請求項1043]

工程 (iii) およびさらに以下の工程を含む、請求項1041記載の方法：

(vi) ハイブリドーマから一価抗体を产生および精製する工程。

[請求項1044]

抗原が、VEGF、c-Met、CD20、CD38、IL-8、CD25、CD74、FcαlphaRI、FcεpsilonRI、アセチルコリン受容体、fas、fasL、TRAIL、肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスのエンベロープE2、組織因子、組織因子と第VII因子の複合体、EGFr、CD4、およびCD28から選択される、請求項1041～1043のいずれか一項記載の方法。

[請求項1045]

前記請求項1041～1044のいずれか一項記載の方法によって得ることのできる一価抗体。

[請求項1046]

前記請求項1041～1044のいずれか一項記載の方法によって得られた一価抗体。

10

20

30

40

50

[請求項1047]以下を含む、請求項1045記載の一価抗体：- 以下を含む重鎖(i) ヒトV_H領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一のC_H領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、かつC_H3領域がSEQ ID NO: 16に示される配列を有するが、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、ヒトC_H領域：234位のThr (T) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；277位のArg (R) がAla (A) により置換されている、

ならびに- 以下を含む軽鎖(i) ヒトV_L領域、および(ii) ヒトC_L領域。[請求項1048]以下を含む、選択された抗原に結合する一価IgG4抗体：- 以下を含む重鎖(i) ヒトV_H領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一のC_H領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、かつC_H3領域がSEQ ID NO: 16に示される配列を有するが、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、ヒトC_H領域：234位のThr (T) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；277位のArg (R) がAla (A) により置換されている、

ならびに- 以下を含む軽鎖(i) ヒトV_L領域、および(ii) ヒトC_L領域。[請求項1049]SEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含む、請求項1048記載の一価抗体。[請求項1050]225位のGlu (E) がAla (A) により置換されている、請求項1049記載の一価抗体。[請求項1051]234位のThr (T) がAla (A) により置換されている、請求項1049から1050のいずれか記載の一価抗体。[請求項1052]236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている、請求項1049から1051のいずれか一項記載の一価抗体。[請求項1053]236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている、請求項1049から1051のいずれか一項記載の一価抗体。[請求項1054]236位のLeu (L) がGlu (E) により置換されている、請求項1049から1051のいずれか一項記載の一価抗体。[請求項1055]236位のLeu (L) がGly (G) により置換されている、請求項1049から1051のいずれか一

10

20

30

40

50

項記載の一価抗体。

[請求項1056]

238位のLys (K) がAla (A) により置換されている、請求項1049から1055のいずれか一項記載の一価抗体。

[請求項1057]

267位のAsp (D) がAla (A) により置換されている、請求項1049から1056のいずれか一項記載の一価抗体。

[請求項1058]

273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている、請求項1049から1057のいずれか一項記載の一価抗体。

10

[請求項1059]

273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている、請求項1049から1057のいずれか一項記載の一価抗体。

[請求項1060]

273位のPhe (F) がAsp (D) により置換され、かつ / または275位のTyr (Y) がGlu (E) により置換されている、請求項1049から1057のいずれか一項記載の一価抗体。

[請求項1061]

273位のPhe (F) がThr (T) により置換され、かつ / または275位のTyr (Y) がGlu (E) により置換されている、請求項1049から1057のいずれか一項記載の一価抗体。

20

[請求項1062]

275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている、請求項1049から1059のいずれか一項記載の一価抗体。

[請求項1063]

SEQ ID NO: 16に示されるCH2領域をさらに含むが、118位のThr (T) がGln (Q) により置換され、かつ / または296位のMet (M) がLeu (L) により置換されている、請求項1049から1062のいずれか一項記載の一価抗体。

[請求項1064]

SEQ ID NO: 16に示されるCH2領域をさらに含むが、以下の置換のうち一つ、二つ、または三つ全てが行われている、請求項1049から1063のいずれか一項記載の一価抗体：120位のMet (M) がTyr (Y) により置換されている；122位のSer (S) がThr (T) により置換されている；および124位のThr (T) がGlu (E) により置換されている。

30

[請求項1065]

SEQ ID NO: 16に示されるCH2領域をさらに含むが、302位のAsn (N) がAla (A) により置換されている、請求項1049から1064のいずれか一項記載の一価抗体。

[請求項1066]

SEQ ID NO: 16に示されるCH2領域をさらに含むが、302位のAsn (N) がAla (A) により置換され、かつ175位のThr (T) がAla (A) により置換され、かつ248位のGlu (E) がAla (A) により置換されている、請求項1049から1065のいずれか一項記載の一価抗体。

[請求項1067]

一価抗体を作製するための、請求項1001 ~ 1039のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物の使用。

40

[請求項1068]

以下の工程を含む、前記請求項1001 ~ 1039のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法：

(i) 非ヒト動物の胚幹細胞に、請求項1040記載の重鎖トランスジーン構築物、および任意で請求項1002に定義される軽鎖を産生する能力のある軽鎖トランスジーンを導入する工程、

(ii) トランスジーンを発現する胚幹細胞を選択する工程、

(iii) 形質転換した胚幹細胞を胚盤胞の内細胞塊に注入する工程、

(iv) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に胚盤胞を移植する工程、

50

(v) 子孫をトランスジーンの存在について試験する工程、および

(vi) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程。

[請求項1069]

以下の工程を含む、前記請求項1001～1039のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法：

(i) 非ヒト動物の受精卵の前核に、請求項1040記載のトランスジーンを含むベクター構築物、および任意で請求項1002に定義される軽鎖を產生する能力のある軽鎖トランスジーンを注入する工程、

(ii) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に受精卵を移植する工程、

10

(iii) 子孫をトランスジーンの存在について試験する工程、および

(iv) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程。

[請求項1070]

以下の工程を含む、前記請求項1001～1039のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法：

(i) 既存のトランスジェニック配列を含んでいるためヒト抗体を產生できる非ヒトトランスジェニック動物の胚幹細胞に、請求項1001～1036のいずれか一項に定義される改変を含むC_H領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーン、および任意で、請求項1003～1036のいずれか一項に定義される改変を含むC_L領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーンを導入する工程であって、

20

ここで、該トランスジーンは、トランスジェニック動物ゲノムのゲノム組み込みならびに対応するヒトC_H領域またはそのフラグメントの置換、および任意で、対応するヒトC_L領域またはそのフラグメントの置換が起きると、残っている既存のトランスジェニック配列に機能的に連結するよう設計されており、それにより動物は請求項1001～1036のいずれか一項に定義される一価抗体を產生できるようになる工程、

(ii) 工程(i)で導入されたトランスジーンを発現する胚幹細胞を選択する工程、

(iii) 形質転換した胚幹細胞を胚盤胞の内細胞塊に注入する工程、

(iv) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に胚盤胞を移植する工程、

(v) 子孫をトランスジーンの存在について試験する工程、および

30

(vi) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程。

[請求項1071]

以下の工程を含む、前記請求項1001～1039のいずれか一項記載の非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法：

(i) 既存のトランスジェニック配列を含んでいるためヒト抗体を產生できる非ヒトトランスジェニック動物の受精卵の前核に、請求項1001～1036のいずれか一項に定義される改変を含むC_H領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーン、および任意で、請求項1003～1036のいずれか一項に定義される改変を含むC_L領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーンを注入する工程であって、

40

ここで、該トランスジーンは、トランスジェニック動物ゲノムのゲノム組み込みならびに対応するヒトC_H領域またはそのフラグメントの置換、および任意で、対応するヒトC_L領域またはそのフラグメントの置換が起きると、残っている既存のトランスジェニック配列に機能的に連結するよう設計されており、それにより動物は請求項1001～1036のいずれか一項に定義される一価抗体を產生できるようになる工程、

(ii) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に受精卵を移植する工程、

(iii) 子孫を工程(i)で導入したトランスジーンの存在について試験する工程、および

(iv) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程。

[請求項1072]

50

工程(i)で提供される非ヒトトランスジェニック動物が、HuMab-Mouse(商標)、KM-Mouse(商標)、TC-Mouse(商標)、またはXenomouse(商標)のようなトランスジェニックマウスである、請求項1070または1071記載の方法。

[請求項1073]

請求項1068～1072のいずれか一項記載の方法によって得ることのできる非ヒトトランスジェニック動物。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】CD20特異的抗体7D8-IgG1、7D8-IgG4、および7D8-HGを、非還元型SDS-PAGEにおいて評価した。レーン1：Marker SeuBlue plus2 prestained (Invitrogen BV, The Netherlands)、レーン2：内部対照、レーン3：7D8-IgG1、レーン4：7D8-IgG4、およびレーン5：7D8-HGを示す。
10

【図2】還元型CNBr/7D8-HGのトリプシン消化産物において39.3分のTIC時間で溶出した[M+3H]3+および[M+2H]2+イオン（それぞれ、m/z 676.4および1014.1）についての抽出イオンクロマトグラムを示す。

【図3】還元型CNBr/7D8-HGのトリプシン消化産物由来のアミノ酸残基220～238を網羅するペプチド（220VAPEFLGGPSVFLFPPKPK238）(SEQ ID NO: 54)に対応するm/zシグナルのナノスプレー式MS/MS分析から得た生データを示す。

【図4】(AおよびB)還元型CNBr/7D8-HGのトリプシン消化産物由来のアミノ酸残基220～238を網羅するペプチド（220VAPEFLGGPSVFLFPPKPK238）(SEQ ID NO: 54)に対応するm/zシグナルのナノスプレー式MS/MS分析から得た生データの解釈を示す。図4Bに示された配列はSEQ ID NO: 55およびSEQ ID NO: 56に与えられている。ハイライトされた配列は、SEQ ID NO: 16で欠失されているSEQ ID NO: 14のアミノ酸99～110に対応する。
20

【図5】CD20特異的抗体7D8-IgG1、7D8-IgG4、および7D8-HGを、それらのCD20トランスフェクト細胞に対する結合に関して評価した。

【図6】CD20特異的抗体7D8-IgG1、7D8-IgG4、および7D8-HGで、ELISAプレートをコーティングした(x軸に示される濃度範囲で)。C1q結合(2 μg/ml)を評価した。

【図7】A) Daudi細胞を、一定濃度範囲のCD20特異的抗体と共に10分間ブレインキュベートした後、NHSを加えた。CDCの誘導から45分後に、細胞をPI溶液で再懸濁した。細胞の溶解(PI陽性細胞の数)をフローサイトメトリーによって測定した。データは、PI陽性(死)細胞の平均蛍光強度を示す。B) 測定された溶解における補体の役割を評価するため、熱不活性化血清(血清T)を、10 μgの抗体と共にインキュベートした細胞に加えた。データは、PI陽性(死)細胞の平均蛍光強度を示す。
30

【図8】Bet v 1に対するヒンジレスIgG4抗体(Betv1-HG)を、非還元型SDS-PAGEにおいて試験した。レーン1：Marker SeaBlue plus2 prestained (Invitrogen BV, The Netherlands)、レーン2：内部対照、レーン3：Betv1-HG、レーン4：IgG1対照を示す。

【図9】Betv1-HG(ヒンジレスIgG4抗Bet v 1)のゲル濾過を示す。ヒンジレスIgG4 Bet v 1-HGを含むHEK細胞由来の馴らし培地を、Superdex200カラムによって分画した。計1 μgのBetv1-HGをカラムにアプライした。そのフラクション中の、Bet v 1特異的IgG()を、Bet v 1結合試験において10 μlの各フラクションをインキュベートすることによって測定した。結果は、添加した量に対する放射標識Bet v 1結合の割合として表す。点線の曲線は、HPLCにおいて214nmの吸収(A214nm)を測定することにより追跡した精製型Betv1-IgG4(10 μg)の溶出を表す。
40

【図10】Betv1-IgG1、Betv1-IgG4、およびBetv1-HGの結合を、放射免疫アッセイにおいて試験した。プロテインGセファロースに結合させた抗体の連続希釈物に対する¹²⁵I標識Bet v 1の結合を試験した。

【図11】セファロース結合型Bet v 1と放射標識Bet v 1を架橋するBetv1-IgG1、Betv1-IgG4、およびBetv1-HGの能力を、放射免疫アッセイにおいて試験した。Bet v 1セファロースに結合させた抗体の連続希釈物に対する¹²⁵I標識Bet v 1の結合を試験した。

【図12】正常な7D8-IgG4、インタクトな7D8-IgG1、7D8-IgG1、F(ab')2、および7D8-IgG
50

1 Fabフラグメントとの比較における、マウスあたり $100 \mu\text{g}$ の静脈内投与後の7D8-HGのマウス血漿濃度の片対数プロットを示す。

【図13】用量 / 濃度 - 時間曲線 (D/AUC) から算出された曲線下面積としての血漿クリアランス速度の対数プロットを示す。データは個々のマウスを表し、 $\text{mL} \cdot \text{日}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ で表す。

【図14】A431細胞におけるEGF誘導性のEGFrのリン酸化の、抗EGFr mAb 2F8-HGによる阻害を、2F8-IgG4および2F8-Fabフラグメントと比較して示す用量-反応曲線を示す。上パネルは無血清培地における阻害曲線を示し、中パネルおよび下パネルは、それぞれ、培地に $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ および $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のIVIGを添加した場合の阻害を示す。y軸は、抗ホスホ-チロシンmAbによって検出されたリン酸化型EGFrを表し、時間分解蛍光単位 (TRF単位) で表される。x軸は、mAbの濃度 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。データ点は、4つの反復実験の平均およびSEMである。

【図15】時間内の濃度の片対数プロットを示す。初期血漿濃度は全て、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のオーダーであり、これはマウスの血漿区画への初期分布と一致する。ヒンジレスIgG4変種体のクリアランスは、正常なIgG4のそれよりもわずかに速いのみであった。重要なことは、ヒンジレス変種体のクリアランスが、同等の分子サイズを有する $F(ab')_2$ フラグメントのそれよりもずっと遅かったことである。本実験は、Fc部分が、正常な免疫系を有するマウスにおける血漿滞留時間に対して好ましい効果を有することを示し、内因性のIgGの存在下であっても新生児Fc受容体 (FcRn) と機能的な相互作用をするという示唆を提供する。

【図16】EGFrタンパク質のコーティングに対する2F8-HGの結合を、ELISAにおいて、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のポリクローナルヒトIgG (IVIG) の存在下で、2F8-IgG4、2F8-IgG1、および2F8-IgG1のFabフラグメントのそれと比較した。

【図17】2F8-HGによるADCCの誘導を、2F8-IgG1および2F8-IgG4によるそれと比較した。A431細胞を標的細胞として使用し、ヒト末梢血単核球をエフェクター細胞として使用した。

【図18】実施例において使用したプライマーの配列を示す。

【図19】実施例において使用したプライマーの配列を示す。

【図20】IVIGを補充したSCIDマウスにおける7D8変種体のクリアランスを示す。図は、上パネルにおいて、時間内のmAb 7D8変種体の濃度の片対数プロットを、および下パネルにおいて、総ヒトIgG濃度を示す。

【図21】FcRn -/- マウス対野生型マウスの7D8変種体のクリアランスを示す。図は、時間内の濃度の片対数プロットを示す。初期血漿濃度は全て、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のオーダーであり、これはマウスの血漿区画への初期分布と一致する。このモデルにおいては、ヒンジレスIgG4変種体 (7D8-HG) 、正常ヒトIgG4 (7D8-IgG4) 、および7D8 IgG1由来の $F(ab')_2$ フラグメント (7D8-G1-F(ab')₂) を比較した。

【図22】DU-145細胞を培養し、(A) cMet-Fab、cMet-FabおよびIVIG、cMet-FabおよびHGF、cMet-FabおよびIVIGおよびHGF (B) cMet-HG、cMet-HGおよびIVIG、cMet-HGおよびHGF、cMet-HGおよびIVIGおよびHGFの連続希釈物と共にインキュベートした。分散を、48時間後に、二重盲検下 (14名による記録) で、顕微鏡により観察し、平均スコア±SEMをプロットしている。

【図23】DU-145細胞を培養し、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の(A) cMet-Fab、cMet-FabおよびIVIG、cMet-FabおよびHGF、cMet-FabおよびIVIGおよびHGF (B) cMet-HG、cMet-HGおよびIVIG、cMet-HGおよびHGF、cMet-HGおよびIVIGおよびHGFと共にインキュベートした。分散を、48時間後に、二重盲検下 (14名による記録) で、顕微鏡により観察した。IVIGをえたまたは加えていないcMet-FabおよびIVIGと共にプレインキュベートしたcMet-HGは、HGF誘導性の分散を有意に阻害した。統計分析のために、仮の中央値3 (最大分散) を用いて両側ウイルコクソン符号付き順位和検定を行った。

【図24】cMet-HG (レーン1) 、cMet-HGおよびIVIG (レーン2) 、cMet-HGおよびHGF (レーン3) 、cMet-HG、IVIG、およびHGF (レーン4) 、cMet-IgG1 (レーン5) 、cMet-IgG1およびIVIG (レーン6) 、と共にインキュベートしたA549細胞から調製した抽出物を、4~20% Tris-HCl Criterion Precastゲル上でSDS-PAGEおよびニトロセルロースメンブレン

10

20

30

40

50

上でのウェスタンプロットによって分離した。このメンブレンを、抗ホスホ-Met (pYpYpY 1230 1234 1235) -ウサギIgG (Abcam, ab5662)と共に4℃で一晩インキュベートした。TBSTで洗浄した後、二次抗体、ヤギ抗ウサギHRP, Cell Signalling, 7074を含むブロッキング試薬を、ローラーバンクにおいて室温で60分間インキュベートした。このメンブレンをTBSTで6回洗浄した。最後に、Luminol Enhancerストップソリューションを用いてバンドを現像し、Lumiimagerで分析した。ウェスタンプロットは、ホスホ-Met (pYpYpY 1230 1234 1235)を示す169Kdのバンドを示している。

【図25】インビトロHIV-1中和アッセイへのHuMax-CD4またはHuMax-CD4のFabフラグメントの添加の開始濃度を示す。HuMax-CD4またはHuMax-CD4のFabフラグメントによる阻害のIC₅₀値は、4パラメータロジスティック曲線フィット法により算出し、各ウイルス構築物について示されている。
10

【図26】HuMax-CD4、IgG対照を用いた腹腔内処置または未処置、およびHIV-1に感染させた個々のPBMC再構成マウスのヒトT細胞の割合(%)、マウス細胞の割合(%)、ならびにCD4およびCD8細胞の割合(%)、ならびにCD4/CD8比を示す。

【図27】ルシフェラーゼ活性により測定した、CD4-CCR5またはCD4-CXCR4陽性細胞の様々なHIV-1株の感染のHuMax-CD4またはHuMax-CD4のFabフラグメントによる阻害曲線(三つ組測定値の平均)を示す。

【図28】HuMax-CD4を用いた腹腔内処置、または未処置、およびHIV-1を感染させた個々のPBMC再構成マウスの時間内の血漿HuMax-CD4濃度を示す。

【図29】HuMax-CD4、IgG対照を用いた腹腔内処置または未処置、およびHIV-1を感染させた個々のPBMC再構成マウスの時間内の測定されたHIV-1 RNAコピー数を示す。
20

【図30】非共有結合性ナノエレクトロスプレイ質量分析(non-covalent nano-electrospray mass spectrometry)を用いて試験した、各々のHG変異体の単量体として存在する分子の割合を示す。HG変異体サンプルは、水性の50 mM酢酸アンモニウム溶液中で1 μMの濃度に調製された。

【図31】2F8-HG(WT)およびR277K HG変異对照と比較した、CH3変異体のNativePAGE™ Novex(登録商標)ビストリスゲル電気泳動を示す。

【図32】2F8-HGならびにCH3変異体2F8-HG-T234Aおよび2F8-HG-L236Vの結合は、ポリクローナルヒトIgGの存在下および非存在下のEGFR ELISAで試験された。

【図33】2F8-HGおよびCH3変異体2F8-HG-L236Aおよび2F8-HG-Y275Aの結合は、ポリクローナルヒトIgGの存在下および非存在下のEGFR ELISAで試験された。
30

【図34】抗EGFr2F8-HG(WT)およびそのCH3変異体による、A431細胞におけるEGF-誘導性EGFrリン酸化の阻害を示す用量反応曲線を示す。

【図35】2F8-HG(WT)およびR277Kと比較した、様々なモル濃度で単量体として存在するCH3変異体の分子の割合を示す。表は図に示す曲線に基づいて、各々のCH3変異体および2F8-HG(WT)について計算された、単量体から二量体への転換のEC₅₀値を示す。

【図36】本発明に従う重鎖トランスジーンの一つの可能な態様の模式図を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0037】

配列表の詳細な説明

SEQ ID NO: 1 : ヒトIgのC_Lカッパの核酸配列
40

SEQ ID NO: 2 : ヒトIgのカッパ軽鎖のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 3 : ヒトIgのC_Lラムダの核酸配列

SEQ ID NO: 4 : ヒトIgのラムダ軽鎖のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 5 : HuMab-7D8のV_H領域の核酸配列

SEQ ID NO: 6 : HuMab-7D8のV_H領域のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 7 : マウス抗Betv-1のV_H領域の核酸配列

SEQ ID NO: 8 : マウス抗Betv-1のV_H領域のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 9 : HuMab-7D8のV_L領域の核酸配列

SEQ ID NO: 10 : HuMab-7D8のV_L領域のアミノ酸配列
50

SEQ ID NO: 11 : マウス抗Betv1のV_L領域の核酸配列

SEQ ID NO: 12 : マウス抗Betv1のV_L領域のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 13 : ヒトIgG4の野生型C_H領域の核酸配列

SEQ ID NO: 14 : ヒトIgG4の野生型CH領域のアミノ酸配列。イタリック体で示された配列はCH1領域、ハイライトされた配列はヒンジ領域、通常の配列はCH2領域、および下線のついた配列はCH3領域を示す。

SEQ ID NO: 15 : 714位および722位の変異したヒトIgG4 (SEQ ID NO: 13) のCH領域の核酸配列

SEQ ID NO: 16 : ヒトIgG4のヒンジのないCH領域のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 17 : ヒト定常ラムダ鎖のアミノ酸配列 (アクセッション番号S25751)

10

SEQ ID NO: 18 : ヒト定常カッパ鎖のアミノ酸配列 (アクセッション番号P01834)

SEQ ID NO: 19 : IgG1定常領域のアミノ酸配列 (アクセッション番号P01857)。イタリック体で示された配列はCH1領域、ハイライトされた配列はヒンジ領域、通常の配列はCH2領域、および下線のついた配列はCH3領域を示す。

SEQ ID NO: 20 : IgG2定常領域のアミノ酸配列 (アクセッション番号P01859)。イタリック体で示す配列はCH1領域、ハイライトされた配列はヒンジ領域、通常の配列はCH2領域、および下線のついた配列はCH3領域を示す。

SEQ ID NO: 21 : IgG3定常領域のアミノ酸配列 (アクセッション番号A23511)。イタリック体で示す配列はCH1領域、ハイライトされた配列はヒンジ領域、通常の配列はCH2領域、および下線のついた配列はCH3領域を示す。

20

SEQ ID NO: 22から53 : DNA構築物の調製に使用されたオリゴヌクレオチドプライマーを示す。

SEQ ID NO: 54 : ヒンジのないIgG4のペプチド

SEQ ID NO: 55 : IgG4の定常領域の一部

SEQ ID NO: 56 : ヒンジのないIgG4の定常領域の一部

【発明を実施するための形態】

【0038】

発明の詳細な説明

本明細書中で言及される「抗体」という用語には、抗体分子全体、抗原結合フラグメント、一価抗体、およびそれらの単鎖が含まれる。抗体分子は、免疫グロブリンと呼ばれる血漿タンパク質のファミリーに属し、その基本的な構成単位、免疫グロブリンフォールドまたはドメインは、多くの免疫系およびその他の生物学的認識系の分子において様々な形で使用されている。ネイティブの抗体および免疫グロブリンは通常、二つの同一の軽(L)鎖および二つの同一の重(H)鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各々の軽鎖は、一つの共有結合性ジスルフィド結合によって重鎖に連結されているが、ジスルフィド結合の数は様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖によつて異なる。各々の重鎖および軽鎖はまた、一定間隔の鎖間ジスルフィド架橋を有し得る。各々の軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書中ではV_Lと省略する)および軽鎖定常領域(本明細書中ではC_Lと省略する)から構成される。各々の重鎖は、重鎖可変領域(V_H)ならびにC_H1、C_H2、およびC_H3の三つのドメインからなる重鎖定常領域(C_H)、ならびにヒンジ領域から構成される。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一定常ドメイン(C_H1)と整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列して、「Fabフラグメント」として公知の構造を形成する。重鎖のC_H1およびC_H2は、いわゆるヒンジ領域によって相互に隔てられており、これによって、抗体分子の「腕部」であるFabが一定範囲でスイングできる。ヒンジ領域は通常、一つまたは複数のシステイン残基を含み、これが抗体分子におけるもう一方の重鎖のヒンジ領域のシステイン残基とジスルフィド結合を形成し得る。

30

【0039】

重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞(例えばエフェクター細胞)および古典的補体系の第一成分(C1q)を含む宿主の組織または因子の結合を媒介し得る。

40

50

【0040】

免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには少なくとも5つの大クラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのうちのいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4；IgA1およびIgA2に分類され得る。異なる免疫グロブリンクラスに対応する重鎖定常ドメインの遺伝子は、それぞれ、アルファ（ α ）、デルタ（ δ ）、イプシロン（ ϵ ）、ガンマ（ γ ）、およびミューム（ μ ）と呼ばれる。免疫グロブリンのサブクラスは、異なる遺伝子、例えば1、2、3、および4によってコードされる。抗体軽鎖の遺伝子は、それらの定常ドメインのアミノ配列に基づき、二つの明確に異なるタイプ、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）のうちの一方に割り当てられる。異なる免疫グロブリンクラスのサブユニット構造および三次元配座は周知である。ヒト集団には、異なる免疫グロブリンのアロタイプ、例えばIgG1重鎖についてはG1m(a)、G1m(x)、G1m(f)、およびG1m(z)、ならびにカッパ軽鎖についてはKm1、Km1,2、およびKm3が存在する。これらのアロタイプは、定常領域をコードする領域のアミノ酸が相違する。

10

【0041】

本明細書中で使用する場合、「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列によってはコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでの無作為変異誘発もしくは部位特異的変異誘発またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異）を含み得る。しかし、本明細書中で使用する場合、「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳動物種、例えばマウスの生殖細胞由来のCDR1もしくはCDR2配列、または別の種、例えばマウス由来の抗体由来のCDR3領域がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むことを意図しない。

20

【0042】

本明細書中で使用する場合、「 K_D 」（M）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を意味する。

【0043】

本明細書中で使用する場合、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一の分子組成の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。従って、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する、単一の結合特異性を示す抗体を意味する。

30

【0044】

本明細書中で使用する場合、「核酸」、「核酸構築物」、または「核酸分子」という用語は、DNA分子およびRNA分子を含むことを意図する。核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得る。

【0045】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係下におかれた場合、「機能的に連結」されている。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列の転写に影響を及ぼす場合、その配列に機能的に連結されている。スイッチ配列については、機能的に連結されるとは、その配列がスイッチ組換えを行うことができることを指す。

40

【0046】

「生理学的条件」という場合、それはインビボ、生物内、またはインビボ条件を完全にもしくは部分的に模倣することによって再現されたインビボ条件、例えば血液と等価な浸透圧値を有する水溶液に存在する条件を意味する。

【0047】

本明細書中で使用する場合、「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離された全てのヒト抗体、例えば（a）ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたはトランスクロモソーマルな動物（例えばマウス）またはその動物から調製されたハイブリドーマから単離された抗体、（b）抗体を発現す

50

るよう形質転換された宿主細胞から、例えばトランスフェクトーマから単離された抗体、(c) 組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、および(d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段により調製、発現、作製、または単離された抗体を含む。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列由来の可変領域および定常領域を有する。このような組み換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発(またはヒトIg配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合は、インビボ細胞変異誘発)に供され得るので、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞のV_HおよびV_L配列に由来し関連するにもかかわらず、インビボのヒト抗体生殖細胞レパートリーの中に本来的に存在しない可能性もある。

10

【0048】

本明細書中で使用する場合、「特異的な結合」は、所定の抗原に対する抗体またはその抗原結合フラグメントの結合を意味する。典型的には、抗体は、例えばBIAcoreにおいてスルホンプラズモン共鳴を用いてまたはFACSもしくはELISAにおけるIC₅₀値に基づく見かけ上の親和性として測定した場合、約10⁻⁷Mもしくはそれ未満、例えば約10⁻⁸Mもしくはそれ未満、例えば約10⁻⁹Mもしくはそれ未満、約10⁻¹⁰Mもしくはそれ未満、または約10⁻¹¹Mもしくはそれ未満のK_Dに対応する親和性で結合し、かつ非特異的抗原(例えばBSA、カゼイン)または所定の抗原もしくは関係の近い抗原以外の抗原に対する結合の親和性よりも、少なくとも10倍低い、例えば少なくとも100倍低い、例えば少なくとも1000倍低い、例えば少なくとも10,000倍低い、例えば少なくとも100,000倍低いK_Dに対応する親和性で所定の抗原に結合する。親和性が低くなる量は、抗原結合ペプチドのK_Dに依存し、したがって抗原結合ペプチドのK_Dが非常に低い(すなわち、その抗原結合ペプチドが極めて特異的である)場合、その抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも低い量は、少なくとも10,000倍であり得る。

20

【0049】

「非ヒトトランスジェニック動物」という用語は、一つまたは複数のヒト重鎖および/または軽鎖の導入遺伝子または導入染色体(transchromosome)を含むゲノムを有し、かつヒト抗体を発現できる非ヒト動物を意味する。例えば、トランスジェニックマウスは、ヒト軽鎖導入遺伝子およびヒト重鎖導入遺伝子またはヒト重鎖導入染色体のいずれかを有するため、抗原および/または抗原を発現する細胞で免疫した場合にヒト抗体を産生し得る。ヒト重鎖導入遺伝子は、トランスジェニックマウス、例えばHuMAb(商標)マウス、例えばHCo7またはHCo12マウスの場合のように、そのマウスの染色体DNAに組み込まれているか、またはヒト重鎖導入遺伝子は、WO 02/43478に記載されるようなトランスクロモソーマルKM-Mouse(商標)の場合のように、染色体外で維持され得る。このようなトランスジェニックおよびトランスクロモソーマルマウスは、V-D-J組換えおよびアイソタイプスイッチを行うことによって、選択された抗原に結合する複数のアイソタイプのヒト一価抗体(例えば、IgG、IgA、および/またはIgE)を産生することができる。

30

【0050】

KM-Mouse(商標)はヒト重鎖導入染色体およびヒトカッパ軽鎖トランスジーンを含む。KM-Mouse(商標)では内因性のマウス重鎖および軽鎖遺伝子も破壊されており、マウスを免疫するとマウスの免疫グロブリンではなくヒトの免疫グロブリンが産生する。

40

【0051】

HuMAbマウスは、内因性μおよび鎖遺伝子座を不活化する部位特異的変異と共に、再構成していないヒト重鎖(μおよび)および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ遺伝子座を含む(Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859)。したがって、このマウスではマウスIgMまたは鎖の発現は低下しており、免疫処置に応答して誘導されたヒト重鎖および軽鎖トランスジーンはクラススイッチおよび体細胞変異を起こし、高親和性のヒトIgGモノクローナル抗体を生成する(Lonberg, N. et al. (1994), 上記; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101に総説; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol.

50

I. Vol. 13:65-93、およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536-546)。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tullion et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:65-93; Harding F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536-546; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に詳しく記述されている。さらに、すべてLonberg and Kayに付与されたUS No. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; および5,770,429; ならびにSurani et al.に付与されたUS 5,545,807; WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918およびWO 01/09187を参照されたい。
10

【0052】

カッパ軽鎖を含む完全ヒト型抗体を產生する能力のあるトランスジェニックマウスを含むXenoMouse(商標)技術は、US5,939,598に記述されている。AbgenixはWO2003047336(参考により本明細書に組み入れられる)において、そのXenoMouse(商標)技術のさらなるバージョンを提示し、これはカッパ軽鎖の遺伝子座に加えて一つまたは複数のヒトラムダ軽鎖遺伝子座を有するトランスジェニック動物に関する。これらのトランスジェニック動物は、V、J、および定常領域遺伝子を含む実質的に完全なヒト型ラムダ軽鎖遺伝子座、またはヒト型ラムダ軽鎖遺伝子座の少なくとも500 kbを含むヒト型ラムダ軽鎖遺伝子座の一部を含む。
20

【0053】

トランスジェニック動物を作製するためのさらなる方法は、Animal Transgenesis and Cloning (2003) Louise-Marie Houdebine. John Wiley & Sons, Ltd., およびWO2/12437に記述されている。

【0054】

「抗体価」という用語は、その抗体が反応できる抗原決定基の最大数を意味する。例えば、IgG抗体は、二つのFab領域を含み、二つの抗原分子または同一粒子上の二つの部位に結合することができるので、二価を有する。
30

【0055】

「一価抗体」という用語は、本発明の文脈においては、抗体分子が最大限で一つのFab領域を含み、通常は単一の抗原分子のみと結合できる、従って抗原の架橋ができないことを意味する。

【0056】

本明細書中で使用する場合、「ベクター」という用語は、それに連結された別の核酸を輸送しその複製を誘導することのできる核酸分子を意味することが意図される。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは環状の二本鎖DNAループでありその中に追加のDNAセグメントがライゲーションされ得る。別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、追加のDNAまたはRNAセグメントはウイルスゲノムにライゲーションされ得る。一部のベクターは、導入された宿主細胞内で自律複製を行うことができる(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム型哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム型哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、それによって宿主のゲノムと一緒に複製される。さらに、一部のベクターは、それらに機能的に連結された遺伝子の発現を誘導することができる。このようなベクターは、本明細書中では、「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」と称される。一般的に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターの多くはプラスミド形式のものである。プラスミドは最も一般的に使用されているベクター形式であるため、本明細書においては、「プラスミド」および「ベクター」は互換的に使用され得る。しかし、本発明は、等価な機能を發揮するウイルスベクター(例えば、複製欠損型レトロウ
40

イルス、アデノウイルス、およびアデノ隨伴ウイルス)等の他の発現ベクター形式を含むことが意図される。

【0057】

免疫グロブリンには5つの異なるクラス、すなわちIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEが存在し、これらのクラスはそれらのC領域によって区別され得る。

【0058】

IgGクラスの抗体の中には、いくつかのサブクラス、すなわちヒトにおいてはIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4が存在する (Jefferis, R. 1990. Molecular structure of human IgG subclasses. In The human IgG subclasses. F. Shakib, ed. Pergamon Press, Oxford, p.15)。各々のIgG重鎖は、異なる遺伝子セグメントまたはエクソンによりコードされる、構造上関連するペプチド配列(すなわち、可変領域ドメインおよび定常領域ドメイン)から構成される。CH1ドメインとCH2ドメインをつなぐヒンジ領域は、別のエクソンによりコードされる。4つのIgGサブクラスの重鎖の各々は、カッパまたはラムダのいずれかの軽鎖と共に発現されて、二つの同一の重鎖および二つの同一のカッパまたはラムダ軽鎖から構成される本質的に対称性の分子を形成し得る。重鎖間の比較は、CH1、CH2、およびCH3の相同領域を規定する。4つのサブクラスの各々の相同領域間の比較は>95%の配列同一性を示す (Jefferis, R. 1990. F. Shakib, ed. Pergamon Press, Oxford, p.15)。CH1ドメインとCH2ドメインの間の配列は、分子の屈曲性を実現することから、ヒンジ領域と称される。CH3ドメインは対を形成し、その非共有結合性相互作用は、そのIgG分子が、穏やかな条件下での重鎖間ジスルフィド架橋の還元後においてもその構造上の完全性を維持するのに十分なものである。CH3ドメインの対はコンパクトでありかつ二つのドメインの間でほぼ正確なダイアド(dyad)が形成される点でFabにおける対と似ている (Saphire, et al., 2002. J Mol Biol 319: 9)。これは、緊密に結合せず、それらの接触が主としてAsn297残基に付着する二つの糖鎖により媒介されるCH2ドメインと対照的である (Saphire, et al., 2002. J Mol Biol 319: 9)。

【0059】

このように、二つの重鎖-軽鎖ヘテロ二量体が連結された特徴的なIgGの構造は、ヒンジ領域の重鎖間ジスルフィド架橋およびCH3ドメインの非共有結合性相互作用によって維持されている。

【0060】

CH3領域における相互作用は、IgG1において重要であることが示されている。一つのみの軽鎖および一つのみの重鎖からなる二量体構成を有するIg半分子は、ヒトおよびマウスのプラスマ細胞腫における稀な欠失の結果として記載されている。髄外軟部組織プラスマ細胞腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、形質細胞性白血病、および多発性骨髄腫に罹患した一部の患者は、尿中にIgG半分子を排出する。半分子はまた、その血清中にも存在することが見出された。これらの半分子の生化学的性質の研究は、これらが、重鎖C_H1、ヒンジ、およびC_H2領域は正常のようであるが、C_H3領域に欠失が見られるIgG1分子からなることを示した。

【0061】

本発明者らは、本願において、IgG4のヒンジ領域を除去することにより、二つの重鎖-軽鎖ヘテロ二量体間の連結が失われているかまたは弱まつた、一価抗体が生成されることを示す。従って、他のIgGサブクラスのヒンジ領域のジスルフィド架橋を単独でまたはCH3ドメインの相互作用における変異と組み合わせて変化させることで、これらの他のサブクラスについても一価抗体が形成され得る。

【0062】

本発明の非ヒトトランスジェニック動物によって產生される一価ヒト抗体は、インビボにおいて長い半減期を持つために、これにより、例えばインビボで相当短い半減期を持つ同じ抗体のFabフラグメントと比較して、より長い治療域を持つという利点がある。

【0063】

これらの抗体は、抗原を介する活性の阻止のために一価抗体の結合(架橋を欠く)を必

10

20

30

40

50

要とする治療用途に適している。

【0064】

第一の主な局面では、本発明は抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価抗体を産生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物に関し、一価抗体は以下を含む重鎖を含む：

(i) ヒトV_H領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域、および任意でC_H領域の他の領域、例えばC_H3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_H領域とのジスルフィド結合、または同一のC_H領域との他の共有結合性もしくは安定な非共有結合性の重鎖間結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変されている、ヒトC_H領域。 10

【0065】

C_H3領域のようなC_H領域の他の領域の任意の改変は、C_H領域が非IgG4アイソタイプ、例えば、IgG1、IgG2、またはIgG3アイソタイプである場合に最も意味がある。というのは、これらの他のアイソタイプにおいては、ヒンジ領域にシステインがない場合でも、重鎖間結合、特に非共有結合性結合が、抗体を二価の形に保持し得るためである。

【0066】

本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物は、ヒトまたは動物に対する実質的な医学的恩恵なしに苦痛を与える可能性のあるように改変されていない。

【0067】

一つの態様では、本発明の非ヒトトランスジェニック動物は、以下を含む軽鎖をさらに含む、一価抗体を産生する能力がある： 20

(i) ヒトV_L領域、および

(ii) ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_L領域とのジスルフィド結合または同一のC_L領域との他の共有結合を形成する能力のあるアミノ酸を全く含まないように任意で改変された、ヒトC_L領域。

【0068】

C_L領域の任意の改変は、C_H領域がIgG1アイソタイプである場合に最も意味がある。というのは、IgG1においては、ヒンジ領域にシステインがない場合でも、軽鎖の自由なシステイン残基が、抗体を二価の形に保持し得るためである。

【0069】

さらなる主な局面では、非ヒトトランスジェニック動物はそのゲノム中に、 30

(i) 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、

(ii) ヒトμC_H遺伝子および少なくとも一つの改変されたC_H遺伝子を含む、複数のヒトC_H遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列、

が機能的に連結された重鎖トランスジーンを含み、

ここで、トランスジーンは、動物のリンパ球において生産的(productive) VDJ再構成およびアイソタイプスイッチを行う(本明細書において上記の「改変された」というのはヒンジおよび上記に本発明の第一の主な局面で定義された任意の他のC_H改変を指す)。

【0070】

またさらなる態様では、非ヒトトランスジェニック動物は、 40

(i) 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

(ii) 特にC_H領域がIgG1アイソタイプである場合に、上記に定義された改変を任意で含むヒトC_L遺伝子

を含む軽鎖トランスジーンを含む。

【0071】

またさらなる態様では、非ヒトトランスジェニック動物は

(i) 複数のヒトV遺伝子、少なくとも一つのヒトJ遺伝子、および

(ii) 特にC_H領域がIgG1アイソタイプである場合に、上記に定義された改変を任意で含む少なくとも一つのヒトC_L遺伝子

を含む軽鎖トランスジーンを含む。 50

【0072】

さらなる主な局面では、本発明は、抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価 IgG4抗体を產生する能力のある非ヒトransジェニック動物に関し、一価抗体は、

- 以下を含む重鎖

(i) ヒトV_H領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一のC_H領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変されている、ヒトC_H領域、ならびに

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒトV_L領域、および

(ii) ヒトC_L領域

を含む。

【0073】

その一つの態様では、動物はそのゲノム中に

- (i) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

- ヒトμC_H遺伝子および少なくとも一つのヒンジ改変C₄遺伝子を含む複数のヒトC_H遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列

を含む重鎖トランスジーン、ならびに

- (iia) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

- ヒトC_L遺伝子、

を含む軽鎖トランスジーン、および／または

- (iib) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、少なくとも一つのヒトJ遺伝子、および

- 少なくとも一つのヒトC_L遺伝子

を含む軽鎖トランスジーン

を含み、ここで、トランスジーンは、動物のリンパ球において生産的V(D)J再構成およびアイソタイプスイッチを行う。

【0074】

さらなる主な局面では、本発明は、抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価 IgG4抗体を產生する能力のある非ヒトtransジェニック動物に関し、一価抗体は、

- 以下を含む重鎖

(i) ヒトV_H領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一のC_H領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、かつC_H3領域がSEQ ID NO: 16に示される配列を有するが、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、ヒトC_H領域：234位のThr (T) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；277位のArg (R) がAla (A) により置換されている、

ならびに

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒトV_L領域、および

(ii) ヒトC_L領域

を含む。

【0075】

その一つの態様では、動物はそのゲノム中に

- (i) 機能的に連結された

10

20

30

40

50

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および
- ヒト μC_H 遺伝子および少なくとも一つの改変C₄遺伝子を含む、複数のヒトC_H遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列を含む重鎖トランスジーン、ならびに

(iia) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

- ヒトC_L遺伝子、

を含む軽鎖トランスジーン、および／または

(iib) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、少なくとも一つのヒトJ遺伝子、および

- 少なくとも一つのヒトC_L遺伝子

を含む軽鎖トランスジーン

を含み、ここで、トランスジーンは、動物のリンパ球において生産的V(D)J再構成およびアイソタイプスイッチを行う。

【0076】

さらなる主な局面では、本発明は、抗原刺激を受けると選択された抗原に結合する一価IgG1抗体を產生する能力のある非ヒトトランスジェニック動物に関し、一価抗体は、以下を含む重鎖

(i) ヒトV_H領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域およびC_H3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_H領域とのジスルフィド結合、または同一のC_H領域との他の共有結合性もしくは安定な非共有結合性の重鎖間結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変されている、ヒトC_H領域、

ならびに、以下を含む軽鎖

(i) ヒトV_L領域、および

(ii) ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_L領域とのジスルフィド結合または同一のC_L領域との他の共有結合を形成する能力のあるアミノ酸を全く含まないように改変されている、ヒトC_L領域を含む。

【0077】

その一つの態様では、動物はそのゲノム中に

(i) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

- ヒト μC_H 遺伝子および少なくとも一つの改変C₁遺伝子を含む複数のヒトC_H遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列

を含む重鎖トランスジーン、ならびに

(iia) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、および

- 改変ヒトC_L遺伝子、

を含む軽鎖トランスジーン、および／または

(iib) 機能的に連結された

- 複数のヒトV遺伝子、少なくとも一つのヒトJ遺伝子、および

- 少なくとも一つの改変ヒトC_L遺伝子

を含む軽鎖トランスジーン

を含み、ここで、トランスジーンは、動物のリンパ球において生産的V(D)J再構成およびアイソタイプスイッチを行う。

【0078】

そのさらなる態様では、動物はさらに、本明細書に定義されるIgG4一価抗体を产生する能力を持つ。

【0079】

10

20

30

40

50

本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物の別の態様では、内在性の動物免疫グロブリン重鎖遺伝子座は不活性化されている。代わりに、または加えて、内在性の動物免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座、および / または内在性の動物免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座は不活性化されている。

【 0 0 8 0 】

本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物の別の態様では、ヒト C_H 遺伝子は、天然に存在するヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座よりもヒト μC_H 遺伝子の近くにある。

【 0 0 8 1 】

本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物の一つの態様では、重鎖トランスジーンは SEQ ID NO: 19 に示される C_{H3} 領域を含む IgG1 アイソタイプの C_H 領域をコードするが、 C_{H3} 領域は、以下の一つまたは複数のアミノ酸置換が行われるように改変されている：238位の Arg (R) が Gln (Q) により置換されている；239位の Asp (D) が Glu (E) により置換されている；249位の Thr (T) が Ala (A) により置換されている；251位の Leu (L) が Ala (A) により置換されている；251位の Leu (L) が Val (V) により置換されている；288位の Phe (F) が Ala (A) により置換されている；288位の Phe (F) が Leu (L) により置換されている；290位の Tyr (Y) が Ala (A) により置換されている；292位の Lys (K) が Arg (R) により置換されている；292位の Lys (K) が Ala (A) により置換されている；302位の Gln (Q) が Glu (E) により置換されている；および 328位の Pro (P) が Leu (L) により置換されている。

【 0 0 8 2 】

そのさらなる態様では、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われている：238位の Arg (R) が Gln (Q) により置換されている；239位の Asp (D) が Glu (E) により置換されている；292位の Lys (K) が Arg (R) により置換されている；302位の Gln (Q) が Glu (E) により置換されている；および 328位の Pro (P) が Leu (L) により置換されている。

【 0 0 8 3 】

そのまたさらなる態様では、

- (i) 238位の Arg (R) が Gln (Q) により置換されているか、
- (ii) 238位の Arg (R) が Gln (Q) により置換され、かつ 328位の Pro (P) が Leu (L) により置換されているか、または
- (iii) 上述の 9つのアミノ酸全てが置換されている。

【 0 0 8 4 】

さらに別の態様では、重鎖トランスジーンはさらに SEQ ID NO: 19 に示される C_{H1} および / または C_{H2} 領域をコードする。

【 0 0 8 5 】

さらに別の態様では、軽鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 18 に示されるアミノ酸配列を有するカッパ C_L 領域をコードするが、配列は、106位の末端システイン残基が別のアミノ酸残基で置換されるか欠失するように改変されている。

【 0 0 8 6 】

別のさらなる態様では、軽鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 17 に示されるアミノ酸配列を有するラムダ C_L をコードするが、配列は、104位のシステイン残基が別のアミノ酸残基で置換されるか欠失するように改変されている。

【 0 0 8 7 】

さらにまた異なる態様では、重鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 19 に示される C_{H1} 領域をさらにコードするが、 C_{H1} 領域は、14位の Ser (S) がシステイン残基により置換されるように改変されている。

【 0 0 8 8 】

本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物の一つの態様では、重鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 20 に示される C_{H3} 領域を含む IgG2 アイソタイプの C_H 領域をコードするが、 C_{H3} 領域は、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている：234位の Arg (R) が Gln (Q) により置換されている；245位の Thr (T) が Ala (A) により置換さ

10

20

30

40

50

れている；247位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；247位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；276位のMet (M) がVal (V) により置換されている；284位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；284位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；286位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；288位のLys (K) がArg (R) により置換されている；288位のLys (K) がAla (A) により置換されている；298位のGln (Q) がGlu (E) により置換されている；および324位のPro (P) がLeu (L) により置換されている。

【 0 0 8 9 】

そのさらなる態様では、重鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 20に示されるC_H1および/またはC_H2領域をさらにコードする。

10

【 0 0 9 0 】

本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物の一つの態様では、重鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 21に示されるC_H3領域を含むIgG3アイソタイプのC_H領域をコードするが、C_H3領域は、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている：285位のArg (R) がGln (Q) により置換されている；296位のThr (T) がAla (A) により置換されている；298位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；298位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；314位のSer (S) がAsn (N) により置換されている；322位のAsn (N) がLys (K) により置換されている；327位のMet (M) がVal (V) により置換されている；335位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；335位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；337位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；339位のLys (K) がArg (R) により置換されている；339位のLys (K) がAla (A) により置換されている；349位のGln (Q) がGlu (E) により置換されている；352位のIle (I) がVal (V) により置換されている；365位のArg (R) がHis (H) により置換されている；366位のPhe (F) がTyr (Y) により置換されている；および375位のPro (P) がLeu (L) により置換されている。

20

【 0 0 9 1 】

そのさらなる態様では、重鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 21に示されるC_H1および/またはC_H2領域をさらにコードする。

【 0 0 9 2 】

ヒンジ領域は、重鎖の定常ドメインのC_H1領域とC_H2領域の間に位置する抗体の領域である。ヒンジ領域の規模は、ヒンジ領域をコードする別個のエクソンによって決定される。ヒンジ領域は通常、一方の重鎖のヒンジ領域の一つまたは複数のシステイン残基ともう一方の重鎖のヒンジ領域の一つまたは複数のシステイン残基の間のジスルフィド結合または架橋の形成を通じて、抗体の4本のペプチド鎖を伝統的な四量体形態に正確に配置するのに関与する。従って、ヒンジ領域のあらゆるアミノ酸残基がジスルフィド結合の形成に関与できないようにするヒンジ領域の改変は、例えば、非改変型ヒンジ領域に存在するシステイン残基の欠失および/または置換を含み得る。本明細書の目的上、ヒンジ領域に対応する領域は、抗体の重鎖のC_H1領域とC_H2領域の間の領域を意味するものと解釈されるべきである。本発明の文脈において、このような領域はアミノ酸残基を全く含まず（ヒンジ領域の欠失に相当）、結果的にC_H1領域とC_H2領域がいかなるアミノ酸残基も介在させずに相互に接続される場合もある。このような領域はまた、一つのみまたは数個のアミノ酸残基しか含まない場合もあり、これらの残基は、本来のヒンジ領域のN末端またはC末端に存在するアミノ酸残基であるとは限らない。

30

【 0 0 9 3 】

上述の任意の非ヒトトランスジェニック動物のさらなる態様において、重鎖トランスジーンは、C_H領域のヒンジ領域に対応する領域がシステイン残基を全く含まないように改変されたC_H領域をコードする。

40

【 0 0 9 4 】

別の態様では、重鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 14のC_H配列のアミノ酸106および109に対応するアミノ酸が欠失するように改変されているC_H領域をコードする。

50

【0095】

別の態様では、重鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 14のC_H配列のアミノ酸106および109に対応するアミノ酸残基の一つがシスティン以外のアミノ酸残基で置換され、SEQ ID NO: 14の配列のアミノ酸残基106および109に対応する他方のアミノ酸残基が欠失するように改変されているC_H領域をコードする。

【0096】

別の態様では、重鎖トランスジーンは、アミノ酸残基106に対応するアミノ酸残基がシスティン以外のアミノ酸残基で置換され、アミノ酸残基109に対応するアミノ酸残基が欠失するように改変されているC_H領域をコードする。

【0097】

別の態様では、重鎖トランスジーンは、アミノ酸残基106に対応するアミノ酸残基が欠失し、アミノ酸残基109に対応するアミノ酸残基がシスティン以外のアミノ酸残基で置換されるように改変されているC_H領域をコードする。

【0098】

別の態様では、重鎖トランスジーンは、少なくともSEQ ID NO: 14のC_H配列のアミノ酸残基106から109に対応するアミノ酸残基が欠失するように改変されているC_H領域をコードする。

【0099】

別の態様では、重鎖トランスジーンは、少なくともSEQ ID NO: 14の配列のアミノ酸残基99から110に対応するアミノ酸残基が欠失するように改変されているC_H領域をコードする。

10

20

【0100】

別の態様では、重鎖トランスジーンは、SEQ ID NO: 16に示されるC_H領域をコードする。

【0101】

別の態様では、重鎖トランスジーンは、ヒンジ領域全体が欠失するように改変されているC_H領域をコードする。

【0102】

本発明の異なる態様では、トランスジェニック動物はヒトC 4遺伝子を含まない。

【0103】

本発明の別の態様では、トランスジェニック動物は、ヒンジ領域をコードする配列が欠失するように改変されたヒトC 4遺伝子を含まない。

30

【0104】

本発明のさらなる態様では、動物は、10⁻⁷ Mまたはそれ以下、例えば10⁻⁸ M、10⁻⁹ M、10⁻¹⁰ M、または10⁻¹¹ Mもしくはそれ以下の解離定数 (k_d) で、選択された抗原、例えばc-Metと結合する一価抗体を産生する能力がある。

【0105】

一つの態様では、本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物は、ラクダ科の動物、例えばラマもしくはラクダ、または齧歯類の動物、例えばマウス、ウサギ、モルモット、もしくはラットのような、哺乳動物である。

40

【0106】

例えば、一つの態様では、動物は、C57BL/6J、CBA/J、DBA/2J、129/sv、またはSJL/J系統に由来するマウスのような、マウスである。

【0107】

さらなる主な局面において、本発明は以下を含む重鎖トランスジーンに関する：

- (i) 複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、
- (ii) ヒト C_H遺伝子が、天然に存在するヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座よりもヒト μ C_H遺伝子の近くにある、ヒト μ C_H遺伝子および少なくとも一つの改変 C_H遺伝子を含む、複数のヒト C_H遺伝子および関連アイソタイプスイッチ配列。

【0108】

50

本発明のトランスジーンの態様の非限定的な例は、図36に模式的に示されている。

【0109】

本発明に従うトランスジーンを含むDNA構築物は、確立された標準的な方法、例えば、Beaucage et al., Tetrahedron Lett. 22, 1859-1869 (1981)により記述されたホスホアミジン法、またはMatthes et al., EMBO J. 3, 801-805 (1984)により記述された方法によって合成して調製できる。ホスホアミジン法に従うと、例えば自動DNA合成装置によりオリゴスクレオチドが合成され、精製され、アニーリングされ、連結され、および適当なベクターにクローニングされる。

【0110】

コードしているDNA配列は、ゲノムまたはcDNAを起源とする可能性もあり、例えば、ゲノムまたはcDNAライブラリーを調製し、標準的な技術に従って合成オリゴスクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションにより抗体の全体または一部をコードするDNA配列をスクリーニングすることにより得られる（参考、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989）。DNA配列は、特異的なプライマー、例えばUS 4683202またはSaiki et al. Science 239, 487-491 (1988)に記述されたプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって調製することもできる。

【0111】

別の主な局面では、本発明は以下の工程を含む、選択された抗原に結合する一価抗体の作製方法に関する：

- (i) 選択された抗原、選択された抗原を発現する細胞、もしくは選択された抗原をコードする核酸構築物、またはその組み合せを用いて本発明の動物を免疫する工程、
- (ii) 選択された抗原に結合する一価抗体を発現するトランスジェニック動物からB細胞を得る工程、
- (iii) 任意で、B細胞からハイブリドーマを作製する工程、
- (iv) B細胞またはハイブリドーマにより産生される一価抗体の、選択された抗原に対する結合を試験する工程、および
- (v) 選択された抗原に対して結合する能力のある一つまたは複数の一価抗体を同定する工程。

【0112】

その一つの態様では、方法はさらに以下の工程を含む：

- (vi) 一価抗体のコード配列を同定する工程、および
- (vii) 組み換え発現系において一価抗体を産生する工程。

【0113】

別の態様では、方法は工程 (iii) およびさらに以下の工程を含む：

- (vi) ハイブリドーマから一価抗体を産生および精製する工程。

【0114】

一つの態様では、抗原はヒトタンパク質分子である。その好ましい態様では、抗原は、VEGF、c-Met、CD20、CD38、IL-8、CD25、CD74、FcalphaRI、FcepsilonRI、アセチルコリン受容体、fas、fasL、TRAIL、肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスのエンベロープE2、組織因子、組織因子および第VII因子の複合体、EGFr、CD4、ならびにCD28から選択される。

【0115】

さらなる主な局面では、本発明は一価ヒト抗体の作製のための、本明細書に定義される本発明の非ヒトトランスジェニック動物の使用に関する。

【0116】

さらなる主な局面では、本発明は、上述の方法によって得られたまたは得ることのできる一価抗体に関する。

【0117】

一つの態様では、一価抗体は

- 以下を含む重鎖

10

20

30

40

50

(i) ヒト V_H 領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一の C_H 領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、かつ C_H3 領域がSEQ ID NO: 16に示される配列を有するが、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、ヒト C_H 領域：234位のThr (T) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；277位のArg (R) がAla (A) により置換されている、

ならびに

10

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒト V_L 領域、および

(ii) ヒト C_L 領域

を含む。

【 0 1 1 8 】

別の主な局面では、本発明は、選択された抗原に結合する一価 IgG4 抗体に関し、一価抗体は、

- 以下を含む重鎖

(i) ヒト V_H 領域、および

(ii) ヒンジ領域に対応する領域が、同一の C_H 領域とのジスルフィド結合を形成する能力のあるアミノ酸残基を全く含まないように改変され、および C_H3 領域がSEQ ID NO: 16に示される配列を有するが、一つまたは複数の以下のアミノ酸置換が行われるように改変されている、ヒト C_H 領域：234位のThr (T) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている；236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている；273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている；273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている；275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている；277位のArg (R) がAla (A) により置換されている、

ならびに

20

- 以下を含む軽鎖

(i) ヒト V_L 領域、および

(ii) ヒト C_L 領域

を含む。

【 0 1 1 9 】

この抗体は、本発明の非ヒトトランスジェニック動物から得ることができ、または当技術分野で周知の組み換え発現技術によって作製することができる。

【 0 1 2 0 】

一つの態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含む。

【 0 1 2 1 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、225位のGlu (E) がAla (A) により置換されている。

40

【 0 1 2 2 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、234位のThr (T) がAla (A) により置換されている。

【 0 1 2 3 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、236位のLeu (L) がAla (A) により置換されている。

【 0 1 2 4 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、236位のLeu (L) がVal (V) により置換されている。

【 0 1 2 5 】

50

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、236位のLeu (L)がGlu (E)により置換されている。

【 0 1 2 6 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、236位のLeu (L) がGly (G) により置換されている。

【 0 1 2 7 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、238位のLys (K) がAla (A) により置換されている。

【 0 1 2 8 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、267位のAsp (D)がAla (A)により置換されている。

【 0 1 2 9 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、273位のPhe (F) がAla (A) により置換されている。

【 0 1 3 0 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、273位のPhe (F) がLeu (L) により置換されている。

【 0 1 3 1 】

別の様態では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、273位のPhe (F) がAsp (D) により置換され、かつ / または275位のTyr (Y) がGlu (E) により置換されている。

【 0 1 3 2 】

別の様態では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、273位のPhe (F) がThr (T) により置換され、かつ / または275位のTyr (Y) がGlu (E) により置換されている。

[0 1 3 3]

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH3領域を含むが、275位のTyr (Y) がAla (A) により置換されている。

〔 0 1 3 4 〕

別の様態では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH2領域を含むが、118位のThr (T) がGln (Q) により置換され、かつ / または296位のMet (M) がLeu (L) により置換されている。

【 0 1 3 5 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH2領域を含むが、以下の置換のうち一つ、二つ、または三つ全てが行われている：

120位のMet (M) がTyr (Y) により置換されている；122位のSer (S) がThr (T) により置換されている；および124位のThr (T) がGlu (E) により置換されている。

【 0 1 3 6 】

別の態様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH2領域を含むが、302位のAsn (N) がAla (A) により置換されている。

[0 1 3 7]

別の様では、一価抗体はSEQ ID NO: 16に示されるCH2領域を含むが、302位のAsn (N) がAla (A) により置換され、かつ175位のThr (T) がAla (A) により置換され、かつ248位のGlu (E) がAla (A) により置換されている。

[0 1 3 8]

さらなる態様では、一価抗体は上記の置換を二つまたはそれ以上含む。

[0 1 3 9]

さらなる主な局面では、本発明は

(i) 非ヒト動物の胚幹細胞に、本発明に従う重鎖トランスジーン構築物、および任意で上記に定義される軽鎖を産生する能力のある軽鎖トランスジーンを導入する工程、

- (iii) リンクスジーンを発現する胚幹細胞を選択する工程、
- (iv) 形質転換した胚幹細胞を胚盤胞の内細胞塊に注入する工程、
- (v) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に胚盤胞を移植する工程、
- (vi) 子孫をリンクスジーンの存在について試験する工程、および
- (vii) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合リンクスジェニック系統を作製する工程

を含む、本発明の非ヒトリンクスジェニック動物を作製する方法に関する。

【0140】

さらなる主な局面では、本発明は、

- (i) 受精卵の雄性前核などの、非ヒト動物の受精卵の前核に、本発明のリンクスジーンを含むベクター構築物、および任意で本明細書に定義される軽鎖を产生する能力のある軽鎖リンクスジーンを注入する工程、
- (ii) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に受精卵を移植する工程、
- (iii) 子孫をリンクスジーンの存在について試験する工程、および
- (iv) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合リンクスジェニック系統を作製する工程

を含む、本発明に従う非ヒトリンクスジェニック動物を作製する方法に関する。

【0141】

本発明の非ヒトリンクスジェニック動物を作製する代わりの方法は、さらなる遺伝子改変の開始点として、すでにヒト抗体を产生する能力のあるリンクスジェニック動物、例えばHuMab-Mouse(商標)またはXenomouse(商標)を使用することを含む。これは本発明の非ヒトリンクスジェニック動物を作製するためのより簡便な方法である可能性がある。というのは、ヒト抗体のすべてのコード領域を含むリンクスジーン全体を導入する代わりに、いくつかの態様においては、動物のC_H領域をコードする配列を、本明細書に記述される改変を有するC_H領域をコードする同等なC_L配列によって単に置換することによって実施できる場合があるためである。

【0142】

したがって、さらなる主な局面では、本発明は、

- (i) 既存のリンクスジェニック配列を含んでいるためヒト抗体を产生できる非ヒトリンクスジェニック動物の胚幹細胞に、本明細書に定義される改変を含むC_H領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むリンクスジーン、および任意で、本明細書で上記に定義される改変を含むC_L領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むリンクスジーンを導入する工程であって、

ここで、リンクスジーンは、リンクスジェニック動物ゲノムのゲノム組み込みならびに対応するヒトC_H領域またはそのフラグメントの置換、および任意で、対応するヒトC_L領域またはそのフラグメントの置換が起きると、残っている既存のリンクスジェニック配列に機能的に連結するよう設計されており、それにより動物は本明細書に定義される一価抗体を产生できるようになる工程、

- (ii) 工程(i)で導入されたリンクスジーンを発現する胚幹細胞を選択する工程、
- (iii) 形質転換した胚幹細胞を胚盤胞の内細胞塊に注入する工程、
- (iv) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に胚盤胞を移植する工程、
- (v) 子孫をリンクスジーンの存在について試験する工程、および
- (vi) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合リンクスジェニック系統を作製する工程

を含む、本発明に従う非ヒトリンクスジェニック動物を作製する方法に関する。

【0143】

さらなる主な局面では、本発明は、

- (i) 既存のリンクスジェニック配列を含んでいるためヒト抗体を产生できる非ヒトリンクスジェニック動物の受精卵の前核に、本明細書に定義される改変を含むC_H領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むリンクスジーン、および任意で、本明細書で上記

に定義される改変を含むC_L領域またはそのフラグメントをコードする配列を含むトランスジーンを注入する工程であって、

ここで、トランスジーンは、トランスジェニック動物ゲノムのゲノム組み込みならびに対応するヒトC_H領域またはそのフラグメントの置換、および任意で、対応するヒトC_L領域またはそのフラグメントの置換が起きると、残っている既存のトランスジェニック配列に機能的に連結するよう設計されており、それにより動物は本明細書に定義される一価抗体を産生できるようになる工程、

- (iii) 偽妊娠した非ヒトメス動物の子宮または卵管に受精卵を移植する工程、
(iv) 子孫を工程(i)で導入したトランスジーンの存在について試験する工程、および
(iv) 二つのヘテロ接合の子孫を交配して非ヒト動物のホモ接合トランスジェニック系統を作製する工程

を含む、本発明に従う非ヒトトランスジェニック動物を作製する方法に関する。

【0144】

上記の方法の一つの態様では、工程(i)で提供される非ヒトトランスジェニック動物は、HuMab-Mouse(商標)、KM-Mouse(商標)、TC-Mouse(商標)、またはXenomouse(商標)などのトランスジェニックマウスである。

【0145】

一つの態様では、本発明の非ヒトトランスジェニック動物によって産生される一価抗体は、生理的濃度のポリクローナルヒトIgGの存在下で一価である。

【0146】

本発明は、以下の例によってさらに例証されるが、これらの例はさらなる限定であると解釈されるべきではない。

【0147】

実施例

実施例1

オリゴヌクレオチドプライマーおよびPCR増幅

オリゴヌクレオチドプライマーは、Isogen Bioscience(Maarssen, The Netherlands)が合成および定量した。プライマーをH₂Oに溶解して100pmol/μlにし、-20°Cで保存した。全てのPCRおよび配列決定用プライマーを表にまとめた(図1)。PCRについては、PfuTurbo(登録商標)Hotstart DNAポリメラーゼ(Stratagene, Amsterdam, The Netherlands)を製造元の指示に従い使用した。各々の反応混合物は、総量20μlのPCR反応緩衝液(ポリメラーゼと共に提供されたもの)中に、200μM dNTP混合物(Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands)、フォワードプライマーおよびリバースプライマー各6.7pmol、100ngのゲノムDNAまたは1ngのプラスミドDNA、および1単位のPfuTurbo(登録商標)Hotstart DNAポリメラーゼを含むものであった。PCR反応は、TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra, Goettingen, Germany)において32サイクルプログラム: 95°Cで2分間の変性; 95°Cで30秒間、60~70°C勾配(または別の特定のアニーリング温度)で30秒間、および72°Cで3分間を30サイクル; 72°Cで10分間の最後の伸長、を用いて行った。適当であれば、PCR混合物を、さらに分析または処理するまで4°Cで保存した。

【0148】

実施例2

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は、Sambrook(Sambrook J. and Russel, D.V. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 2000)に従い、50mlのゲルを1×Tris酢酸EDTA緩衝液中で使用して行った。DNAは、ゲルにエチジウムプロミドを加えることによって可視化し、UV光の下で観察した。ゲルの画像はCCDカメラおよび画像分析システム(GeneGnome; Syngene, Westburg B.V., Leusden, The Netherlands経由)によって記録した。

【0149】

実施例3

10

20

30

40

50

PCR産物および酵素消化産物の分析および精製

所望のPCRフラグメントの精製は、MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Westburg, Leusden, The Netherlands 経由； 製品番号28006) を製造元の指示に従い用いて行った。単離されたDNAはUV分光法によって定量し、その内容はアガロースゲル電気泳動によって評価した。

【0150】

あるいは、PCRまたは消化産物を、1% Tris酢酸EDTAアガロースゲルを用いるアガロースゲル電気泳動（例えば複数のフラグメントが存在する場合）により分離した。所望のフラグメントをゲルから切り出し、QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen; 製品番号20051) を製造元の指示に従い用いて回収した。

10

【0151】

実施例4

UV分光法によるDNAの定量

核酸の光学密度を、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Isogen Life Science, Maastricht, The Netherlands) を製造元の指示に従い用いて決定した。DNAの濃度は、260nmにおける光学密度(OD)の分析によって測定した (1 OD_{260 nm} 単位 = 50 μg/ml)。全てのサンプルについて、核酸を溶解させた緩衝液を参照として使用した。

【0152】

実施例5

制限酵素消化

20

制限酵素および添加物を、New England Biolabs (Beverly, MA, USA) またはFermentas (Vilnius, Lithuania) から入手し、製造元の指示に従い使用した。

【0153】

DNA (100ng) を、終量10 μlの適当な緩衝液中5単位の酵素を用いて消化した（反応量は適宜スケールアップした）。消化物は、最短60分間、推奨温度でインキュベートした。適合しない緩衝液または温度要件を必要とする制限酵素により二重消化を必要とするフラグメントについては、消化を逐次的に行った。必要に応じて、消化産物をアガロースゲル電気泳動およびゲル抽出により精製した。

【0154】

実施例6

30

DNAフラグメントのライゲーション

DNAフラグメントのライゲーションは、Quick Ligation Kit (New England Biolabs) を製造元の指示に従い用いて行った。各々のライゲーションにおいて、ベクターDNAをおよそ三倍モル過剰のインサートDNAと混合した。

【0155】

実施例7

大腸菌の形質転換

プラスミドDNA (1~5 μlのDNA溶液、典型的には2 μlのDNAライゲーション混合物) で、One Shot DH5 -T1^R またはMACH-1 T1^Rコンピテント大腸菌細胞 (Invitrogen, Breda, The Netherlands: 製品番号12297-016) を、製造元の指示に従い熱ショック法を用いて形質転換した。次に、細胞を、50 μg/mlアンピシリンを含有するLuria-Bertani (LB) 寒天プレート上にブレーティングした。プレートは、細菌コロニーが現われるまで37 °Cで16~18時間インキュベートした。

40

【0156】

実施例8

PCRによる細菌コロニーのスクリーニング

HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen; 製品番号203445) ならびに適当なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いるコロニーPCRを通じて、所望の配列を含むベクターの存在について細菌コロニーをスクリーニングした。選択したコロニーに20 μlビペットチップを軽く接触させ、それを小スケール培養のための2ml LBに手短に接触させ、

50

次いでPCR混合物で再懸濁した。PCRは、TGradient Thermocycler 96において35サイクルプログラム：95 で15分間の変性；94 で30秒間、55 で30秒間、および72 で2分間を35サイクル；その後に72 で10分間の最後の伸長工程、を用いて行った。適当であれば、PCR混合物を、アガロースゲル電気泳動による分析まで4 で保存した。

【0157】

実施例9

大腸菌培養物からのプラスミドDNAの単離

プラスミドDNAは、以下のQiagen製キット (Westburg, Leusden, The Netherlands経由) を製造元の指示に従い用いて大腸菌培養物から単離した。バルクのプラスミド調製 (50 ~ 150ml 培養) については、HiSpeed Plasmid Maxi Kit (製品番号12663) またはHiSpeed Plasmid Midi Kit (製品番号12643) のいずれかを使用した。小スケールのプラスミド調製 (± 2ml 培養) については、Qiaprep Spin Miniprep Kit (製品番号27106) を使用し、DNAを50 μl 溶出緩衝液 (キットに付属) に溶出させた。

【0158】

実施例10

部位特異的変異誘発

部位特異的変異誘発は、QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) を製造元の指示に従い用いて行った。この方法は、変異の成否をスクリーニングするためにサイレントな追加のXmaI部位の導入を含むものであった。簡単に説明すると、5 μl 10×反応緩衝液、1 μl オリゴヌクレオチド IgG4S228Pf (P16) (100pmol/μl)、1 μl オリゴヌクレオチド IgG4S228Pr (P17) (100pmol/μl)、1 μl dNTP混合物、3 μl Quicksolution、1 μl プラスミドpTomG4Tom7D8 (実施例16参照) (50ng/μl)、および1 μl PfuUltra HF DNAポリメラーゼを混合して総量50 μl とし、TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Germany; 製品番号050-801) において18サイクルプログラム：95 で1分間の変性；95 で50秒間、60 で50秒間、および68 で10分間を18サイクル、を用いて増幅した。PCR混合物はさらなる処理まで4 で保存した。次に、PCR混合物を1 μl DpnIと共に37 で60分間インキュベートしてpTomG47D8ベクターを消化し、これをさらなる処理まで4 で保存した。この反応混合物を、5 μl 5M NaAc および125 μl エタノールを用いて沈降させ、-20 で20分間インキュベートし、4 、14000 × gで20分間スピンドウーンした。このDNAペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥し、4 μl の水に溶解させた。計4 μl の反応量で、One Shot Top 10コンピテント大腸菌細胞 (Invitrogen, Breda, The Netherlands) を製造元の指示 (Invitrogen) に従い形質転換した。次に、細胞を、50 μg/ml アンピシリンを含有するLuria-Bertani (LB) 寒天プレート上にブレーティングした。プレートは、細菌コロニーが現われるまで37 で16 ~ 18時間インキュベートした。

【0159】

実施例11

DNAの配列決定

DNAの配列決定は、標準的な技術を用いて行った。

【0160】

実施例12

HEK-293F細胞における一過的発現

Freestyle (商標) 293-F (懸濁培養および化学的に定義されたFreestyle培地に適合させたHEK-293サブクローニング、例えばHEK-293F) 細胞をInvitrogenから入手し、製造元のプロトコルに従い293fectin (Invitrogen) を用いてトランスフェクトした。

【0161】

実施例13

pConG1fA77の構築：A77-IgG1重鎖の作製用ベクター

マウス抗Fc RI抗体A77のV_Hコード領域を、ダブルオーバーラップエクステンションPCRによって、この抗体のVHおよびVLコード領域を含むscFvファージベクターから増幅した。

10

20

30

40

50

これを、哺乳動物シグナルペプチド、理想的なコザック配列、およびpConG1fへのクローニングに適した制限部位を導入するために使用した。第一のPCRは、テンプレートとしてのscFvファージベクターと共にプライマーA77VHfor1およびA77VHrevを用いて行った。この第一PCRの一部を、プライマーA77VHfor2およびA77VHrevを用いる第二のPCRに使用した。VHフラグメントをゲル精製し、pConG1f0.4にクローニングした。このために、pConG1f0.4ベクターおよびVHフラグメントをHindIIIおよびApaIで消化し、精製した。V_HフラグメントおよびpConG1f0.4HindIII-ApaI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5-T1^R細胞を形質転換した。正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、その配列を確認し、これをpConG1fA77と命名した。

【0162】

10

実施例14

pConKA77の構築：A77抗体軽鎖の作製用ベクター

マウス抗Fc RI抗体A77のV_Lコード領域を、ダブルオーバーラップエクステンションPCRによって、この抗体のVHおよびVLを含むscFvファージベクターから増幅した。これを、哺乳動物シグナルペプチド、理想的なコザック配列、およびpConKappa0.4へのクローニングに適した制限部位を導入するために使用した。第一のPCRは、テンプレートとしてのscFvファージベクターと共にプライマーA77VLfor1およびA77VLrevを用いて行った。この第一PCRの一部を、プライマーA77VLfor2およびA77VLrevを用いる第二のPCRに使用した。PCR産物およびpConKappa0.4ベクターをHindIIIおよびPfl23Iで消化し、精製した。V_LフラグメントおよびpConKappa0.4HindIII-Pfl23I消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5-T1^R大腸菌を形質転換した。

20

【0163】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、その配列を確認した。このプラスミドをpConKA77と命名した。

【0164】

実施例15

pTomG4A77の構築：A77-IgG4重鎖の作製用ベクター

A77-IgG4発現用ベクターを構築するため、A77のVH領域をpTomG4にクローニングした。

【0165】

30

このために、pTomG4およびpConG1fA77をHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0166】

A77 V_HフラグメントおよびpTomG4HindIII-ApaI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5-T1^R細胞を形質転換した。

【0167】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択した。このプラスミドをpTomG4A77と命名した。

【0168】

実施例16

pTomG4A77HGの構築：A77-HG重鎖の作製用ベクター

40

A77-HG発現用構築物を作製するため、A77のVH領域をpTomG47D8HGにクローニングし、VH7D8領域を置換した。

【0169】

このために、pTomG47D8HGおよびpConG1fA77をHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0170】

A77 V_HフラグメントおよびpTomG47D8GHindIII-ApaI消化ベクターのフラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5-T1^R細胞を形質転換した。

【0171】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択した。このプラスミドをpTomG4A77HG

50

と命名した。

【0172】

実施例17

pEE6.4A77Fabの構築：A77-Fab重鎖の作製用ベクター

A77-Fab発現用構築物を作製するため、A77のVH領域をpEE6.42F8Fabにクローニングし、VH 2F8領域を置換した。

【0173】

このために、pEE6.42F8FabおよびpConG1fA77をHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0174】

A77 V_H フラグメントおよびpEE6.42F8Fab HindIII-ApaI消化ベクターのフラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5⁻-T1^R細胞を形質転換した。 10

【0175】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択した。このプラスミドをpEE6.4A77Fabと命名した。

【0176】

実施例18

ヒト抗cMet抗体の可変領域のクローニング

総RNAを、RNeasyキット (Qiagen, Westburg, Leusden, Netherlands) を製造元のプロトコルに従い用いて 1×10^6 個のマウスハイブリドーマ細胞から調製した。 20

【0177】

RNAの5'-RACE-相補DNA (cDNA) を、SMART RACE cDNA Amplificationキット (BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA USA) を製造元のプロトコルに従い用いて60ngの総RNAから調製した。

【0178】

cMet抗体のVLおよびVH領域をPCRによって増幅した。このために、PfuTurbo (登録商標) Hotstart DNAポリメラーゼ (Stratagene) を製造元の指示に従い使用した。各反応混合物は、5 μl 10×BD Advantage 2 PCR緩衝液 (Clontech)、200 μM dNTP混合物 (Roche Diagnostics)、12pmolのリバースプライマー (VH領域についてはRACEG1A1およびVL領域についてはRACEKA1)、7.2pmol UPM-Mix (UPM-Mix : 2 μM ShortUPM3および0.4 μM LongUPM H3オリゴヌクレオチド)、1 μlの上記の5' RACE cDNAテンプレート、ならびに1 μl 50×BD Advantage 2ポリメラーゼ混合物 (Clontech) を含む、総量50 μlであった。 30

【0179】

PCR反応は、TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra)において、35サイクルプログラム : 95°で1分間の変性；95°で30秒間、68°で60秒間を35サイクル、を用いて行った。

【0180】

反応産物を、1% TAEアガロースゲル上でのアガロースゲル電気泳動によって分離し、エチジウムプロミドで染色した。正確なサイズのバンドをゲルから切り出し、そのDNAを、Qiagen Minelute Reaction Cleanupキット (Qiagen) を用いてアガロースから単離した。 40

【0181】

ゲルによって単離したPCRフラグメントを、Zero Blunt (登録商標) TOPO (登録商標) PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) を製造元のプロトコルに従い用いてpCR4Blunt-TOP0ベクター (Invitrogen) にクローニングした。5 μlのライゲーション混合物で、OneShot DH5⁻T1Rコンピテント大腸菌 (Invitrogen) を形質転換し、LB/アンピシリンプレートにプレーティングした。

【0182】

インサートを含む6個のクローンからV_L配列を決定し、インサートを含む5個のクローンからV_H配列を決定した。 50

【0183】

実施例19

pConG1fcMetの構築：cMet-IgG1重鎖の作製用ベクター

ヒト抗cMet抗体のV_Hコード領域を、この領域を含むプラスミドからHindIIIおよびApaIを用いて切り出した。VHフラグメントをゲル精製し、pConG1f0.4にクローニングした。このために、pConG1f0.4ベクターをHindIIIおよびApaIで消化し、精製した。V_HフラグメントおよびpConG1f0.4HindIII-ApaI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5-T1R細胞を形質転換した。

【0184】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、単離し、これをpConG1fcMetと命名した。 10

【0185】

実施例20

pConKcMetの構築：cMet抗体軽鎖の作製用ベクター

ヒト抗cMet抗体のV_Lコード領域を、プライマーshortUPMH3およびRACEVLBs iWIを用いてこの領域を含むプラスミドから増幅し、pConK0.4へのクローニングに適した制限部位を導入した。

【0186】

PCR産物およびpConKappa0.4ベクターをHindIIIおよびPfl23Iで消化し、精製した。V_LフラグメントおよびpConKappa0.4HindIII-Pfl23I消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5-T1^R大腸菌を形質転換した。 20

【0187】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、その配列を確認した。このプラスミドをpConKcMetと命名した。

【0188】

実施例21

pTomG4cMetの構築：cMet-IgG4重鎖の作製用ベクター

cMet-IgG4発現用ベクターを構築するため、cMetのVH領域をpTomG4にクローニングした。 30

【0189】

このために、pTomG4F8およびpConG1fcMetをHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0190】

cMet V_HフラグメントおよびpTomG4F8HindIII-ApaI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5-T1^R細胞を形質転換した。

【0191】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択した。このプラスミドをpTomG4cMetと命名した。

【0192】

実施例22 40

pTomG4cMetHGの構築：cMet-HG重鎖の作製用ベクター

cMet-HG発現用構築物を作製するため、cMetのVH領域をpTomG4F8HGにクローニングし、VH 2F8領域を置換した。

【0193】

このために、pTomG4F8HGおよびpConG1fcMetをHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0194】

cMet V_HフラグメントおよびpTomG4F8HG HindIII-ApaI消化ベクターのフラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5-T1^R細胞を形質転換した。

【0195】

50

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択した。このプラスミドをpTomG4cMetHGと命名した。

【0196】

実施例23

pEE6.4cMetFabの構築：cMet-Fab重鎖の作製用ベクター

cMet-Fab発現用構築物を作製するため、cMetのVH領域をpEE6.42F8Fabにクローニングし、VH 2F8領域を置換した。

【0197】

このために、pEE6.42F8FabおよびpConG1fcMetをHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

10

【0198】

cMet VHフラグメントおよびpEE6.42F8Fab HindIII-ApaI消化ベクターのフラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5^R-T1^R細胞を形質転換した。

【0199】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択した。このプラスミドをpEE6.4cMetFabと命名した。

【0200】

実施例24

pConG1f2F8の構築：2F8-IgG1重鎖の作製用ベクター

2F8 (WO 2002/100348) のVHコード領域を、プライマー2f8HCexforおよび2f8HCexrevを用いてpIESR 2F8 (Medarex) からPCRにより増幅し、PCRscriptCam (Stratagene) にサブクローニングした。その後、VHフラグメントをpCONg1f0.4にクローニングした。

20

【0201】

このために、pConG1f0.4およびpCRScriptCAMVH2F8ベクターをHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0202】

VHフラグメントおよびpConG1f0.4HindIII-ApaI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5^R-T1^R細胞を形質転換した。正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、その配列を確認し、このベクターをpConG1f2F8と命名した。

【0203】

30

実施例25

pConK2F8の構築：2F8抗体軽鎖の作製用ベクター

pIESR 2F8をHindIIIおよびBsiWIで消化し、2F8 (抗EGFr) のVLコード領域をゲルから単離した。pConKappa0.4ベクターをHindIIIおよびBsiWIで消化し、精製した。VLフラグメントおよびpConKappa0.4HindIII-BsiWI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5^R-T1^R大腸菌を形質転換した。

【0204】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、その配列を確認した。このプラスミドをpConK2F8と命名した。

【0205】

40

実施例26

pTomG42F8の構築：2F8-IgG4重鎖の作製用ベクター

2F8-IgG4発現用ベクターを構築するため、2F8のVH領域をpTomG4にクローニングした。

【0206】

このために、pTomG4およびpConG1f2F8をHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0207】

2F8 VHフラグメントおよびpTomG4HindIII-ApaI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5^R-T1^R細胞を形質転換した。

【0208】

50

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択した。このプラスミドをpTomG42F8と命名した。

【0209】

実施例27

pTomG42F8HGの構築：2F8-HG重鎖の作製用ベクター

2F8-HG発現用構築物を作製するため、2F8のVH領域をpTomG47D8HGにクローニングし、VH7D8領域を置換した。

【0210】

このために、pTomG47D8HGおよびpConG1f2F8をHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

10

【0211】

2F8 VHフラグメントおよびpTomG47D8GH HindIII-ApaI消化ベクターのフラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5⁻-T1^R細胞を形質転換した。

【0212】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択した。このプラスミドをpTomG42F8HGと命名した。

【0213】

実施例28

pEE6.42F8Fabの構築：2F8-Fab重鎖の作製用ベクター

Fabコード領域を、プライマーpConG1seq1および2F8fabrev2を用いるPCRによってベクターpConG1f2F8から増幅し、適当なクローニング用制限部位およびC末端hisタグコード配列を導入した。このPCRフラグメントを精製し、PEE6.4にクローニングした。

20

【0214】

このために、pEE6.4およびPCRフラグメントをHindIIIおよびEcoRIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0215】

2F8 FabフラグメントおよびpEE6.4HindIII-EcoRI消化ベクターのフラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5⁻-T1^R細胞を形質転換した。

【0216】

正確なインサートを含むクローンを選択し、DNA配列決定によってその配列を確認した。このプラスミドをpEE6.42F8Fabと命名した。

30

【0217】

実施例29

pConG1f7D8の構築：7D8-IgG1重鎖の作製用ベクター

CD20特異的なHuMab-7D8 (WO 04/035607) のV_Hコード領域を、プライマー7D8VHexfor (P8) および2F8HCexrev (P13) を用いてこの領域を含むpGemT (Promega, Madison, USA) ベクターからPCRによって増幅し (図14) 、pConG1f0.4 (Lonza Biologics, Slough, UK) へのクローニングに適した制限部位、ヒトIgG1のゲノム定常領域 (アロタイプf) を含む哺乳動物発現ベクター、および理想的なコザック配列 (GCCGCCACC (Kozak M et al., Gene 234(2), 187-208(1999))) を導入した。PCRフラグメントを、PCR-Script (登録商標) Cam Cloning Kit (Stratagene) を製造元の指示に従い用いてpPCR-Script CAM (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) にクローニングした。数個のクローンを配列決定し、予測された配列を含むクローンをさらなる使用のために選択した。

40

【0218】

V_Hフラグメントをゲル精製し、pConG1f0.4にクローニングした。このために、V_Hフラグメントを、HindIIIおよびApaIによる消化およびゲル精製の後にpPCR-Script CAMベクターから単離した。

【0219】

pConG1f0.4ベクターをHindIIIおよびApaIで消化し、そのベクターフラグメントをゲルから単離した後、エビアルカリホスファターゼ (New England Biolabs) を用いて脱リン

50

酸化した。 V_H フラグメントおよびpConG1f0.4HindIII-ApaI脱リン酸化フラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5 α -T1 R 細胞(Invitrogen)を形質転換した。8個のコロニーを、プライマーpConG1seq1(P10)およびHCseq5(P11)を用いたコロニーPCRによって検査し(図14)、全てのコロニーが正確なサイズのインサートを含むことを確認した。

【0220】

さらなる研究のためにクローンを選択し、これをpConG1f7D8と命名した。

【0221】

実施例30

pConK7D8の構築：7D8-IgG1、7D8-IgG4、および7D8-HG軽鎖の作製用ベクター

CD20特異的なHuMab-7D8(WO 04/035607)の V_L コード領域を、プライマー7D8VLexfor(P7)および7D8VLexrev(P6)を用いてこの領域を含むプラスミドから増幅し(図14)、pConKappa0.4(Lonza Biologics)へのクローニングに適した制限部位、ヒトIgGの定常カッパ軽鎖領域(アロタイプkm3)を含む哺乳動物発現ベクター、および理想的なコザック配列を導入した。

【0222】

PCR産物およびpConKappa0.4ベクターを、HindIIIおよびBsiWIで消化した。ベクターおよび V_L フラグメントを精製し、ベクターをエビアルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化した。 V_L フラグメントおよびpConKappa0.4HindIII-BsiWI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5 α -T1 R 大腸菌を形質転換した。10個のコロニーを、プライマーpConKseq1(P9)およびLCseq3(P5)を用いたコロニーPCRによって検査し(図14)、9個のコロニーが正確なサイズのインサートを含むことを確認した。

【0223】

4個のコロニーからプラスミドDNAを単離し、 V_L 領域の配列決定を行った。3個のコロニーが予想された配列を含み、一つのクローンをさらなる使用のために選択し、これをpConK7D8と命名した。

【0224】

実施例31

pTomG4の構築：ヒトIgGの重鎖可変領域およびヒトIgG4の定常領域の発現用ベクター

ゲノムDNAをボランディアの血液サンプルから単離し、これをプライマーIgG4gene2f(P15)およびIgG4gene2r(P14)を用いるPCRにおけるテンプレートとして使用し(図14)、IgG4の重鎖の完全なゲノム定常領域の増幅および哺乳動物発現ベクターpEE6.4(Lonza Biologics)へのクローニングに適した制限部位の導入を行った。このPCRフラグメントを精製してpEE6.4にクローニングした。このために、PCR産物をHindIIIおよびEcoRIで消化した後、制限酵素を熱で不活性化させた。pEE6.4ベクターをHindIIIおよびEcoRIで消化した後、制限酵素を熱で不活性化させ、ベクターフラグメントをエビアルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化し、その後にこのホスファターゼを熱で不活性化させた。IgG4フラグメントおよびpEE6.4HindIII-EcoRI脱リン酸化ベクターをライゲーションし、コンピテントなMACH1-T1 R 細胞(Invitrogen)を形質転換した。これらのクローンをLBで培養し、プラスミドDNAを小培養物(1.5ml)から単離した。制限酵素消化は、pEE6.4ベクターへのIgG4フラグメントのクローニングに対応するパターンを示した。2個のクローン由来のプラスミドDNAでDH5 α -T1 R 大腸菌を形質転換し、プラスミドDNAを単離し、その構築物をインサートの配列分析により検査し、1個のクローンが、イントロンにおけるいくつかの小さな違いを除いてGenbankデータベース由来のゲノムIgG4クローンと同一であることを確認した。SEQ

ID NO: 13は、pTomG4におけるIgG4領域の配列を示す。これらの違いは、おそらくは多型またはGenbank配列側の配列の誤りのいずれかである。このプラスミドをpTomG4と命名した。

【0225】

実施例32

pTomG47D8の構築：7D8-IgG4重鎖の作製用ベクター

pConG1f7D8由来のプラスミドDNAをHindIIIおよびApaIで消化し、 V_H フラグメントをゲル

10

20

30

40

50

精製した。pTomG4ベクターをHindIIIおよびApaIで消化し、そのベクターフラグメントをゲルから単離した。 V_H フラグメントおよびpTomG4HindIII-ApaIフラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5 α -T1^R細胞を形質転換した。4個のコロニーを、(プライマーpConKseq1(P9)およびHCseq11(P12)を用いた)コロニーPCRによって検査し、2個のコロニーが正確なサイズのインサートを含むことを確認し、pTomG4骨格の存在は、コロニーPCRフラグメントのMspIによる消化によって確認した。これらのクローンのうちの一つをさらなる使用のために選択した。このプラスミドをpTomG47D8と命名した。

【0226】

実施例33

pTomG47D8HGの構築：7D8-HG重鎖の発現用ベクター

10

部位特異的変異誘発を用いてpTomG47D8プラスミドのIgG4のヒンジエクソンのスプライスドナー部位を破壊した。部位特異的変異誘発反応は、QuickChange XL部位特異的変異誘発法に従い、プライマーIgG4S228Pf(P16)およびIgG4S228Pr(P17)を用いて行った。24個のコロニーをコロニーPCRおよびXmaI消化(追加のXmaI部位は変異誘発の間に導入されたものである)によってスクリーニングしたところ、全てのコロニーが正確なヌクレオチド変化を含むようであった。2個の陽性コロニーを一晩培養し、プラスミドDNAを単離し、配列決定を行って正確な変異が導入されたことを確認した。両方とも正確な配列を含んでいたが、一方をさらなる増幅のために選択し、これをpTomG47D8HGと命名した。変異誘発プロセスの間にさらなる変異が導入されている可能性を排除するため、pTomG47D8HGの全IgG4コード領域を再配列決定したところ、追加の変異は見出されなかった。この最終的なベクターをpTomG47D8HGと命名した。

20

【0227】

実施例34

マウス抗Betv1抗体の可変領域のクローニング

総RNAを、RNeasyキット(Qiagen, Westburg, Leusden, Netherlands)を製造元のプロトコルに従い用いて 0.3×10^5 個のマウスハイブリドーマ細胞(参考文献(Akkerdaas JH et al., Allergy 50(3), 215-20(1995))由来のクローン2H8)から調製した。

【0228】

RNAの5'-RACE-相補DNA(cDNA)を、SMART RACE cDNA Amplificationキット(BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA USA)を製造元のプロトコルに従い用いて112ngの総RNAから調製した。

30

【0229】

Betv1抗体の V_L および V_H 領域をPCRによって増幅した。このために、PfuTurbo(登録商標)Hotstart DNAポリメラーゼ(Stratagene)を製造元の指示に従い使用した。各反応混合物は、200 μ M dNTP混合物(Roche Diagnostics)、12pmolのリバースプライマー(V_H 領域についてはRACEG1mm1(P19)および V_L 領域についてはRACEKmm1(P18))、7.2pmol UPM-Mix(UPM-Mix:2 μ M ShortUPMH3(P20)および0.4 μ M LongUPMH3(P21)オリゴヌクレオチド(図14))、0.6 μ lの上記の5' RACE cDNAテンプレート、ならびに1.5単位のPfuTurbo(登録商標)Hotstart DNAポリメラーゼを含むPCR反応緩衝液(ポリメラーゼを補充した)であり、総量30 μ lであった。

40

【0230】

PCR反応は、TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra)において、35サイクルプログラム: 95 $^{\circ}$ Cで2分間の変性；95 $^{\circ}$ Cで30秒間、55 $^{\circ}$ Cで30秒間、および72 $^{\circ}$ Cで1.5分間を35サイクル；72 $^{\circ}$ Cで10分間の最終伸長、を用いて行った。

【0231】

反応産物を、1%TAEアガロースゲル上でのアガロースゲル電気泳動によって分離し、エチジウムブロミドで染色した。正確なサイズのバンドをゲルから切り出し、そのDNAを、QiaexIIゲル抽出キット(Qiagen)を用いてアガロースから単離した。

【0232】

ゲルによって単離したPCRフラグメントを、200 μ M dATPおよび2.5単位のAmpliTaq(Per

50

kin Elmer)と共に72℃で10分間インキュベートすることによってAテイルを付加し、これをminieluteカラム (Qiagen)を用いて精製した。Aテイルを付加したPCRフラグメントを、pGEMTeasyベクターシステムIIキット (Promega)を製造元のプロトコルに従い用いてpGEMTeasyベクター (Promega)にクローニングした。2μlのライゲーション混合物で、OneShot DH5^TRコンピテント大腸菌 (Invitrogen)を形質転換し、LB/Amp/IPTG/Xgalプレートにプレーティングした。

【0233】

V_H 配列および V_L 配列について、インサートを含む4個の白色コロニーを掻き取り、そのインサートの配列決定を行った。Betv1の V_H および V_L の予測されたアミノ酸配列を、それぞれSEQ ID NO: 8およびSEQ ID NO: 12に示す。

10

【0234】

実施例35

pConG1fBetv1の構築：Betv1-IgG1重鎖の作製用ベクター

マウス抗BetV1抗体の V_H コード領域を、プライマーVHexbetv1for (P4)およびVHexbetv1rev (P3)を用いてこの領域を含むプラスミド（実施例18）からPCRにより増幅し、pConG1f0.4へのクローニングに適した制限部位および理想的なコザック配列を導入した。

【0235】

V_H フラグメントをゲル精製し、pConG1f0.4にクローニングした。このために、PCR産物およびpConKappa0.4ベクターをHindIIIおよびApaIで消化し、精製した。

20

【0236】

V_H フラグメントおよびpConG1f0.4HindIII-ApaI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5^T-T1^R細胞を形質転換した。

【0237】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、正確な配列を確認した。このプラスミドをpConG1fBetv1と命名した。

【0238】

実施例36

pConKBetv1の構築：Betv1軽鎖の作製用ベクター

マウス抗BetV1抗体の V_L コード領域を、プライマーVLexbetv1for (P2)およびVLexbetv1rev (P1)を用いてこの領域を含むプラスミド（実施例18）から増幅し、pConK0.4へのクローニングに適した制限部位および理想的なコザック配列を導入した。

30

【0239】

PCR産物およびpConKappa0.4ベクターをHindIIIおよびBsiWIで消化し、精製した。 V_L フラグメントおよびpConKappa0.4HindIII-BsiWI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5^T-T1^R大腸菌を形質転換した。

【0240】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、その配列を確認した。このプラスミドをpConKBetv1と命名した。

【0241】

実施例37

40

pTomG4Betv1の構築：Betv1-IgG4重鎖の作製用ベクター

Betv1-IgG4発現用ベクターを構築するため、BetV1の V_H 領域をpTomG4にクローニングした。

【0242】

このために、pTomG4およびpConG1fBetv1をHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

【0243】

Betv1 V_H フラグメントおよびpTomG4HindIII-ApaI消化ベクターをライゲーションし、コンピテントなDH5^T-T1^R細胞を形質転換した。

【0244】

50

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、その配列を確認した。このプラスミドをpTomG4Betv1と命名した。

【 0 2 4 5 】

実施例38

pTomG4Betv1HGの構築：Betv1-HG重鎖の作製用ベクター

Betv1-HG発現用構築物を作製するため、Betv1のV_H領域をpTomG47D8HGにクローニングし、V_H 7D8領域を置換した。

【 0 2 4 6 】

このために、pTomG47D8HGおよびpConG1fBetv1をHindIIIおよびApaIで消化し、関係するフラグメントを単離した。

10

【 0 2 4 7 】

Betv1 V_H フラグメントおよびpTomG47D8HG HindIII-ApaI消化ベクターのフラグメントをライゲーションし、コンピテントなDH5⁻-T1^R細胞を形質転換した。

【 0 2 4 8 】

正確なサイズのインサートを含むクローンを選択し、その配列を確認した。このプラスミドをpTomG4Betv1HGと命名した。

【 0 2 4 9 】

実施例39

HeK-293F細胞における一過的発現による7D8-IgG1、7D8-IgG4、7D8-HG、Betv1-IgG1、Betv1-IgG4、Betv1-HG、2F8-IgG1、2F8-IgG4、2F8-HG、2F8-Fab、A77-IgG1、A77-IgG4、A77-HG、A77-Fab、cMet-IgG1、cMet-IgG4、cMet-HG、およびcMet-Fabの作製

20

抗体は、全ての構築物から、293fectinを製造元の指示に従い用いて関係する重鎖および軽鎖ベクターをHEK-293F細胞に共トランスフェクトすることによって作製した。7D8-IgG1については、pConG1f7D8およびpConK7D8を共発現させた。7D8-IgG4については、pTomG47D8およびpConK7D8を共発現させた。7D8-HGについては、pTomG47D8HGおよびpConK7D8を共発現させた。Betv1-IgG1については、pConG1Betv1およびpConKBetv1を共発現させた。Betv1-IgG4については、pTomG4Betv1およびpConKBetv1を共発現させた。Betv1-HGについては、pTomG4Betv1HGおよびpConKBetv1を共発現させた。

【 0 2 5 0 】

2F8-IgG1については、pConG1f2F8およびpConK2F8を共発現させた。2F8-IgG4については、pTomG42F8およびpConK2F8を共発現させた。2F8-HGについては、pTomG42F8HGおよびpConK2F8を共発現させた。2F8-Fabについては、pEE6.42F8-FabおよびpConK2F8を共発現させた。

30

【 0 2 5 1 】

cMet-IgG1については、pConG1fcMetおよびpConKcMetを共発現させた。cMet-IgG4については、pTomG4cMetおよびpConKcMetを共発現させた。cMet-HGについては、pTomG4cMetHGおよびpConKcMetを共発現させた。cMet-Fabについては、pEE6.4cMet-FabおよびpConKcMetを共発現させた。

【 0 2 5 2 】

A77-IgG1については、pConG1fA77およびpConKA77を共発現させた。A77-IgG4については、pTomG4A77およびpConKA77を共発現させた。A77-HGについては、pTomG4A77HGおよびpConKA77を共発現させた。A77-Fabについては、pEE6.4A77-FabおよびpConKA77を共発現させた。

40

【 0 2 5 3 】

実施例40

IgG1、IgG4、およびIgG4ヒンジレス抗体の精製

全てのIgG1、IgG4、およびヒンジレス抗体を精製した。まず初めに、上清を0.20 μMデッドエンドフィルターを通じて濾過した。次に、上清を、5ml プロテインAカラム (rProt ein A FF, Amersham Bioscience) にロードし、0.1Mクエン酸-NaOH、pH3で溶出させた。その溶出液を直ちに2M Tris-HCl、pH9で中和し、12.6mMリン酸ナトリウム、140mM NaCl、

50

pH7.4 (B. Braun, Oss, The Netherlands) に対して一晩透析した。透析後、サンプルを、 $0.20\text{ }\mu\text{M}$ デッドエンドフィルターを通じて滅菌濾過した。

【0254】

抗体を、1単位のPNGase F (Roche) / μg 抗体と共に37°Cで一晩インキュベートすることによって脱グリコシル化した後、プロテインAで精製した。

【0255】

サンプルを、比濁法および280nmにおける吸光度によってIgGの濃度について分析した。

【0256】

実施例41

金属アフィニティクロマトグラフィによる組換えFab抗体の精製

10

Talonビーズ (Clontech) を、A77-Fab、2F8-Fab、およびcMet-Fab抗体の精製に使用した。

【0257】

使用前に、ビーズを1×平衡 / 洗浄緩衝液pH7.0 (50mMリン酸ナトリウムおよび300mM NaCl) で平衡化し、その後にFab抗体を含む培養上清と共にインキュベートした。このビーズを1×平衡 / 洗浄緩衝液で洗浄して非特異的に結合したタンパク質を除去し、pH5.0の1×溶出緩衝液 (50mMリン酸ナトリウム、300mM NaCl、および150mMイミダゾール) を用いてHisタグ付加タンパク質を溶出した。インキュベーションはバッチ式で行い、洗浄および溶出は、遠心分離 (700gで2分間) を用いて充填カラムにおいて行った。溶出したタンパク質は、PD-10カラムにおいてPBSに交換することによって脱塩処理した。精製されたタンパク質の収量は、そのアミノ酸配列から算出した理論上の吸光係数を用いて、280nmにおける吸光度を測定することによって決定した。精製されたタンパク質をSDS-PAGEにより分析したところ、そのタンパク質は予測されたサイズに一つのバンドとして移動した。

20

【0258】

実施例42

7D8-IgG4および7D8-HG抗体の非還元型SDS-PAGE分析

精製後、CD20特異的抗体7D8-IgG1 (IgG1抗CD20)、7D8-IgG4 (IgG4抗CD20)、および7D8-HG (ヒンジレスIgG4抗CD20) を、非還元型SDS-PAGEにおいて分析した。

【0259】

使用したピストリス電気泳動法は、サンプルを中性pHで泳動させるLaemmli法 (Laemmli UK, Nature 227, 6801(1970)) の改良版である。SDS-PAGEゲルはクマシーで染色し、GenieGenius (Synoptics, Cambridge, UK) を用いてデジタル画像化した。

30

【0260】

図1に示されるように、7D8-IgG1は、全長四量体 (2つの重鎖および2つの軽鎖) 7D8 IgG1分子を表す一つの大きな束 (major bind) を示した。7D8-IgG4は、四量体IgG4分子を表す大バンドのそばに、文献 (Schuurman J et al., Mol Immunol 38, 1(2001); Angal S et al., Mol Immunol 30, 105(1993); Colcher D et al., Cancer Res 49, 1738(1989); King DJ et al., Biochem J 281(Pt 2), 317(1992); Petersen J G et al., J Biol Chem 249, 5633(1974)) に記載されるような相当量の半分子 (すなわち1つの重鎖および1つの軽鎖) を有することが示された。ヒンジレスIgG4分子7D8-HGは半分子のみであることが示された。

40

【0261】

実施例43

7D8-HGの質量分析

ナノスプレー技術による質量分析のために、Millipore Microcon YM-30濃縮器を用いてサンプルを濃縮し、緩衝液を20mMリン酸ナトリウム、pH7.2に交換した。その後、1U N-グリコシダーゼF (Roche, カタログ番号1365177) を用いて37°Cで16時間、およそ100 μg のIgGを消化し、N結合型グリカンを遊離させた。

【0262】

サンプルをC4マイクロトラップカートリッジを用いてオフラインで脱塩処理し、30%ブ

50

ロパノール / 5% 酢酸に溶出させた。Q-TOF (Waters, Almere, the Netherlands) を用いるナノスプレー式エレクトロスプレーMSを用いて分子量分析を行った。機器は、glu-フィブリノペプチドを用いてキャリプレートした。Masslynx 4.0ソフトウェアを用いて、獲得した多荷電データを解析した。

【0263】

さらなるサンプルアリコートを、ジチオトレイトイールを用いて還元した。還元産物を、C4マイクロトラップを用いてオフラインで脱塩処理し、上記の通りに分析した。還元条件下での7D8-HGのMS分析は、23440ダルトンの軽鎖質量を示し、これは予測された軽鎖質量23440ダルトンと一致した。重鎖の質量は検出されなかったが、これはおそらく、重鎖が沈降したからである。10

【0264】

非還元条件下でのMS分析は、71520ダルトンの主要な質量を示し、これはヒンジを欠く半分子（1つの重鎖および1つの軽鎖を合わせたもの）の予想された質量（71522ダルトン）と十分相関した。143041ダルトンの質量を有する生成物が少量観察されたが、これはおそらくヒンジレス重鎖を含む四量体分子を表すものである。

【0265】

実施例44

7D8-HGの質量分析ペプチドマッピング

7D8-HGのアリコート（25 μg）を、室温で5時間、CNBrで消化した。CNBrで消化したサンプルを凍結乾燥し、次いで10% アンモニア水でpHを8.4に調整した50mM重炭酸アンモニウム緩衝液に再溶解させ、37 °C で5時間、TPCK処理したトリプシンで消化した。この消化産物を凍結乾燥し、Tris酢酸緩衝液、pH8.5中で、20倍過剰のジチオトレイトイール（DTT）を用いて消化した凍結乾燥サンプルの還元を行った。その反応産物を、C18カラムを用いるオンラインLC/ES-MSによって分析した。溶出は、ギ酸およびアセトニトリルの水性勾配を用いて行った。質量の検出は、m/z 250 ~ 3000の範囲でキャリプレートしたLCT Premier Electrospray質量分析計を用いて行った。20

【0266】

ヒンジレスの特別なペプチド220 VAPEFLGGPSVFLFPKPK 238の理論上の質量に対応する2026.2Daの質量を有するトリプシン消化ペプチドを検出した（図2）。このペプチドの実体は、ナノスプレーMSおよびMS/MSによって確認した（図3および4）。30

【0267】

この結果は、7D8-HG抗体がヒンジ領域を含まないことを示している。

【0268】

実施例45

分析用超遠心分離（AUC）実験による沈降速度による7D8-HGの分子量分布

PBS中1mg/mlサンプルの7D8-HGを、AUC分析のためにNanolytics (Dalgow, Germany) に送付した。6.7Sの速度により7D8-HG沈降物の優勢な集合（95%）を同定した。別の凝集物を、11.5Sにおいて確認した（2%）。残りの物質は、より高速の凝集によって確認された。40

【0269】

主要なフラクションの沈降係数は、PBS中の7D8-HGが主として摩擦比が1.4の二量体として存在することを示している。

【0270】

見かけ上、7D8-HGは、おそらくCH3領域における、低い親和性の非共有結合性相互作用によって二量体を形成している（Saphire, Stanfield et al. 2002 *J Mol Biol* 319(1) : 9-18）。この二量体化プロセスは、過剰な無関係の抗体の存在下でHG分子を使用することによって阻害され得る（実施例54を参照のこと）。

【0271】

実施例46

7D8-IgG1、7D8-IgG4、および7D8-HG抗体の機能分析

10

20

30

40

50

これらのCD20特異的抗体のCD20抗原に対する結合は、フローサイトメトリーによって試験した。NS0/CD20トランスフェクト細胞（50,000細胞/50 μl）をFACS緩衝液（FB: PBS、0.05% BSA、0.02% NaN₃）で洗浄し、V底96ウェルプレートにおいて試験抗体と共にインキュベートした（50 μl、4 °Cで30分間）。洗浄後、PEで標識したヤギF(ab)₂抗ヒトIgG-カツバ（Southern Biotechnology, カタログ番号2062-09, www.southernbiotech.com）を細胞に加えた。細胞をFBで洗浄し、細胞をFACSチューブに回収し、総量を150 μlとした。サンプルは、FACScalibur（商標）（Becton Dickinson, San Diego, CA, USA）を使用することによって測定および分析した。

【0272】

図5に示されるように、3つ全ての抗体は抗原特異的でありかつ、CD20に対して強い結合を示した。10

【0273】

C1q（古典的補体カスケードの第一成分）の7D1-IgG1、7D8-IgG4、および7D8-HGに対する結合を決定するため、ELISAを行った。手短に説明すると、マイクロタイターELISAプレート（Greiner, Germany）をRTで一晩、PBS中10 μg/ml～0.06 μg/mlの範囲で連続希釈した試験抗体でコーティングした。プレートを空にし、RTで30分間、各ウェルあたり200 μlのELISA希釈液（0.1M NaPO₄、0.1M NaCl、0.1% ゼラチン、および0.05% Tween-20）でウェルをブロックした。その後、プレートを空にし、ウェルを、2 μg/mlのヒトC1q（Quidel, ロット番号900848）を含有するC1q緩衝液（0.1% w/v ゼラチンおよび0.05% v/v Tween-20を補充したPBS、100 μl/ウェル、37 °C、1時間）と共にインキュベートした。プレートをPBSTで三回洗浄し、ウェルを、C1q緩衝液で希釈したウサギ抗ヒトC1q（DAKO, A0136）と共にインキュベートした（100 μl/ウェル、RT、1h）。このプレートをPBSTで洗浄した後（3×）、ウェルを、ELISA希釈液に希釈したHRP結合型ブタ抗ウサギIgG-Fc（DAKO, P0300, ロット番号069）と共にインキュベートした（1:2500、100 μl/ウェル、RT、1時間）。その後、プレートを三回洗浄し、RT、暗所にて30分間、新たに調製した1mg/ml ABTS溶液（ABTS: 2,2'-アジノ-ビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]；10ml ABTS緩衝液中5mgのタブレットを2つ、Boehringer Mannheim, Ingelheim, Germany）を用いてアッセイを行った。ELISAプレートリーダー（Bitek Instruments Inc., Winooski, USA）において405nmの吸光度を測定した。20

【0274】

図6に示されるように、C1qは、7D8-IgG4および7D8-HGの両方に結合しなかった。対照として、7D8-IgG1に対するC1qの結合を評価したところ、C1qの濃度依存的な結合を示した。30

【0275】

CD20特異的抗体の補体特性をさらに調査するため、補体依存的な細胞傷害性を試験した。収集後、Daudi細胞（ATCC, www.ATCC.org）をPBSで三回洗浄し、1% (w/v) ウシ血清アルブミン（BSA; Roche, Basel, Switzerland）を補充したRPMI 1640に 2×10^6 細胞/mlとなるよう再懸濁した。次いで、細胞を、容量50 μl中 1.0×10^5 細胞/ウェルとなるよう96ウェル丸底プレートに入れた。同量の抗体（最高濃度10 μg/ml、RPMI 1640および1% BSAで希釈）をウェルに加え、室温（RT）で15分間インキュベートした。次いで、25 μlの正常ヒト血清（NHS）を加え、細胞を37 °Cで45分間インキュベートした。熱不活性化血清（血清 T）は、56 °Cで10分間インキュベートしたNHSである。45分間のインキュベーション後、細胞を再懸濁してFACSチューブ（Greiner）に移した。次いで、10 μlのヨウ化プロピジウム（PI; Sigma-Aldrich Chemie B.V.）をこの懸濁物に加えた（10 μg/ml溶液）。溶解は、フローサイトメトリー（FACScalibur（商標），Becton Dickinson, San Diego, CA, USA）によって死細胞（PI陽性細胞）の数を測定することにより検出した。40

【0276】

図7Aに示されるように、7D8-IgG1はdaudi細胞の大きな溶解を示したが、7D8-IgG4および7D8-HGは両方とも少量のDaudi細胞の溶解しか示さなかった。

【0277】

血清の役割を評価するため、熱不活性化血清（血清 T）を、10 μgの抗体と共にインキ50

ユベートした細胞に加えた。図7Bは、溶解の誘導が補体活性を有する血清に依存的であること、熱不活性化血清を添加しても溶解が起こらないことを示した。

【0278】

実施例47

Betv1-HG抗体の非還元型SDS-PAGE分析

精製後、Betv1-HG（ヒンジレスIgG4抗Betv1）を、非還元型SDS-PAGEにおいて分析した。使用したビストリス電気泳動法は、サンプルを中性pHで泳動させるLaemmli法の改良版である。SDS-PAGEゲルはクマシード染色し、GeneGenius（Synoptics, Cambridge, UK）を用いてデジタル画像化した。

【0279】

10

図8に示されるように、Betv1-HGは、半分子（すなわち1つの重鎖および1つの軽鎖）を表す一つの大きな束を示した。

【0280】

実施例48

Betv1-HG抗体のゲル濾過

Betv1-HGをゲル濾過に供し、この変異体が半分子として溶出するのかインタクトな二量体として溶出するのかを調査した。サンプル（100 μl）を、Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden製のHPLCシステム（AKTA explorer）に接続したSuperdex 200 HR 10/30カラム（Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden）にアプライした。このカラムを最初にPBSで平衡化した。250 μlのフラクションを回収し、抗原結合アッセイを用いてBet v 1特異的IgGを測定した。サンプルは、214nmにおける吸収の測定にも供した。

20

【0281】

Bet v 1特異的抗体の抗原結合を試験するため、希釈した抗体のサンプルを室温で一晩、50 μlの希釈した¹²⁵I標識Bet v 1または¹²⁵I標識Fe1 d 1と共に、750 μl PBS/AT（0.3% BSA、0.1% Tween-20、0.05% NaN3を補充したPBS）中0.75mgのプロテインGセファロース（Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden）とインキュベートした。Bet v 1を、Aalberseら（Serological aspects of IgG4 antibodies. 1983. 130: 722-726）に記載されるような、キャリアなしの¹²⁵I（Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden）を用いるクロラミント法によりヨウ化した。セファロース懸濁物をPBS-T（0.1% Tween-20を補充したPBS）で洗浄した後、結合した放射活性を測定した。その結果を、添加した量に対する放射活性の量として表した。

30

【0282】

ヒンジレスBetv1-HGのBet v 1結合活性は、一つのピークとして溶出し、これは、インタクトなヒンジを含む精製されたBetv1-IgG4（IgG4抗Bet v 1）の溶出ピークよりも長い時間保持された（図9）。球状タンパク質を用いたこのカラムのキャリブレーションは、Betv1-HGが分子サイズ約70kDのタンパク質に対応するフラクションとして溶出されたことを示した（データは示さず）。これらのデータは、ヒンジレスIgG4が半分子として存在し、報告されているヒンジレスIgG1およびIgG4分子（Silverton EW et al., Proc Natl Acad Sci USA 74, 5140(1977); Rajan SS et al., Mol Immunol 20, 787(1983); Horgan C et al., J Immunol 150, 5400(1993)）とは対照的に、非共有結合性相互作用を通じて四量体分子を形成しないという本発明らの観察を裏付けるものである。

40

【0283】

実施例49

Betv1-IgG4およびBetv1-HG抗体の機能的な特徴付け

以前に、血清由来の抗原特異的なIgG4とは対照的に、インビトロ生成されたモノクローナルIgG4抗体は、IgG1抗体と同様、抗原を架橋することができ、従って二価抗体であることが示されている（Schuurman J et al., Immunology 97, 693(1999); Aalberse R C et al., Immunology 105, 9(2002)）。Betv1-IgG1、Betv1-IgG4、およびBetv1-HGの抗原を架橋する能力は、セファロース結合型Bet v 1および¹²⁵I標識抗原を用いる放射免疫アッセイによって決定した。本実験においては、樺花粉（Birch pollen）セファロースを調製し

50

た。簡単に説明すると、樺花粉抽出物 (Allergon, Angelholm, Sweden) を、製造元の指示に従いCNBr活性化型セファロース4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) に結合させた。その後、このセファロースを、0.3% BSA、0.1% Tween-20、0.05% NaN₃を補充したPBSに再懸濁した。

【0284】

セファロース結合型抗原と¹²⁵I標識抗原を架橋する抗体の能力を試験するため、50 μlの希釈した抗体を、PBS/AT中750 μlのセファロースと共に室温で一晩インキュベートした。次に、このセファロース懸濁物をPBS-Tで洗浄し、その後にこの懸濁物を総量750 μl PBS/AT中50 μlの希釈した¹²⁵I標識Bet v 1と共に室温で一晩インキュベートした。最後に、このセファロースをPBS-Tで洗浄し、結合した放射活性を測定した。その結果を、添加した放射標識の量に対する結合した放射活性の量として表した。10

【0285】

図10に示されるように、三つ全ての抗体は抗原特異的であり、放射標識Betv1に対する強い結合を示した。

【0286】

図11においては、Betv1-IgG1およびBetv1-IgG4がセファロース結合型Bet v 1と放射標識Bet v 1を架橋できていることが示されている。IgG1およびIgG4抗体は二価抗体として振る舞う。Betv1-HG抗体はBetv1抗原を架橋できず、従って一価結合であることが実証された。20

【0287】

実施例50

正常なIgG1、IgG4、およびIgG1フラグメントとの比較における、IgG4ヒンジレス変異抗体の薬物動態評価

体重24～27gの25匹のSCIDマウス (C.B-17/IcrCrl-scid-BR, Charles-River) を本実験に使用した。マウスをCentral Laboratory Animal Facility (Utrecht, The Netherlands) の隔離施設に移し、上面がフィルターのケージで飼育し、水および食料を自由に与えた。全ての実験は、Utrecht大学の動物倫理委員会による承認を受けた。20

【0288】

モノクローナル抗体は、尾静脈を通じて静脈内投与した。投与から1時間、4時間、24時間、3日、7日、14日、21日、および28日後に伏在静脈から50 μlの血液サンプルを回収した。血液をヘパリン含有バイアルに回収し、10,000gで5分間遠心分離した。mAb濃度の決定のために、血漿を-20 ℃で保存した。30

【0289】

本実験において、ヒンジレスIgG4変種体 (7D8-HG、ロット570-003-EP) のクリアランスを、正常なヒトIgG4 (7D8-IgG4、ロット570-002-EP)、IgG1変種体 (7D8-IgG1、ロット793-001-EP)、F(ab')₂ (7D8-G1-F(ab')₂、ロット815-004-XX)、および後者のmAbのFabフラグメント (7D8-G1-Fab、815-003-X) のそれと比較した。1匹のマウスあたり200 μl中0.1mgの用量の各抗体を、5匹のマウスに投与した。

【0290】

ヒトIgGの濃度は、サンドイッチELISAを用いて決定した。100ng/ウェルの濃度で96ウェルMicrolon ELISAプレート (Greiner, Germany) をコーティングしたマウスマAb抗ヒトIgG-カッパクローニMH19-1 (#M1272, CLB Sanquin, The Netherlands) を、捕捉抗体として使用した。2%ニワトリ血清を補充したPBSでプレートをブロッキングした後、サンプルを添加し、ELISA緩衝液 (0.05% Tween 20および2%ニワトリ血清を補充したPBS) で連続希釈し、プレートシェーカーを用いて室温 (RT) で1時間インキュベートした。その後、プレートを、ヤギ抗ヒトIgG免疫グロブリンのペルオキシダーゼ標識F(ab')₂フラグメント (#109-035-097, Jackson, West Grace, PA) と共にインキュベートし、これを2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS; Roche, Mannheim, Germany) で現像した。マイクロプレートリーダー (Biotek, Winooski, VT) において、405nmの吸光度を測定した。4050

【0291】

SCIDマウスは、血漿IgG濃度が低く、従ってIgGのクリアランスが比較的遅いという理由から選択した。これにより、新生児Fc受容体(FcRn)へのFc部分の結合の消失に起因する迅速なクリアランスを検出するための非常に高感度のPKモデルが確立された。

【0292】

薬物動態分析は、濃度-時間曲線の曲線下面積(AUC)をテイル補正(tail correction)を用いて決定することによって行った。血漿クリアランス速度は、用量/AUC(mL/日)として算出した。GraphPad PRISM vs. 4(Graphpad Software)を用いて統計学的試験を行った。

【0293】

図12は、時間内の濃度の片対数プロットを示す。初期血漿濃度は、ヒンジレス変種体を含めて、全てのインタクトなmAbsについて同じ85~105 μg/mLのオーダーであった。これらの初期濃度は、約1mLの中央分布量(central distribution volume)に対応し、これはマウスの血漿区画への分布と一致する。F(ab')2およびFabフラグメントについては、それよりも低い初期濃度、それぞれ75および4 μg/mLを観察した。Fabフラグメントについては、これは、投与後最初の1時間内での迅速な血管外分布に起因する可能性が高い。

【0294】

図13は、個々のマウスについて算出されたクリアランス速度を示す。ヒンジレス変種体のクリアランス速度は、正常なIgG1およびIgG4のそれよりも3~4倍高かった。しかし、F(ab')2フラグメントのそれよりは10倍超遅く、Fabフラグメントのクリアランスよりも20倍超遅かった。

【0295】

実施例51

免疫コンピテントマウスにおける正常なIgG4およびIgG1 F(ab)2フラグメントとの比較におけるIgG4ヒンジレス変異抗体の薬物動態評価

12匹の8週齢のBalb/cマウス(Balb/CAnNCrl, Charles-River)を本実験に使用した。マウスをCentral Laboratory Animal Facility(Utrecht, The Netherlands)の隔離施設に移し、上面がフィルターのケージ内で無菌条件下で飼育し、水および食料を自由に与えた。全ての実験は、Utrecht大学の動物倫理委員会による承認を受けた。

【0296】

モノクローナル抗体は、尾静脈を通じて静脈内投与した。投与から1時間、4時間、24時間、3日、7日、および10日後に伏在静脈から50 μLの血液サンプルを回収した。血液をヘパリン含有バイアルに回収し、10,000gで5分間遠心分離した。mAb濃度の決定のために、血漿を-20°で保存した。

【0297】

本実験において、ヒンジレスIgG4変種体(7D8-HG、ロット570-003-EP)の血漿クリアランス速度を、正常なヒトIgG4(7D8-IgG4、ロット570-002-EP)、7D8-IgG1由来のF(ab')₂フラグメント(7D8-G1-F(ab')₂、ロット815-004-XX)のそれと比較した。体重1kgあたり4mgの用量に相当する、1匹のマウスあたり200 μL中0.1mgの用量の各抗体を、4匹のマウスに投与した。

【0298】

ヒトIgGの血漿濃度は、サンドイッチELISAを用いて決定した。100ng/ウェルの濃度で96ウェルMicrotron ELISAプレート(Greiner, Germany)をコーティングしたマウスマAb抗ヒトIgG-カッパクローンMH19-1(#M1272, CLB Sanquin, The Netherlands)を、捕捉抗体として使用した。2%ニワトリ血清を補充したPBSでプレートをプロッキングした後、サンプルを添加し、ELISA緩衝液(0.05% Tween 20および2%ニワトリ血清を補充したPBS)で連続希釈し、プレートシェーカーを用いて室温(RT)で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、ヤギ抗ヒトIgG免疫グロブリンのペルオキシダーゼ標識F(ab')₂フラグメント(#109-035-097, Jackson, West Grace, PA)と共にインキュベートし、これを2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS; Roche, Mannheim, Ger

10

20

30

40

50

many)で現像した。マイクロプレートリーダー(Biotek, Winooski, VT)において、405nmの吸光度を測定した。

【0299】

Balb/cマウスは、正常なIgG産生を有し、従ってSCIDマウスよりもIgGのクリアランスが速いという理由から選択した。これにより、投与された抗体が、新生児Fc受容体(FcRn)への結合について内因性のマウスIgGと競合しなければならないマウスモデルが確立された。

【0300】

図15は、時間内の濃度の片対数プロットを示す。初期血漿濃度は全て、100 μg/mlのオーダーであり、これはマウスの血漿区画への初期分布と一致する。ヒンジレスIgG4変種体のクリアランスは、正常なIgG4のそれよりもわずかに速いのみであった。重要なことは、ヒンジレス変種体のクリアランスが、同等の分子サイズを有するF(ab')₂フラグメントのそれよりもずっと遅かったことである。

【0301】

本実験は、Fc部分が、正常な免疫系を有するマウスにおける血漿滞留時間に対して好ましい効果を有することを示し、内因性のIgGの存在下であっても新生児Fc受容体(FcRn)と機能的な相互作用をするという示唆を提供する。

【0302】

実施例52

ヒトIgGを補充したSCIDマウスにおけるIgG4ヒンジレス変異抗体の薬物動態評価

体重18~22gの16匹のSCIDマウス(C.B-17/IcrCrl-scid-BR, Charles-River)を本実験に使用した。マウスをCentral Laboratory Animal Facility(Utrecht, The Netherlands)の隔離施設に移し、上面がフィルターのケージ内で無菌条件下で飼育し、水および食料を自由に与えた。全ての実験は、Utrecht大学の動物倫理委員会による承認を受けた。

【0303】

免疫不全SCIDマウスは、1週間を超える期間のクリアランス試験に影響し得るヒトタンパク質に対する抗体反応を生じないという理由で、ヒンジレスIgG4変種体の薬物動態の研究のために選択した。生理学的に適当な濃度のヒトIgGの存在下でヒンジレスIgG4変異体のクリアランスを研究するため、これらのIgG不全マウスに、高用量の静脈内免疫グロブリン(多種適合性ヒトポリクローナルIgG)を補充した。これは、1)ヒンジレスIgG4の二価形態への会合がIVIGによって妨げられる、および2)ヒンジレスIgG4が、新生児Fc受容体(FcRn)への結合について他のIgGと競合しなければならないことから、ヒトにおける状態をよく再現したマウスマodelを提供する(Bazin R, et al. (1994) J Immunol Methods 172:209)。FcRnへの結合は、IgGを、エンドサイトーシス後の細胞内分解から保護し、その長い血漿半減期を担う。

【0304】

このモデルにおいて、ヒトCD20特異的ヒトmAbクローン7D8由来の変種体の血漿クリアランスを研究した。ヒンジレスIgG4変種体(7D8-HG、ロット992-001-EP)のクリアランス速度を、正常なヒトIgG4(7D8-IgG4、ロット992-002-EP)、7D8-IgG1由来のF(ab')₂フラグメント(7D8-F(ab')₂、ロット892-020-XX)のそれと比較した。さらに、酵素的に脱グリコシル化したヒンジレス変種体の調製物を試験した(TH3001-7D8-HG deglyc、ロット991-004-EP)。体重1kgあたり約5mgの用量に相当する、200 μl中0.1mgの用量の各抗体を、4匹のマウスに尾静脈から投与した。モノクローナル抗体は、静脈内免疫グロブリン(60mg/ml, Sanquin, The Netherlands, JFK108ST, 管理番号04H04H443A)との1:1混合物として投与した。総注射量は400 μl/マウスであり、これは1匹のマウスあたり12.5mgのIVIG用量を与えた。

【0305】

投与から15分、5時間、24時間、2日、3日、7日、および10日後に伏在静脈から50 μlの血液サンプルを回収した。血液をヘパリン含有バイアルに回収し、14,000gで10分間遠心分離した。mAb濃度の決定のために、血漿を-20°で保存した。7D8変種体の血漿濃度は、

10

20

30

40

50

サンドイッチELISAを用いて決定した。マウスmAb抗7D8-イディオタイプ抗体（クローン2F2 SAB 1.1 (LD2), ロット0347-028-EP）を捕捉抗体として使用した。0.05% Tweenおよび2%ニワトリ血清を補充したPBSでプレートをプロッキングした後、サンプルを添加し、ELISA緩衝液（0.05% Tween 20および2%ニワトリ血清を補充したPBS）で連続希釈し、プレートシェーカーを用いて室温（RT）で2時間インキュベートした。注入した抗体を参照として使用した。洗浄後、プレートを、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトF(ab')₂特異的（109-035-097, Jackson Immunoresearch, West Grace, PA）と共にインキュベートし、これを2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS; Roche, Mannheim, Germany）で現像した。マイクロプレートリーダー（Bioteck, Winooski, VT）において、405nmの吸光度を測定した。総ヒトIgG血漿濃度を、同様のELISAを用いて決定した。マウスマAb抗ヒトIgG-カッパクローンMH16（#M1268, CLB Sanquin, The Netherlands）を捕捉抗体として使用した。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG免疫グロブリン（#109-035-098, Jackson, West Grace, PA）を検出のために使用した。

【0306】

薬物動態分析は、濃度-時間曲線の曲線下面積（AUC）をテイル補正を用いて決定することによって行った。血漿クリアランス速度は、用量 / AUC (ml/日) として算出した。GraphPad PRISM vs. 4 (Graphpad Software) を用いて統計学的試験を行った。

【0307】

図20は、上パネルが時間内のmAb 7D8変種体の濃度の片対数プロットを、下パネルが総ヒトIgG濃度を示す。初期総ヒトIgG濃度は平均2.3mg/mlであり、10日後に0.47mg/mlまで低下した。この7D8 IgG4およびIgG4 HG変種体の初期血漿濃度は94～180 μg/mlの範囲であり、これはマウスの血漿区画への初期分布と一致する。F(ab')₂フラグメントについては、初期濃度がいくぶん低く、平均62 μg/mlであった。上パネルから、脱グリコシル化調製物を含むヒンジレス変種体のクリアランスがインタクトなIgG4のそれよりもいくぶん速いが、F(ab')₂フラグメントのそれよりもずっと遅いことが明らかである。以下の表は、濃度-時間曲線から算出されたクリアランス速度を示す。ヒンジレス変種体のクリアランス速度は、正常なIgG4のそれよりも2～3倍高かった。しかし、F(ab')₂フラグメントのそれよりもほぼ10倍遅かった。重要なことは、脱グリコシル化が、ヒンジレスIgG4変種体のクリアランス速度に対して有意な影響を及ぼさなかったことである。

血漿クリアランス速度 (D/AUC) ml/日/kg	IgG1		IgG4 HG		30
	F(ab') ₂	IgG4	IgG4 HG	deglyc	
平均	380	14	39	29	
下位95%の平均CI	346	12	25	19	
上位95%の平均CI	415	17	53	38	
値の数	4	4	4	4	

【0308】

従って、生理学的に適当な濃度のヒトIgGの存在下であっても、ヒンジレス変種体のクリアランスは、同等の分子サイズを有するF(ab')₂フラグメントのそれよりもずっと遅い。本実験は、生理学的に適当な濃度の競合的なヒトIgGの存在下であっても、ヒンジレスIgG4変種体は、新生児Fc受容体（FcRn）と機能的な相互作用をすることができる実証している。さらに、本実験は、ヒンジレスIgG4変種体のグリコシル化が血漿クリアランスに影響せず、非グリコシル化型ヒンジレスIgG4は完全グリコシル化型と類似のインビボ半減期を有することを示している。

【0309】

実施例53

FcRn-/マウスにおける正常IgG4およびIgG1 F(ab')₂フラグメントとの比較におけるIgG4ヒンジレス変異抗体の薬物動態評価

本実験は、IgG4ヒンジレス変異体が、IgGをエンドサイトーシス後の細胞内分解から保護することによりIgGの長い血漿半減期をもたらす新生児Fc受容体（FcRn）と相互作用できるかどうかを調査するために行った。本実験においては、FcRnを発現しないという理由

10

20

30

40

50

から、B2Mノックアウトマウスを使用した。

【0310】

12匹の雌性C57Bl/6 B2Mノックアウトマウス (TaconicモデルB2MN12-M、FcRn-/-マウスと称する) および12匹の雌性C57Bl/6野生型対照マウス (Taconic、モデルnr.B6、WTマウスと称する) を実験に使用した。これらのマウスをCentral Laboratory Animal Facility (Utrecht, The Netherlands) の隔離施設に移し、上面がフィルターのケージ内で飼育し、水および食料を自由に与えた。全ての実験は、Utrecht大学の動物倫理委員会による承認を受けた。

【0311】

ヒトCD20特異的ヒトmAbクローン7D8由来の変種体の血漿クリアランスを研究した。ヒンジレスIgG4変種体 (7D8-HG、ロット992-001-EP) のクリアランス速度を、正常なヒトIgG4 (7D8-IgG4、ロット992-002-EP) 、7D8-IgG1由来のF(ab')₂フラグメント (7D8-G1-F(ab')₂、ロット892-020-XX) のそれと比較した。

【0312】

モノクローナル抗体は、尾静脈を通じて静脈内投与した。体重1kgあたり約5mgの用量に相当する、1匹のマウスあたり200 μl中0.1mgの用量の各抗体を、4匹のマウスに投与した。投与から10分、5時間、24時間、2日、3日、7日、および10日後に伏在静脈から50 μlの血液サンプルを回収した。血液をヘパリン含有バイアルに回収し、14,000gで10分間遠心分離した。mAb濃度の決定のために、血漿を-20 °Cで保存した。ヒトIgGの血漿濃度は、100 ng/ウェルで96ウェルMicroplate ELISAプレート (Greiner, Germany) をコーティングしたマウスマAb抗ヒトIgG-カッパクローンMH19-1 (#M1272, CLB Sanquin, The Netherlands) を捕捉抗体として使用するサンドイッチELISAを用いて決定した。ELISA緩衝液 (0.05% Tweenおよび2%ニワトリ血清を補充したPBS) でプレートをプロッキングした後、サンプルを添加し、ELISA緩衝液で連続希釈した。対応する注入した抗体調製物の連続希釈物を参考として使用した。インキュベーションおよび洗浄後、プレートを、ペルオキシダーゼ標識AffiniPureヤギ抗ヒトIgG、F(ab')₂特異的 (# 109-035-097, Jackson Immunoresearch, West Grace, PA)と共にインキュベートし、これを2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS; Roche, Mannheim, Germany) で現像した。マイクロプレートリーダー (Bioteck, Winooski, VT)において、405nmの吸光度を測定した。薬物動態分析は、濃度-時間曲線の曲線下面積 (AUC) をテイル補正を用いて決定することによって行った。血漿クリアランス速度は、用量 / AUC (ml/日) として算出した。GraphPad Prism vs. 4 (Graphpad Software) を用いて統計学的分析を行った。

【0313】

図21は、時間内の濃度の片対数プロットを示す。初期血漿濃度は全て、100 μg/mlのオーダーであり、これはマウスの血漿区画における初期分布と一致する。以下の表は、個々のマウスの濃度-時間曲線から算出された血漿クリアランス速度を示す。

血漿クリアランス速度 ml/日/kg	F(ab') ₂ WT	F(ab') ₂ FcRn-/-	IgG4 WT	IgG4 FcRn-/-	IgG4 HG WT	IgG4 HG FcRn-/-
平均	183	159	12	45	15	83
標準偏差	19	19	10	3	4	29
値の数	4	4	4	4	4	4
有意差 : P値 (t検定)	0.1265 ns		0.0009 ***		0.0033 **	

【0314】

F(ab')₂フラグメントについては、野生型 (WT) マウスとノックアウト (FcRn-/-) マウスとの間で有意差が観察されなかった。対照的に、IgG4およびヒンジレスIgG4変異体については、WTマウスにおけるクリアランス速度は、FcRn-/-マウスのそれと比較して3~5倍遅かった。本実験は、FcRnの存在が、ヒンジレスIgG4の血漿滞留時間に対して好ましい効果を有することを示している。従って、本実験は、ヒンジレスIgG4がFcRnとインビボで機

10

20

30

40

50

能的な相互作用を行うことができるという証拠を提供するものであり、これによりその良好な血漿半減期が説明される。

【0315】

実施例54

2F8-HG抗EGFr mAbの機能分析

MAb 2F8は、ヒト上皮成長因子受容体 (EGFr) に対するヒトIgG1モノクローナル抗体 (mAb) であり、リガンド結合をブロックすることによってEGFrのシグナル伝達を阻害することができる。このmAbから、IgG4変種体である2F8-IgG4を作製し、合わせてヒンジレス変種体である2F8-HGも作製した。

【0316】

本実施例において、本発明者らは、インビトロ下の細胞内でのリガンド誘導性のEGFrのリン酸化の阻害について2F8-HGの能力と2F8-IgG1および2F8-Fabフラグメントの能力を比較した。これは、全てのIgGサブクラスを含むポリクローナルヒトIgG調製物である静脈内免疫グロブリン (IVIG) を添加しておよび添加せずに行った。

【0317】

EGFrのリン酸化の阻害は、類表皮細胞株A431 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, USA) を用いる二段階アッセイによって測定した。これらの細胞を、96ウェルプレート上の0.5%ヒトアルブミン (ヒトアルブミン20%, Sanquin, the Netherlands) を含有する無血清培地において一晩培養した。次に、mAbを、100または1000 μg/mlのいずれかの固定終濃度のIVIG (免疫グロブリンI.V., Sanquin)と共にまたはそれを含めずに、連続希釈により添加した。37℃で60分間のインキュベーション後、ブロックされていないEGFrの活性化を誘導するため50ng/mlの組換えヒトEGF (Biosource) を加えた。さらに30分間インキュベートした後、細胞を溶解緩衝液 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) を用いて溶解させ、その溶解産物を、1 μg/mlのマウス抗EGF-R抗体 (mAb EGFR 1, BD Pharmingen, San Diego, CA) でコーティングしたELISAプレートに移した。RTで2時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、リン酸化型EGF-Rの結合を、リン酸化型チロシンに特異的なユーロピウム標識マウスmAb (mAb Eu-N1 P-Tyr-100, PerkinElmer) を用いて検出した。最後に、DELFIA増感溶液を加え、EnVisionプレートリーダー (Perkin Elmer)において315nmで励起させ615nmで発光を測定することによって時間分解蛍光を測定した。非直線回帰 (GraphPad Prism 4) を用いてシグモイド形の用量反応曲線を算出した。

【0318】

図14の上パネルに示されるように、2F8-HGは、IVIGを添加せずに培地を使用した場合に、リン酸化の阻害に関して2F8-IgG1と同等の効果を有した。両方のmAbは、EGFrに一価的に結合する2F8-Fabフラグメントよりも強力であった。図14の中パネルおよび下パネルは、IVIGの添加が2F8-IgG4および2F8-Fabに対して無視できる程度の効果しか有さないことを示す。しかし、それは2F8-HGの用量反応曲線を顕著に右側にシフトさせており、このことは結合特性の変化を示しており、これは、特定の条件下で2F8-HGは二価抗体として振る舞う場合があるがポリクローナルヒトIgGの存在下では一価型に解離するという考えに沿うものである。

【0319】

実施例55

原理の証明：CD89に対するIgG4ヒンジレス (CD89-HG) はマウスモデルにおけるIgE媒介性の喘息を阻害する

Pasquierら (Pasquier, B et al., Immunity 22, 31(2005)) は、Fc RI (CD89 (Monteiro RC et al., Annu Rev Immunol 21, 177(2003))) が抗炎症的な役割および炎症促進的な役割の両方を有することを示した。Fc RIの凝集は、Sykの動員およびSHP-1結合の中止により細胞の活性化を導く。Fc RIとの単量体的相互作用は活性化反応を阻害し：SHP-1が動員され、Syk、LAT、およびERKのリン酸化に障害が起こる。

【0320】

10

20

30

40

50

抗CD89抗体のFabフラグメント（クローンA77）は、ヒト単球を用いたIgG媒介性の貪食作用を阻害できた。さらに、Fc RIをトランスフェクトしたRBL-2H3細胞を用いたインビトロのおよびIgE媒介性の喘息モデルにおけるインビボのIgE媒介性反応は、この抗CD89抗体のFabフラグメントによって阻害された。この動物モデルにおいて、Fc RIトランスジェニックマウス（Launay P et al., J Exp Med 191, 1999(2000)）は、TNP-OVAで感作された。A77 Fabフラグメントの存在下でIgE-TNP-OVA免疫複合体の鼻腔内チャレンジを受けたマウスは、メタコリンに対する気管支反応の低下を示したのに対して、無関係のFabフラグメントは気管支の反応亢進性を低下させることができた。

【0321】

抗原特異的、非架橋的、一価的、非活性化性の抗体のインビトロでの原理に関する証明は、以下の実験から得られる。付着性のPBMCを、無関係のIgG4（Genmab BV）と共にもししくはそれを加えず24時間プレインキュベートした10 μg/ml A77-HG（IgG4ヒンジレス）と共にまたは無関係のHG抗体と共に37℃で30分間インキュベートし、洗浄し、ポリクローナルウサギ抗大腸菌IgG抗体を製造元の指示に従い用いてオプソニン化したまたはそれを行わなかったテキサスレッド結合型大腸菌（50細菌／細胞）（Molecular Probes, Eugene, OR）と共に37℃で30分間インキュベートした。共焦点レーザー顕微鏡にスライドを装着し試験した。オプソニン化大腸菌およびA77-HG（無関係のIgG4と共にプレインキュベート）を与えられたPBMCは、オプソニン化大腸菌および対照HG抗体を与えられたPBMCと比較して、大腸菌の貪食作用の低下を示す。

【0322】

Fc RIトランスジェニックマウスを、記載されたようにTNP-OVAで（Pasquier, B et al., Immunity 22, 31(2005)）；あるいはDeurlooら（Deurloo D T et al., Clin Exp Allergy 33, 1297(2003)）により記載されたようにOVAで感作する。ヒトFc RIトランスジェニックマウスおよび同腹仔対照を、第0日および第7日の二回、水酸化アルミニウム中のTN-P-OVAまたはOVA（Sigma）を用いて腹腔内免疫する。マウスに、連続する数日間、20 μg抗DNP-IgEと複合体化させたTNP-OVA（Zuberi R I et al., J Immunol 164, 2667(2000)）またはOVAエアゾール（Deurloo D T et al., Clin Exp Allergy 33, 1297(2003)）のいずれかを用いて、A77-HG（IgG4ヒンジレス）または無関係のヒンジレス抗体（対照HG）の存在下で鼻腔内チャレンジを行う。

【0323】

マウスに、50 μg A77-HGまたは対照HGを、チャレンジ期間内に一度と最後の鼻腔内チャレンジと共に一度の二度、鼻腔内から与える。最後の鼻腔内チャレンジから12時間後、マウスを全身プレチスマグラフチャンバー（BUXCO Electronics, Sharon CT, USA）に置き、300mMメタコリンを与える。メタコリン曝露後に気道の抵抗性を測定する。免疫組織学的評価は、マウスを安樂死させた後、肺切片において行う。

【0324】

A77-HGを与えられたマウスは、対照HG抗体を与えられたマウスと比較して、反応亢進性の低下を示す。

【0325】

このことは、ヒンジレスIgG₄分子が、非架橋性の一価かつ非活性化性であり、従ってこのような不活性な抗体が望ましい治療目的において、例えばFc RIを通じた炎症反応の阻害において有用であることを示す。

【0326】

実施例56

ヒンジレスIgG4 cMet (cMet-HG) を用いたコンセプト証明実験

受容体チロシンキナーゼ-cMetは、様々な上皮細胞において顕著に発現される。胚形成時、cMetおよび肝細胞増殖因子／細胞分散因子（HGF/SF）は、上皮細胞、筋内皮、ならびに神経系および造血系の適当な組織へと導く組織特異的な分化に関与する。異常なcMetのシグナル伝達は、腫瘍形成、特に侵襲性および転移性の腫瘍の発生に関与する。cMet活性の亢進の結果として、腫瘍細胞はその成長速度を増加させ、アポトーシスに対して抵抗性

10

20

30

40

50

を得ることで、成長および／または生存上の優位性を獲得する。さらに、cMetの活性化は、細胞骨格の再編成およびインテグリンの活性化、ならびに細胞外マトリクスの分解に関するタンパク質分解系の活性化をもたらし、侵襲能および転移能を亢進する。従って、HGF/SF-cMetのシグナル伝達の阻害は、悪性腫瘍の処置における重要な治療経路である。

【0327】

Kong-Beltranらは、Cancer Cell (2004年第6版、75～84ページ)において、cMetの細胞外ドメインに対して抗体(5D5)を惹起し、HGFの結合を阻害した。抗Met 5D5のFabフラグメントは、HGF誘導性のcMetのリン酸化、細胞の運動性、移動、および腫瘍の成長を阻害することが示された。同著者らは、抗cMet-5D5-Fabが立体的妨害により受容体の二量体化をブロックするという仮説をたてた。10

【0328】

MAb C6は、ヒトcMetに対するヒトIgG1モノクローナル抗体(mAb)であり、高い親和性でH441細胞に結合することができ、cMetのリン酸化を活性化し、DU-145の分散を誘導し、ELISAにおいてHGFがcMetに結合するのをブロックする。このmAbから、Fabフラグメント(cMet-Fab)、IgG4変種体(cMet-IgG4)、およびヒンジレス変種体も作製した(cMet-HG)
。

【0329】

cMetに対するヒンジレスIgG4(cMet-HG)を用いる実証実験において、この一価抗体は、HGFの結合、受容体の二量体化／活性化、細胞の分散、および下流へのシグナル伝達を阻害した。本実験は、全てのIgGサブクラスを含むポリクローナルヒトIgG調製物である静脈内免疫グロブリン(IVIG)を添加しておよびこれを添加せずに、ならびにrHGFを用いておよびこれを用いずに行った。20

【0330】

DU-145分散アッセイ

DU-145(ヒト前立腺癌細胞株、ATCC HTB-81)細胞を、DMEM+(500ml MEM Dulbecco(DMEM、グルコース4.5g/ml、NaHCO₃含有、グルタミン非含有、Sigma、D-6546)、50ml Cosmic Calf Serum(Hyclone SH30087.03)、5mlの200mM/L L-グルタミン(Bio Whittaker, BE17-605F)、5mlピルビン酸ナトリウム(Bio Whittaker BE13-115E)、5mlペニシリソノストレプトマイシン(Bio Whittaker DE17-603E)含有)中で培養し、付着性のクラスター細胞を成長させた。rhHGF(Sigma, H-1404)の添加によって、細胞の移動を誘導し、これにより単一細胞を得た。このプロセスを分散法(scattering)と呼んだ。分散の誘導または阻害は、顕微鏡で観察した。30

第一日：cMet、cMet-HG、cMet-Fab、cMet-IgG4(30/3.0/0.3/0.03μg/ml)を、IVIG、6mg/mlを添加しておよびこれを添加せずに一晩インキュベートした。DU145細胞を接種し(T75培養フラスコ由来の付着細胞)、細胞培養上清を取り除き、細胞を10ml PBSで一回洗浄し、2mlチロシン/EDTAを加え(37℃)、細胞を37℃で1～2分間インキュベートした。この細胞を、タッピング法によって培養フラスコ表面から収集し、保存しておいた培養上清を用いてチロシン/EDTA反応を停止させた。この細胞を計数し、新鮮な培地を用いて1*10⁴細胞/mlの懸濁物を調製し、50μl/ウェルを96ウェルプレート(Sterile flat bottom Costar, 3596)にプレーティングした(最終密度1000細胞/ウェル)。細胞を、インキュベーター内で、37℃、5% CO₂下で15～24時間培養した。40

第二日：培地を新鮮な培地、40μl/ウェルに交換した。40μlのプレインキュベートした抗体を細胞に添加し、細胞をインキュベーター内で37℃で60分間インキュベートした後、40μl/ウェルの培地または60ng/ml rh-HGFを加えた(最終濃度は10/1.0/0.1/0.01μg/ml Ab、2mg/ml IVIG、20ng/ml HGFであった)。細胞を少なくとも24時間インキュベートした。

第三日および第四日：分散は、24時間または48時間後に、二重盲検下で、顕微鏡により観察した。分散の形態学的特徴：細胞は表面から剥離し、紡錘状の形態(移動)を示し、大部分はクラスターに含まれない単一細胞であった。

抗体によるrh-HGF誘導性の分散の阻害の等級：

10

20

30

40

50

- 3 細胞は最大限に分散した
- 2 小規模の分散の阻害
- 1 分散の阻害
- 0 分散なし。

【0331】

本実験において、IVIGと共にプレインキュベートしたC6-HGは、HGF誘導性の分散を有意にブロックした。

【0332】

cMet受容体のリン酸化

A549細胞を、Ham's F12培地で培養し、cMetは正常な培養条件下でリン酸化されなかつた。HGFによる活性化によって、cMet受容体はリン酸化状態になる。IVIGのプレインキュベーションを行ったcMetをブロックするcMet-FabまたはcMet-HGを適用することにより、HGF媒介性の受容体のリン酸化が阻害された。 10

第一日：cMet-IgG1、cMet-HG (12.5 μg/ml) を、IVIG、2.5mg/mlを添加しておよびこれを添加せずに一晩インキュベートした。A549細胞 (1*10⁶/ウェル) を6ウェルプレートにて培養した。

第二日：培地 (500ml Ham's F12 (Bio Whittaker BE12-615F)、50ml Cosmic Calf Serum (Hyclone SH30087.03)、5mlの200mM/L L-グルタミン (Bio Whittaker, BE17-605F)、5mlペニシリン / ストレプトマイシン (Bio Whittaker, DE17-603E) 含有) を取り除き、800 μlのプレインキュベートした抗体を細胞に添加し、細胞をそれと共にインキュベーター内で37℃で15分間インキュベートした後、200 μl/ウェルの培地または80ng/ml rh-HGFを加えた。(最終濃度は10 μg/ml Ab、2mg/ml IVIG、16ng/ml HGFであった)。さらに15分間インキュベートした後、インキュベーション培地を取り除き、細胞を氷冷PBSで二回洗浄し、250 μl RIPA溶解緩衝液 (50mM Tris、pH7.5、0.5%デオキシコール酸Na、および0.1%ノニデットP40、150mM NaCl、0.1% SDS、2mMバナジン酸、ならびにComplete (プロテアーゼ阻害剤、Roche 1836170) 含有) を加え、プレートを4℃で10分間穏やかに回転させた。その溶解産物を事前に冷やしておいたチューブ (エッペンドルフ) に移し、4℃で30分間、高速で遠心分離を行った。DNAを除去し、フラクションをBCAタンパク質含有量分析 (Pierce) の測定に使用した後、溶解産物をN₂下で瞬間凍結させた。溶解産物は、ウェスタンプロットにより分析するまで-80℃で保存した。標準的な手順に従い、10 μgの還元型サンプルを、4~20% Tris-HCl Criterion Precastゲル (Biorad 345-0033) 上での電気泳動およびニトロセルロースメンブレン (Biorad 162-0114) 上でのウェスタンプロットに供した。メンブレンを、ローラーバンクにおいてブロッキング溶液 (TBST (Tris-HCl 20mM pH7.5、NaCl 150mM、0.1% Tween 20) 中に5%のBSA (Roche, 10735086) 含有) を用いて室温で1.5時間ブロックした。このメンブレンを、1:1000希釈の抗ホスホ-Met (pY pYpY 1230 1234 1235) -ウサギIgG (Abcam, ab5662) と共に4℃で一晩インキュベートした。TBSTで6回洗浄した後、二次抗体、ヤギ抗ウサギHRP, Cell Signalling, 7074 (1:2000) を含むブロッキング試薬を、ローラーバンクにおいて室温で60分間インキュベートした。メンブレンをTBSTで6回洗浄した。最後に、Luminol Echancerトップソリューション (Pierce 1856145) を用いてバンドを現像し、Lumi imagerで分析した。 30

【0333】

IVIGと共にプレインキュベートしたcMet-HGは、この受容体のHGF媒介性のリン酸化を阻害する。

【0334】

図22

DU-145細胞を培養し、(A) cMet-Fab、cMet-FabおよびIVIG、cMet-FabおよびHGF、cMet-FabおよびIVIGおよびHGF (B) cMet-HG、cMet-HGおよびIVIG、cMet-HGおよびHGF、cMet-HGおよびIVIGおよびHGFの連続希釈物と共にインキュベートした。分散は、48時間後に、二重盲検下 (14名による記録) で、顕微鏡により観察し、平均スコア ± SEMをプロットしている。 50

【0335】

IVIGを加えたまたは加えていないcMet-Fab (A) およびIVIGと共にプレインキュベートしたcMet-HG (B) は、HGF誘導性の分散を用量依存的に有意にブロックした。

【0336】

図23

DU-145細胞を培養し、 $10 \mu\text{g/ml}$ の(A) cMet-Fab、cMet-FabおよびIVIG、cMet-FabおよびHGF、cMet-FabおよびIVIGおよびHGF (B) cMet-HG、cMet-HGおよびIVIG、cMet-HGおよびHGF、cMet-HGおよびIVIGおよびHGFと共にインキュベートした。分散は、48時間後に、二重盲検下(14名による記録)で、顕微鏡により観察した。

【0337】

10

IVIGを加えたまたは加えていないcMet-FabおよびIVIGと共にプレインキュベートしたcMet-HGは、HGF誘導性の分散を有意に阻害した。統計分析のために、仮の中央値3(最大分散)を用いて両側ウイルコクソン符号付き順位和検定を行った。

【0338】

図24

cMet-HG (レーン1)、cMet-HGおよびIVIG (レーン2)、cMet-HGおよびHGF (レーン3)、cMet-HG、IVIG、およびHGF (レーン4)、cMet-IgG1 (レーン5)、cMet-IgG1およびIVIG (レーン6)、と共にインキュベートしたA549細胞から調製した抽出物を、4~20% Tris-HCl Criterion Precastゲル上でのSDS-PAGEおよびニトロセルロースメンブレン上でのウェスタンプロットによって分離した。このメンブレンを、抗ホスホ-Met (pYpYpY 1230 1234 1235) -ウサギIgG (Abcam, ab5662)と共に4度一晩インキュベートした。TBSTで洗浄した後、二次抗体、ヤギ抗ウサギHRP, Cell Signalling, 7074を含むブロッキング試薬を、ローラーバンクにおいて室温で60分間インキュベートした。このメンブレンをTBSTで6回洗浄した。最後に、Luminol Enhancerトップソリューションを用いてバンドを現像し、Lumiimagerで分析した。ウェスタンプロットは、ホスホ-Met (pYpYpY 1230 1234 1235)を示す169Kdのバンドを示している。

20

【0339】

実施例57

上皮成長因子受容体(EGFr)を標的化するIgG4ヒンジレス変異抗体のインビトロ評価：結合アビディティおよび抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)の誘導

30

本実験においては、上皮成長因子受容体(EGFr)を標的化するIgG4ヒンジレス変異抗体であるmAb 2F8-HGを、2F8-IgG4、2F8-IgG1、および2F8-Fabと称する、それぞれ、IgG4バージョン、IgG1バージョン、およびFabフラグメントと比較した。このインビトロ評価は、ELISAにおけるEGFrに対する結合のアビディティおよびADCCの誘導を含むものであった。

【0340】

ELISA

結合親和性は、精製されたEGF-R (Sigma, St Louis, MO)、50ng/ウェルで96ウェルMicroplate ELISAプレート(Greiner, Germany)をコーティングしたELISAを用いて決定した。プレートを、0.05% Tween 20および2%ニワトリ血清を補充したPBSでブロックした。その後、 $100 \mu\text{g/ml}$ のポリクローナルヒトIgG(静脈内免疫グロブリン、IVIG、Sanquin Netherlands)を含有する緩衝液に連続希釈したサンプルを加え、室温(RT)で一時間インキュベートした。その後、プレートを、検出抗体としてのペルオキシダーゼ結合型ウサギ抗ヒトカッパ軽鎖(DAKO, Glostrup, Denmark)と共にインキュベートし、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS; Roche, Mannheim, Germany)で現像した。マイクロプレートリーダー(Biotek, Winooski, VT)において、405nmの吸光度を測定した。

40

【0341】

図16は、2F8-HGおよび2F8-Fabの結合曲線が重ねる合わせることができ、IgG1およびIgG4の結合曲線に対して明らかに右側にシフトしていることを示している。このEGFrコート

50

に対するアビディティの違いは、IVIGの存在下で2F8-HGが、ちょうどFabフラグメントと同じ様に一価的に結合するという考え方と一致するものである。

【0342】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)

腫瘍細胞のエフェクター細胞依存的な溶解を誘導する能力を、クロム51(^{51}Cr)放出アッセイにおいて評価した。標的A431細胞(2~5×10⁶細胞)を、37℃で1時間の震盪条件下で100 μCi Na₂ $^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)で標識した。細胞をPBSで三回洗浄し、これを培地に1×10⁵細胞/mlとなるよう再懸濁した。標識した細胞を96ウェルプレートに分配し(5×10³、50 μl/ウェル中)し、20 μg/ml~0.02ng/ml(終濃度)の範囲のmAbの培地への10倍連続希釈物50 μlと共にプレインキュベート(RT、30分間)した。自然発生的な ^{51}Cr の放出を決定するために培地を抗体の代わりに加え、最大 ^{51}Cr 放出を決定するためにtriton X100(1%終濃度)を加えた。その後、PBMCをウェルに加え(5×10⁵/ウェル)、細胞を37℃で一晩インキュベートした。次の日、ガンマカウンターにおける1分間あたりのカウント数(cpm)を決定することによる ^{51}Cr 放出の測定のために、上清を収集した。細胞の細胞傷害性の割合は、次式を用いて算出した：

$$\text{比溶解率} (\%) = (\text{実験放出値 (cpm)} - \text{自然発生的な放出 (cpm)}) / (\text{最大放出 (cpm)} - \text{自然発生的な放出 (cpm)}) \times 100$$

式中の最大 ^{51}Cr 放出は標的細胞にtriton X-100を添加することによって決定し、自然発生的な放出は感作した抗体およびエフェクター細胞の非存在下で測定した。

【0343】

図17は、2F8-HGが、2F8-IgG4と同様にADCCを誘導せず、一方2F8-IgG1はこの局面において非常に強力であることを示している。

【0344】

実施例58

AlgoNomics社のEpibase(登録商標)プラットフォームをIgG4定常ヒンジレス一価抗体に適用した。手短に説明すると、このプラットフォームは、標的配列由来の全ての潜在的な10マーペプチドのHLA結合特異性を分析するものである(Desmet et al. 1992, 1997, 2002, 2005)。プロファイリングは、20のDRB1、7のDRB3/4/5、14のDQ、および7のDPについて、すなわち合計48のHLAクラスII受容体についてアロタイプレベルで行われる。

【0345】

Epibase(登録商標)は、48のHLAクラスII受容体の各々についてのペプチドの結合の自由エネルギーの量的概算値 Gbindを算出する。その後、これらのデータは、以下のようにさらに処理され：ペプチドは強(S)バインダー、中(M)バインダー、弱および非(N)バインダーに分類される。

【0346】

IgG4ヒンジレス一価抗体の定常領域において、強結合エピトープは発見されず、中結合エピトープは1つのみ発見された。この単一のネオエピトープは、中のDRB1*0407バインダーを構成するものであった。DRB1*0407は、カフカス人集団の2%未満に存在する少数派のアロタイプである。さらに、中強度の単一のエピトープというものは、免疫原性が最低の抗体であっても総エピトープカウントにおいて重要とならない。

【0347】

結論として、ヒンジレス一価IgG4抗体は、免疫原性である可能性が非常に低いことが予測される。

【0348】

実施例59

ユニボディ-CD4について示された実施例59および60において使用した研究背景および材料 CD4に対するヒトモノクローナル抗体(HuMax-CD4)がHIV-1感染を阻害する能力を検討するため、インビトロおよびインビボ実験を行った。この抗体は、CD4のドメイン1に対する抗体であり、CD4のHIV-1 gp120結合部位と重複している。

【0349】

10

20

30

40

50

本実施例(59)は、抗CD4抗体のFabフラグメントが、様々な初代単離体およびT細胞株適応型HIVウイルスによるCD4-CCR5細胞またはCD4-CXCR4細胞への感染を阻害することを示す。阻害のIC50値は、sCD4および細胞結合型CD4へのHuMax-CD4の結合のEC50値の範囲内であり(データは示さず)、このことから阻害機構としてCD4に結合するHIV-1エンベロープの阻害が示唆される。一般的に、HuMax-CD4のFabフラグメントは、Fabと全長抗体の間のアビディティの違いから予測されるように、全長抗体よりも10倍低い効率で阻害する。

【0350】

実施例60は、HuMax-CD4で処置したマウスにおいて、IgG対照処置グループよりも小幅のCD4/CD8比較比の下降が観察されることを示しており、このことは、HuMax-CD4が、HIV-1によるCD4陽性細胞の枯渇を予防することを示している。さらに、HuMax-CD4処置は、時間内に血中のHIV-1 RNAコピー数の減少をもたらすが、IgG対照処置はこの減少を誘導しない。このインビトロデータは、抗CD4抗体が、HIV-1誘導性のCD4枯渇を予防し、HIV感染およびウイルス量の規模を縮小させることを示している。

【0351】

Norrisらは、IgG4サブクラスの全長抗CD4(ドメイン2)抗体を用いるHIV-1感染者の処置に関する発表を行った。

- ・ 有効性結果は、主なエンドポイント(第24週)で有意な抗ウイルス活性を実証した。
- ・ TNX-355を与えた患者における第48週の結果から持続的反応が示唆された。
- ・ TNX-355 10mg/kg + OBRは、HIV-RNAに関して、第48週において基準からの $0.96 \log_{10}$ の減少を実証し、一方プラセボ+OBRについては $0.14 \log_{10}$ の減少であった($p < 0.001$)。
- ・ TNX-355 15mg/kg + OBRは、HIV-RNAに関して、第48週において基準からの $0.71 \log_{10}$ の減少を実証し、一方プラセボ+OBRについては $0.14 \log_{10}$ の減少であった($p = 0.009$)。
- ・ TNX-355 + OBR処置は、第48週のCD4+細胞に関して、10mg/kgアーム(+48細胞、 $p = 0.031$)および15mg/kg(+51細胞、 $p = 0.016$)アームの両方において、プラセボの増加(+1細胞)に対して統計的に有意かつ臨床的に有意義な増加を示した。

【0352】

文献

Zwick M.B., Wang M., Poignard P., Stiegler G., Katinger H., Burton D.R., and Parren P.W.H.I. 2001. Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J Vir* 75:12198.

Poignard P., Sabbe R., Picchio G.R., Wang M., Gulizia R.J., Katinger H., Parren P.W.H.I., Mosier D.E., and Burton D.R. 1999. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* 10:431.

Norris D., Moralis J., Gathe J., Godafsky E., Garcias F., Hardwick R., and Lewis S. 2006. Phase 2 efficacy and safety of the novel viral-entry inhibitor, TNX-355, in combination with optimized background regimen (OBR). *XVI International AIDS Conference, Toronto, Canada*

【0353】

HUMAX-CD4全長抗体およびHUMAX-CD4抗体のFABフラグメントによるインビトロHIV-1中和本法は、Zwick et al 2001に詳細に記載されている。要約すると、抗体によるウイルスの中和の程度をルシフェラーゼ活性により測定した。一回の複製にコンピテントなウイルスを、適当なウイルス構築物を含む改良型pSVIIIenvベクター(例えば、初代単離体:JR-CSF、JR-FL、SF162、ADA、YU2、89.6、US143、およびT細胞株適応型ウイルス:IIIB)およびpNL4-3.luc.R-E-の共トランスクレクションによって作製した。ウイルスを、様々な

10

20

30

40

50

量の抗体と共にプレインキュベートし、その後、約100,000カウントを生じるよう測定された量をU87.CD4.CCR5細胞（初代単離体）またはCD4-CXCR4細胞（IIIBの場合）に添加し、3日間培養した。このウェルを洗浄し、ルシフェラーゼ細胞培養溶解試薬と共にインキュベートし、溶解産物を不透明なアッセイプレートを移し、ルミノメーターにおいてルシフェラーゼアッセイ試薬を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。HuMax-CD4およびHuMax-CD4のFabフラグメントを中和について試験した。

【0354】

記載される方法に従い、ウイルス構築物YU2、IIIB、ADA、89.6、US143、JR-FL、JR-CSF、およびSF 162を、ルシフェラーゼアッセイ発現系を用いるインピトロ中和アッセイに使用した。HIV-1 IIIBは、T細胞株適応型ウイルスであり、他の全てのウイルスは、HIV-1の初代単離体である。HuMax-CD4抗体およびHuMax-CD4抗体のFabフラグメントを、1:2希釈で添加し、反応を図25に示される濃度で開始した。図27において、4パラメータロジスティック分析によりフィットさせた曲線をHuMax-CD4抗体およびHuMax-CD4抗体のFabフラグメントについて示し、図25においては、これらのフィットから算出されたIC50を示す。これらのデータは、HuMax-CD4抗体が試験した全てのウイルスの感染を阻害し、全体としてそのFabフラグメントよりも10倍高い効果を有していたことを示している（YU2およびJR-CSFは例外）。HuMax-CD4のsCD4に対する結合についてのEC50は、約0.3~1nMであることが決定された。阻害のIC50値はこれらのEC50値の範囲内にあり、このことはHuMax-CD4による受容体の占拠が感染の阻害の程度に関係することを示している。

【0355】

本発明者らの実験は、抗CD4抗体の一価結合（すなわちFabフラグメント）による、CXCR4およびCCR5の両方のHIV-1補助受容体発現細胞のHIV-1感染の効果的な阻害についての原理の証明を提供する。これは、同様の阻害がHG抗CD4抗体によって達成できることの証拠を提供するものである。

【0356】

実施例60

HIV感染のインビポhu-PBMC SCIDマウスモデルにおけるCD4+ T細胞枯渇の予防

本実験の手順は、Poignard et al 1999に詳細に記載されている。要約すると、CB-17 SCIDマウスを、約 25×10^6 個の正常ヒトPBMC（末梢血単核球）で再構成した。約2週間後、この動物にHIV-1（HIV-1_{JR-CSF}）を注射した。三日後、この動物を、1mg/ml HuMax-CD4もしくはヒトIgGアイソタイプ対照抗体で、腹腔内から送達して処置するか、または処置を行わない。血液サンプルは、注射から1時間後、6時間後、1日後、2日後、3日後、6日後、9日後、13日後、および15日後に採取し、二週間後にこの動物を安樂死させてFACS分析を行い、ヒト細胞の%（H2Kd-PEおよびヒトCD3-APCを用いて）およびCD4/CD8比（CD4-PEおよびCD8-APCの二重染色を用いて）を決定した。さらに、血漿ウイルス量を、定量Roche RT PCRアッセイによりHIV-1 RNAレベルを測定することによって測定した。さらに、直接的なsCD4結合ELISA（sCD4をプレートにコーティング、および抗Fcポリクローナル抗体による検出）によって、血漿中のHuMax-CD4の濃度を決定した。

【0357】

図28には、この動物の血漿レベルが示されている。HuMax-CD4の注射は、高いHuMax-CD4の血漿濃度をもたらし、これは15日目にあってもなお100 μg/mlを超えるものであったことが結論付けられた。未処置マウスは、バックグラウンドを超える測定可能な値を示さなかつた。

【0358】

図26には、実験の最後にマウスから収集した細胞数が示されている。このデータは、HIV-1感染が、CD4/CD8比の低下により示されるように、CD4陽性T細胞の著しい低下をもたらしたことを見ている。このことは、CD4陽性T細胞が、HIV-1によって血液から迅速に枯渇され、一方非感染マウスにおいては一定レベルで保たれることを示している。HuMax-CD4でip処置したマウスは、CD4/CD8比の低下がずっと小さく、これはHuMax-CD4がHIV-1によるCD4陽性細胞の枯渇に対する予防を提供することを示している。図29には、時間内の血

10

20

30

40

50

液1mlあたりのHIV-1 RNAコピー数が示されており、これらのデータは、HuMax-CD4処置が、時間内に血液中のHIV-1 RNAコピーの量を減少させるが、アイソタイプ対照抗体は減少させなかったことを示している。

【0359】

本発明者らの実験は、インビボでのHIV-1感染時のCD4細胞の枯渇に対する予防についての原理の証明を提供する。この枯渇に対する予防は、全長抗CD4抗体それ自体がCD4枯渇特性を有するにもかかわらず観察される。このことは、一価の非枯渇性抗CD4抗体、例えば抗CD4 HG抗体による処置によって、HIV-1誘導性のT細胞枯渇に対するより強力な予防が獲得できることを示している。抗CD4 HGによるHIV-1の中和およびCD4枯渇に対する予防についての原理の証明は、同様の実験設定で得ることができる。このことは、長いインビボ半減期を示すHuMax-CD4 HGがHIV-1感染およびHIV-1のウイルス量を阻害し、CD4陽性細胞の枯渇を予防できるという証拠を提供する。10

【0360】

結果のまとめ

実施例において示されたデータは、ヒンジエクソンのスプライスドナー部位を破壊することによるヒンジレスIgG4抗体の発現によりヒンジレスIgG4半分子（1つの重鎖および1つの軽鎖の組み合わせ）が得られることを示している。IgG4ヒンジレス半分子の存在は、非還元条件下でのSDS-PAGE、質量分析、サイズ排除クロマトグラフィ、および放射免疫アッセイにおける架橋能力の欠如により確認される。ヒンジレス抗体は、天然型のIgG1およびIgG4抗体分子と同じ抗原結合特異性を保持する。このことは、異なる特異性を有する二つのヒンジレス抗体、7D8-HG（B細胞抗原CD20特異的）およびBetv1-HG（樺花粉抗原Bet v 1特異的）について示されている。7D8-HGのC1q結合は認められず、微量の補体依存性細胞傷害性（ADCC）のみが観察される（天然型の7D8-IgG4抗体と同等）。ヒンジレス半分子の一価性は、Betv1-HGを用いて架橋実験において示されている。IgG1およびIgG₄は両方ともセファロース結合型Bet v 1と放射標識Bet v 1の架橋を示すが、ヒンジレス分子Betv1-HGは架橋することができない。20

【0361】

7D8-HGの半減期は、マウス薬物動態（PK）実験においてインビボで評価され、7D8-IgG4と比較されている。7D8-HGは、このモデルにおいて、正常なIgG4よりも2~3倍速いクリアランスを有するが、6日間という半減期は、IgG F(ab')2フラグメントについて報告されている1日未満の半減期よりも好ましい。本発明者らは、この好ましいPKプロフィールが、非架橋性、一価性、かつ非補体活性化性の抗体を必要とする治療適用においてIgG4ヒンジレス抗体が有益であるゆえんであるとの結論に至った。30

【0362】

実施例61

2F8-HGのCH3変種体の構築および生化学分析

無関係な抗体の存在の有無を問わず二量体化を防ぐために、CH3領域にさらなる変異が導入された。CH3変異体の発現のための構築物を作製するために、部位特異的変異誘発を用いてpTomG42F8HGに変異が導入された。構築物は一過性に発現された。40

【0363】

CH3変異HG分子が単量体か二量体のどちらとして存在するのかを探るために、上述のように質量分析法が採用された。

【0364】

図30は非共有結合性ナノエレクトロスプレイ質量分析を用いて得られた各々のHG変異体の単量体 / 二量体比のまとめを示す。CH3変異体は2F8-HG（WT）と比較して、単量体 / 二量体比の実質的な上昇を示した。単量体として存在する分子の割合は、2F8-HG（WT）の15%から、R277Aを除く大部分のCH3変異体の>80%へと上昇した。IgG4骨格にIgG1配列を導入するHG変異R277Kは、陰性対照として使用された。予想通り、この変異体は二量体として振る舞った。

【0365】

50

CH3変異体の単量体または二量体の構成は、図31に示すように製造元の指示に従ってNativePAGE™ Novex（登録商標）ビストリスゲル電気泳動（Invitrogen, Carlsbad, California）を用いて確認された。この未変性ゲル電気泳動技術は、SDSの代わりに電荷シフト分子としてクマシーG-250を使用し、未変性のタンパク質立体配座およびタンパク質複合体の四次構造を維持することができる（Schagger H and von Jagow G 1991 Blue native gel electrophoresis for isolation of membrane complexes in enzymatically active form. Anal. Biochem. 199:223-244）。

【0366】

これらの実験条件下では、2F8-HG (WT) およびR277KおよびR277Aは完全な四量体（二本の重鎖および二本の軽鎖）のサイズに対応するタンパク質バンドを示した。CH3変異体T23 4A、L236A、L236V、F273A、F273L、およびY275Aは半分子（一本の重鎖および一本の軽鎖のみ）であることが示された。
10

【0367】

実施例62

2F8-HGのCH3変異体の機能分析

2F8-HG (WT) および変種体の結合は、200 μg/mlポリクローナルヒトIgG (Intravenous Immunoglobulin, IVIG, Sanquin, Netherlands) の存在および非存在下で決定された（実施例57に記載）。

【0368】

図32および33はIVIG存在下での2F8-HGの結合曲線が、IVIGのない場合の2F8-HGの結合曲線に対して明らかに右側にシフトすることを示す。EGFrコートに対するアビディティの差は、IVIGの存在下では2F8-HGは一価で結合するという考え方と一致する（実施例57を参照されたい）。試験されたいいくつかの変異、2F8-HG-T234A、2F8-HG-L236V、2F8-HG-L236A、および2F8-HG-Y275Aの結合曲線は、IVIGの添加に対して非感受性になり、IVIGの存在下での2F8-HGの一価結合曲線に重ね合わせることができた。EGFrコートに対するアビディティのこれらの差は、2F8-HG-T234A、2F8-HG-L236V、2F8-HG-L236A、および2F8-HG-Y275A変異がHG分子の二量体化を防ぐという考え方と一致する。
20

【0369】

実施例63

2F8-HGのCH3変異体の機能分析

2F8-HGのCH3変異体は、EGFrタンパク質でコートした結合ELISAにおいて、2F8-HGよりも見かけ上低い親和性でEGFrに結合することが示された（上記を参照されたい）。インピトロでの細胞内でのリガンド誘導性のEGFrのリン酸化を阻害する2F8-HG CH3変異体の能力は、実施例54に記述されるように、リン酸化阻害アッセイ（PIA）において2F8-HG (WT) および2F8-Fabフラグメントと比較された。

【0370】

CH3 HG変異体は、2F8-HG (WT) ならびに対照変異体R277KおよびR277Aと比較して、EGFrのリン酸化を阻害する能力は低下しており、これはこれらの変異体の単量体 / 二量体比の上昇と合致していた（図34）。

【0371】

実施例64

HGのCH3変異体の濃度依存性の構成

CH3変異体F273A、L236V、およびY275Aの単量体 / 二量体構成は、上述のように非共有結合性ナノエレクトロスプレイ質量分析を用いて、0.01 ~ 10 μMの範囲の異なる濃度においてさらに検討された。これらのCH3変異体の単量体 / 二量体構成は、2F8-HG (WT) およびR277Kの構成と比較された。

【0372】

各々の濃度において単量体として存在する分子の割合をプロットし、各々の変異体についてEC50値が計算された（図35）。

【0373】

10

20

30

40

50

全てのHG変異体は低濃度では100%単量体だった（二量体として振る舞ったR277Kを除く）。HG変異体の濃度が上昇すると、単量体性の低下が観察された。しかし、図は、CH3変異体が2F8-HG (WT) よりもはるかに高い濃度でそのような単量体性の低下を示すことを示す。したがって、CH3変異体は、より高いモル濃度において、より高い割合で単量体分子を含んでいた。

【0374】

実施例65

非ヒトトランスジェニックマウスにおけるEGFrに対するヒト一価抗体の產生

トランスジェニックC57BL/6Jマウス系統は、EGFrに対するヒト一価抗体を作製するため10に使用された。このマウス系統はトランスジーンに関してホモ接合であり、機能的に連結された複数のヒトV遺伝子、複数のヒトD遺伝子、複数のヒトJ遺伝子、ならびに、SEQ ID NO: 15に示されるヒト μ C_H遺伝子およびC_H遺伝子を含む複数のヒトC_H遺伝子および関連するアイソタイプスイッチ配列を含む。さらに、内因性マウス免疫グロブリン重鎖遺伝子座、内因性マウス免疫グロブリン 軽鎖遺伝子座、および内因性マウス免疫グロブリン軽鎖遺伝子座は不活性化されている。

【0375】

以下の免疫スケジュールが使用された。マウスはA431細胞、高グルコースDMEM培養で二回免疫された後、Ribi Adjuvant中の可溶性抗原で追加免疫された。EGFR特異的血清力価は、三回目の免疫後にELISAによって決定された。融合前の最終ブーストでは三つの異なる免疫が行われた。これらには、50 μ l PBS中の10 μ gの抗原を用いた尾静脈への二回もしくは三回の連続静脈内(iv) ブースト、またはRibiアジュバント中の25 μ gの可溶性EGFrを用いた二回の連続腹腔内(i.p.) ブーストが含まれる。

免疫スケジュール

			ELISA	EGFR	ELISA		EGFR	
	A431細胞	A431細胞	力価	Ribi中ip	力価	融合	Ribi中ip	融合
マウス	1日目	20日目	30日目	33日目	43日目	46日目	50日目	53日目
#1	2X10 ⁶	1X10 ⁷	0	25 μ g	力価 決定		25 μ g	Ribi 2x25 μ g***
#2	2X10 ⁶	1X10 ⁷	0	25 μ g	力価 決定		25 μ g	2 iv x10 μ g**
#3	2X10 ⁶	1X10 ⁷	450	25 μ g	力価 決定	3 iv x10 μ g*		
* -4、-3、および-2日目にPBS中EGFR (10 μ g) iv (尾)								
** -4および-3日目にPBS中EGFR (10 μ g) iv (尾)								
*** -4および-3日目にRibi中EGFR (25 μ g) ip								

繰り返し免疫後にEGFrに対する強い応答レベルを示すマウスには、標準的手順に従って融合のための準備が施された。

【0376】

実施例66

10

20

30

40

50

ハイブリドーマの調製

P3 X63 ag8.653 ミエローマ細胞株 (ATCC CRL 1580、ロットF-15183) が融合に使用される。元のATCCバイアルを解凍し、培養で増殖させる。この増殖から凍結バイアルのシードストックを調製する。融合の一週間から二週間前に細胞の新しいバイアルが解凍される。

【0377】

10% FBS、ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma, P-7539)、および 5.5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール (GibcoBRL, 21985-023) を含む高グルコースDMEM (Mediatech, Cellgro #10013) が、ミエローマ細胞の培養に使用される。さらなる培地補充物が、ハイブリドーマ増殖培地に添加され、これには、3% Origin-Hybridoma Cloning Factor (Igen, 21001)、OPI補充物 (Sigma, O-5003)、 1.1×10^{-3} M オキサ口酢酸、 4.5×10^{-4} M ピルビン酸ナトリウム、および24国際単位/L ウシインスリン、HAT (Sigma, H 0262) 1.0×10^{-4} M ヒポキサンチン、 4.0×10^{-7} M アミノブテリン、 1.6×10^{-5} M チミジン、またはHT (Sigma, H0137) 1.0×10^{-4} M ヒポキサンチン、 1.6×10^{-5} M チミジンが含まれている。特徴付けされた胎児ウシ血清 (SH30071ロット# AJE10321およびAGH6843) はHyclone, Logan, Utah から入手できる。無血清培地はDMEM、抗生物質、および2-メルカプトエタノールのみを含んでいる。

【0378】

免疫されたマウスから得られた脾臓細胞は、標準的手順に従ってミエローマ細胞株と融合される。

【0379】

ヒト IgG4 抗体に関する最初のELISAスクリーニングは、融合後7~10日で行われる。ヒト IgG4 陽性ウェルは、可溶性EGFRでコーティングされたELISAプレート上でスクリーニングされる。抗原陽性のハイブリドーマを24ウェルプレートに移し、最終的に組織培養フラスコに移す。EGFR特異的ハイブリドーマは、モノクローナ性を保証するために限界希釈によってサブクローニングする。抗原陽性ハイブリドーマは、開発過程のいくつかの段階において、DMEM 10% FBSプラス10% DMSO (Sigma, D2650) またはOrigin Freeze Medium (Igen, # 210002) 中で細胞を凍結することによって、保存される。細胞は-80 またはLN₂中で貯蔵される。最初のEGFR特異的ハイブリドーマは、所望の特徴に関して続いてスクリーニング、およびさらなる解析のために選択される。

【0380】

配列表

10

20

30

SEQ ID No: 1: ヒトIgGのCL κ の核酸配列

1 CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA
 51 GTTGAATCT GGAAC TGCTGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC
 101 CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT
 151 AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG
 201 CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG
 251 TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG
 301 AGCTTCAACA GGGGAGAGTG T

10

SEQ ID No: 2: ヒトIgGのCL κ のアミノ酸配列

1 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
 51 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
 101 SFNRGEC

SEQ ID No: 3: ヒトIgGのCL λ の核酸配列

1 ACCGTCCCTAG GTCAGCCCAA GGCTGCCCTC TCGGTCACTC TGTTCCCGCC
 51 CTCCTCTGAG GAGCTTCAAG CCAACAAGGC CACACTGGTG TGTCTCATAA
 101 GTGACTTCTA CCCGGGAGCC GTGACAGTGG CCTGGAAGGC AGATAGCAGC
 151 CCCGTCAAGG CGGGAGTGGG GACCACACCA CCCTCCAAAC AAAGCAACAA
 201 CAAGTACGCG GCCAGCAGCT ACCTGAGCCT GACGCCTGAG CAGTGGAAAGT
 251 CCCACAGAAG CTACAGCTGC CAGGTACACGC ATGAAGGGAG CACCGTGGAG
 301 AAGACAGTGG CCCCTACAGA ATGTTCA

20

SEQ ID No: 4: ヒトIgGのCL λ のアミノ酸配列

1 TVLGQPKAAP SVTLFPPSSE ELQANKATLV CLISDFYPGA VTVAWKADSS
 51 PVKAGVETTT PSKQSNNKYA ASSYLSLTPE QWKSHRSYSC QVTHEGSTVE
 101 KTVAPTECS

30

SEQ ID No: 5: HuMab-7D8のVHの核酸配列

1 GAAGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGACAGGTC
 51 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAT GATTATGCCA
 101 TGCACGGGT CCGGCAAGCT CCAGGGAAAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAACT
 151 ATTAGTTGGA ATAGTGGTAC CATAGGCTAT GCGGACTCTG TGAAGGGCCG
 201 ATTCAACCAC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT CTGCAAATGA
 251 ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCCTTGT ATTACTGTGC AAAAGATATA
 301 CAGTACGGCA ACTACTACTA CGGTATGGAC GTCTGGGGCC AAGGGACCAC
 351 GGTCACCGTC TCCTCA

40

SEQ ID No: 6: HuMab-7D8のVHのアミノ酸配列

1 EVQLVESGGG LVQPDRSLRL SCAASGFTFH DYAMHWVRQA PGKGLEWVST
 51 ISWNSGTIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDI
 101 QYGNYYYYGMD VWGQGTTVTV SS

SEQ ID No: 7: マウス抗Betv-1のVHの核酸配列

1 GAGGTTCAGC TGCAGCAGTC TGGGGCAGAG CTTGTGAAAC CAGGGGCCTC
 51 AGTCAAGTTG TCCTGCACAG CTTCTGGCTT CAACATTAAA GACACCTATA 10
 101 TCCACTGGGT GAAGCAGAGG CCTGAACAGG GCCTGGAGTG GGTTGGAAGG
 151 ATTGATCCTG CGACTGGCAA TACTAGATAT GACCCGAAGT TCCAGGGCAA
 201 GGCCACTATA ACAGCTGACA CATCCTCAA CACAGCCTAC CTGCAACTCA
 251 GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC ACTGCCGTCT ATTACTGTGC TAGTTTTAGG
 301 CCGGGGTATG CTCTGGACTA CTGGGGTCAA GGAACCTCAG TCACCGTCTC
 351 CTCA

SEQ ID No: 8: マウス抗Betv-1のVHのアミノ酸配列

1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHWKQR PEQGLEWVGR 20
 51 IDPATGNTRY DPKFQGKATTI TADTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCASFR
 101 PGYALDYWGQ GTSVTVSS

SEQ ID No: 9: HuMab-7D8のVLの核酸配列

1 GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTGT CTCCAGGGGA
 51 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCTACTTAG
 101 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT
 151 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGTC 30
 201 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTG
 251 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCGATCAC CTTCGGCCAA
 301 GGGACACGAC TGGAGATTAA A

SEQ ID No: 10: HuMab-7D8のVLのアミノ酸配列

1 EIVLTQSPAT LSLSPLGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 51 ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPITFGQ
 101 GTRLEIK 40

SEQ ID No: 11: マウス抗Betv-1のVLの核酸配列

1 GACATTGTGA TGACCCAGTC TCACAAATTC ATGTCCACAT CAGTTGGAGA
 51 CAGGGTCAGC TTACACTGCA AGGCCAGTCA GGATGTGTTT ACTGCTGTAG
 101 CCTGGTATCA ACAAAAACCA GGGCAATCTC CTAAACTACT GATTTACTGG
 151 GCATCCACCC GGCGCACTGG AGTCCCTGAT CGCTTCACAG GCAGTGGATC
 201 TGGGACAGAT TATACTCTCA CCATCAGCAG TGTGCAGGCT GAAGACCTGG

251 CACTTTATTA CTGTCAGCAA CATTAGCA CTCCTCCGAC GTTCGGTGGA
 301 GGCACCAAGC TGGAAATCAA A

SEQ ID No: 12: マウス抗Betv-1のVLのアミノ酸配列

1 DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS FTCKASQDVF TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW
 51 ASTRRTGVPD RFTGSGSGTD YTTLTISSVQA EDLALYYCQQ HFSTPPTFGG
 101 GTKLEIK

10

SEQ ID No: 13: ヒトIgG4の野生型CH領域の核酸配列

IgG4

1 GCTAGCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC CTGGCGCCCT GCTCCAGGAG
 51 CACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC
 101 CCGAACCGGT GACGGTGTG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGCGTG
 151 CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCCTCAGCAG
 201 CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACGAAGACC TACACCTGCA
 251 ACGTAGATCA CAAGCCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAG AGTTGGTGAG
 301 AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG CTCAGCCCTC
 351 CTGCCTGGAC GCACCCCCGGC TGTGCAGCCC CAGCCCAGGG CAGCAAGGCA
 401 TGCCCCATCT GTCTCCTCAC CCGGAGGCCT CTGACCACCC CACTCATGCT
 451 CAGGGAGAGG GTCTTCTGGA TTTTCCACC AGGCTCCGGG CAGCCACAGG
 501 CTGGATGCCCT CTACCCCCAGG CCCTGCGCAT ACAGGGCAG GTGCTGCGCT
 551 CAGACCTGCC AAGAGCCATA TCCGGGAGGA CCCTGCCCT GACCTAAGCC
 601 CACCCCAAAG GCCAAACTCT CCACTCCCTC AGCTCAGACA CCTTCTCTCC
 651 TCCCAGATCT GAGTAACTCC CAATCTTCTC TCTGCAGAGT CCAAATATGG
 701 TCCCCCATGC CCATCATGCC CAGGTAAGCC AACCCAGGCC TCGCCCTCCA
 751 GCTCAAGGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
 801 CCAGCCGGGT GCTGACGCAT CCACCTCCAT CTCTCCTCA GCACCTGAGT
 851 TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCTGTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACT
 901 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG TGGACGTGAG
 951 CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT GGCGTGGAGG
 1001 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTAC
 1051 CGTGTGGTCA GCGCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA
 1101 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCGTCC TCCATCGAGA
 1151 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC ACGGGGTGCG AGGGCCACAT
 1201 GGACAGAGGT CAGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGGGAGTG ACCGCTGTGC
 1251 CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AGCCACAGGT GTACACCCCTG
 1301 CCCCCATCCC AGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
 1351 GGTCAAAGGC TTCTACCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
 1401 GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
 1451 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAGGCTAACCC GTGGACAAAGA GCAGGTGGCA
 1501 GGAGGGGAAT GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAAACC

20

30

40

1551 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC TGGGTAAA

SEQ ID No: 14: ヒトIgG4の野生型CH領域のアミノ酸配列

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
 101 KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
 151 PEVQFNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 10
 201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GOPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
 251 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDLS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 301 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

SEQ ID No: 15: 714位および722位が変異したヒトIgG4 (SEQ ID NO: 13) の
 CH領域をコードする核酸配列

1 GCTAGCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC CTGGCGCCCT GCTCCAGGAG
 51 CACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC
 101 CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG 20
 151 CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCCTCAGCAG
 201 CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACGAAGACC TACACCTGCA
 251 ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAG AGTTGGTGAG
 301 AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG CTCAGCCCTC
 351 CTGCCTGGAC GCACCCCGGC TGTGCAGCCC CAGCCCAGGG CAGCAAGGCA
 401 TGCCCCATCT GTCTCCTCAC CCGGAGGCCT CTGACCACCC CACTCATGCT
 451 CAGGGAGAGG GTCTTCTGGA TTTTCCACC AGGCTCCGGG CAGCCACAGG
 501 CTGGATGCCCT ATACCCCAGG CCCTGCGCAT ACAGGGCAG GTGCTGCGCT 30
 551 CAGACCTGCC AAGAGCCATA TCCGGGAGGA CCCTGCCCT GACCTAAGCC
 601 CACCCCAAAG GCCAAACTCT CCACTCCCTC AGCTCAGACA CCTTCTCTCC
 651 TCCCCAGATCT GAGTAACTCC CAATCTTCTC TCTGCAGAGT CCAAATATGG
 701 TCCCCCATGC CCACCATGCC CGGGTAAGCC AACCCAGGCC TCGCCCTCCA
 751 GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
 801 CCAGCCGGGT GCTGACGCAT CCACCTCCAT CTCTTCCTCA GCACCTGAGT
 851 TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCCTGTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACT
 901 CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTACG TGCGTGGTGG TGGACGTGAG
 951 CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT GGCAGTGGAGG 40
 1001 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACGTAC
 1051 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAACGGCAA
 1101 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCGTCC TCCATCGAGA
 1151 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC ACGGGGTGCG AGGGCCACAT
 1201 GGACAGAGGT CAGCTCGGCC CACCCCTCTGC CCTGGGAGTG ACCGCTGTGC
 1251 CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AGCCACAGGT GTACACCCTG
 1301 CCCCCATCCC AGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAAGCC TGACACTGCCT

1351 GGTCAAAGGC TTCTACCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
 1401 GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
 1451 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAGGCTAACCC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
 1501 GGAGGGGAAT GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAAACC
 1551 ACTACACACA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC TGGGTAAA

SEQ ID No: 16: ヒトIgG4のヒンジレスCH領域のアミノ酸配列

10

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP
 101 EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
 151 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
 201 EKTISKAKGQ PREPQVYTLR PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 251 SNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL
 301 HNHYTQKSLS LSLGK

SEQ ID NO: 17: ヒト定常 λ 鎖のアミノ酸配列 (アクセッション番号S25751)

20

1 qpkaapsvtl fppsseelqa nkatlvcxis dfypgavtva wkadsspvka
 51 gvettpskq snnkyaassy lsltpeqwks hrsyscqvth egstvektva
 101 pteCs

SEQ ID NO: 18: ヒト定常 κ 鎖のアミノ酸配列 (アクセッション番号P01834)

30

1 tvaapsvfif ppsdeqlksg tasvvcllnn fypreakvqw kvdnalqsgn
 51 sqesvteqds kdstysslst ltlskadyek hkvyacevth qglsspvtks
 101 fnrgeC

SEQ ID NO: 19: IgG1定常領域のアミノ酸配列 (アクセッション番号P01857)

40

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvts wnsgaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkv~~ep~~
 101 ~~kscdkthtcp pc papellgg psvflppkp kdtmlmisrtp evtcvvvdvs~~
 151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhqdwlnngk
 201 eykckvsnka lpapiektis kakqqprepq vytlpssRDe mtknqvslt
 251 lvkqfypsdi avewesnqp ennykttppv ldsdqsfly skltvdksrw
 301 qognvfscsv mhealhnhyt qkslslsPqk

SEQ ID NO: 20: IgG2定常領域のアミノ酸配列 (アクセッショ番号P01859)

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvts wnsgaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdktver
 101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvvdvshedp
 151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vvsvltvvhq dwlngkeykc
 201 kvsnkglpap iektisktkg qprepqvyl ppsReemtkn qvsltclvkq
 251 fypsdiavew esnqqpenny ktppMldsd qsfflysklt vdksrwqQqn
 301 vfscsvmhea lhnhytqksl slsPqk

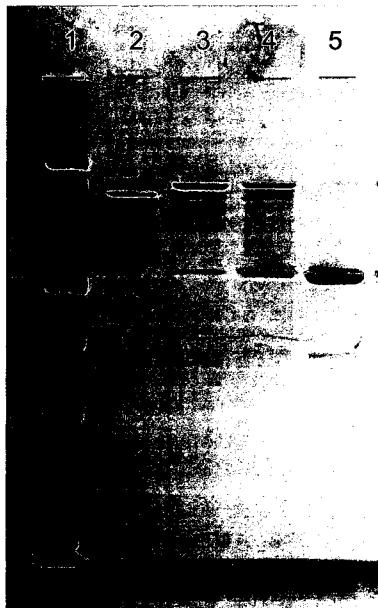
10

SEQ ID NO: 21: IgG3定常領域のアミノ酸配列 (アクセッショ番号A23511)

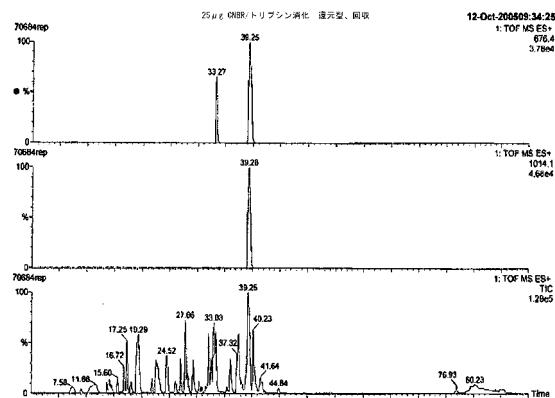
1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvts wnsgaltsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpsslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel
 101 ktpigdttht cprcppepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcppepksc
 151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
 201 pevqfkwyvd gvevhnaktk preeqynstf rvvsvltvlh qdwlngkeyk
 251 ckvsnkalpa piektisktk qqprepqvyl lppsReemtkn ngvsltclvk
 301 qfypsdiave wesSgpenn yNtppMldsd dgsfflyskl tvdksrwqQq
 351 nIfscsvmhe alhnRftqks lslsPqk

20

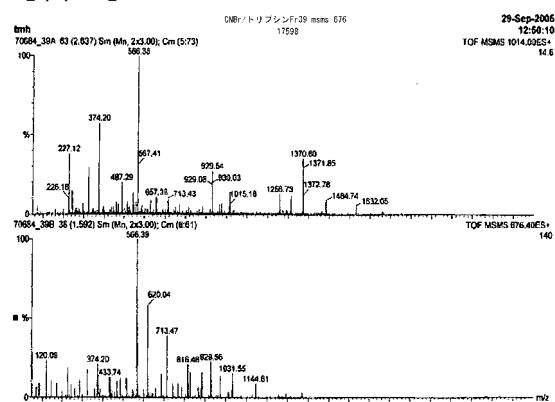
【図1】



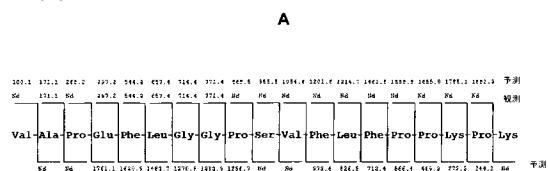
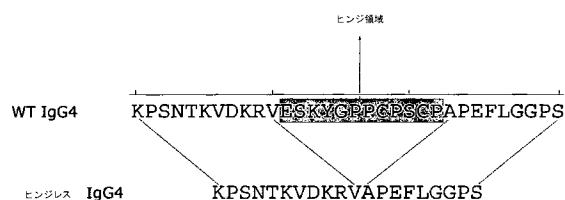
【図2】



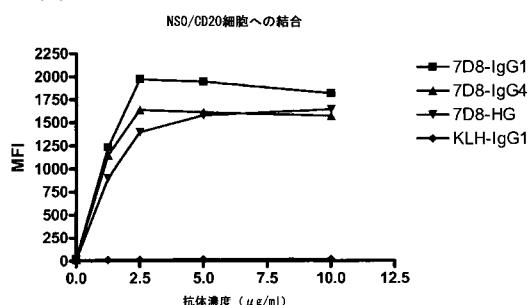
【図3】



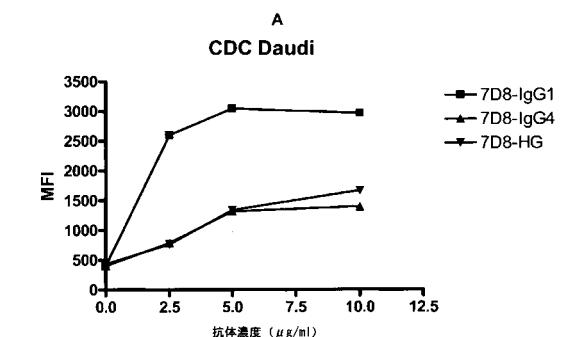
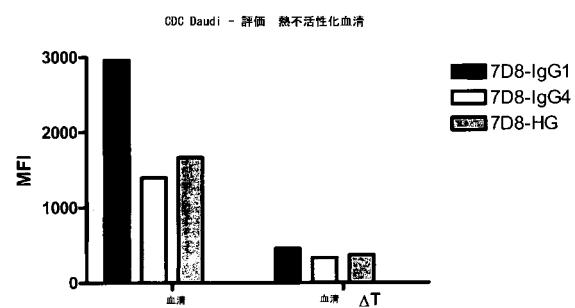
【図4】

**B**

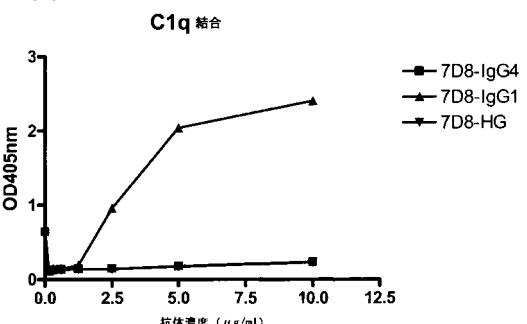
【図5】



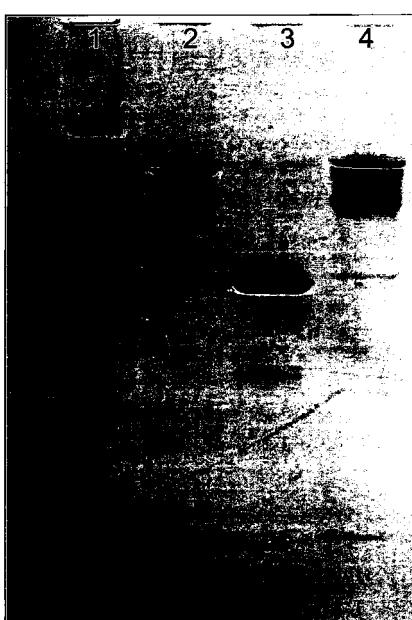
【図7】

**B**

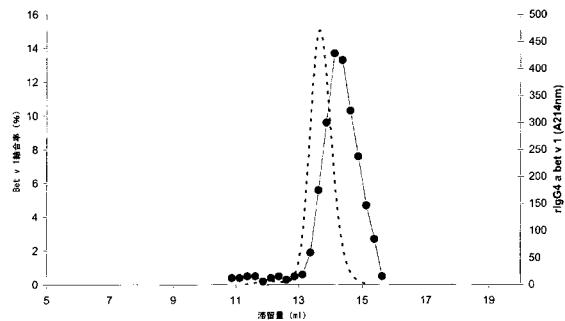
【図6】



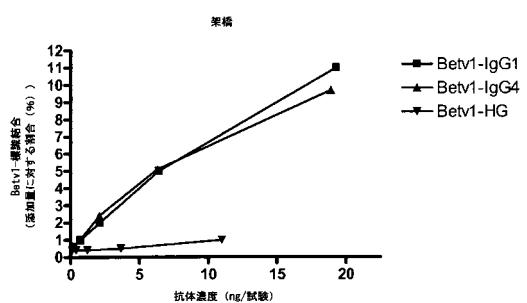
【図8】



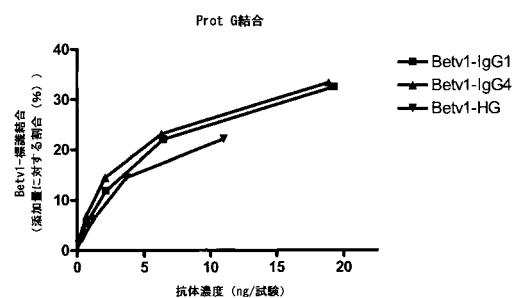
【図 9】



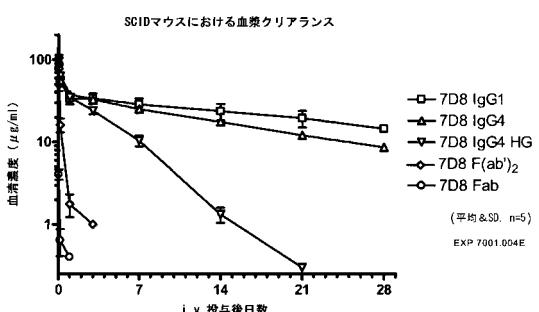
【図 11】



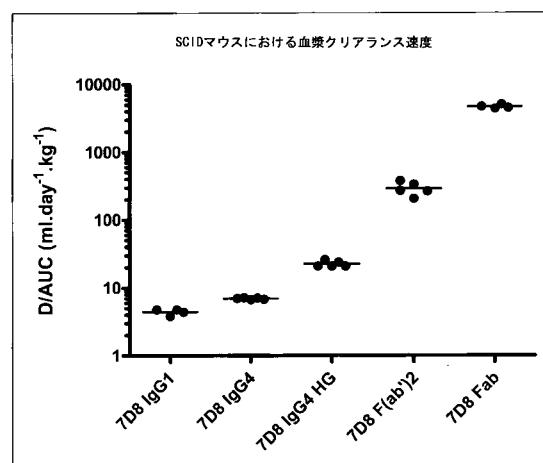
【図 10】



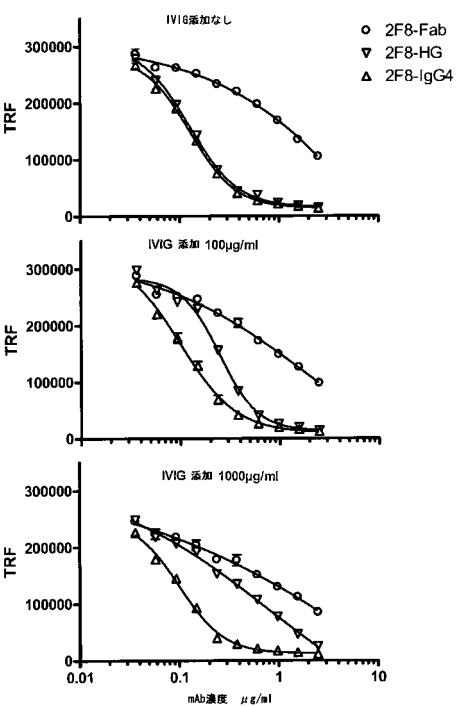
【図 12】



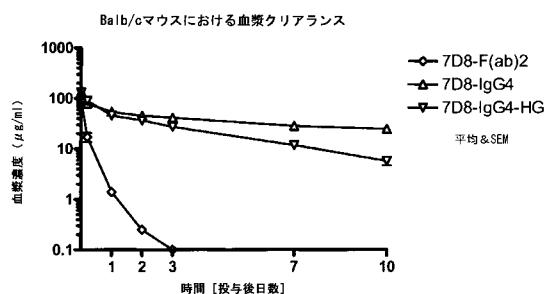
【図 13】



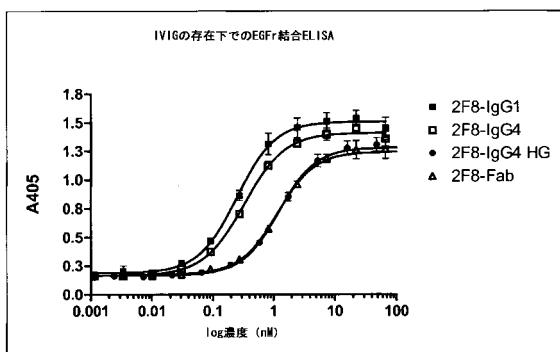
【図 14】



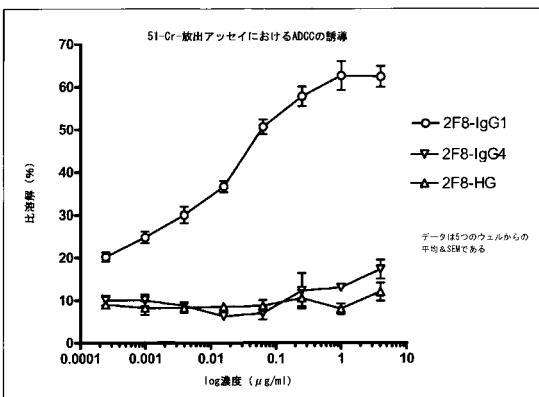
【図15】



【図16】



【図17】



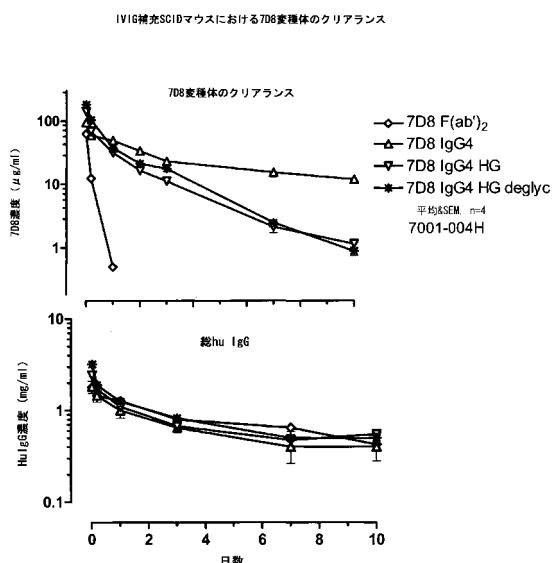
【図18】

Seq ID No	名称		オリゴ配列
22	VLexbetv1rev	P1	AGCCACCGTACGTTGATTTCCA GCTTGGTGCCTCC
23	VLex betv1for	P2	GATGCAAGCTTGCGCCACCATG GAGTCACAGATTCAAGGCCATT
24	VHexbetv1rev	P3	CGATGGGCCCTTGGTGTGGCT GAGGAGACGGTGAETGAGGT
25	VHexbetv1for	P4	GATGCAAGCTTGCGCCACCATG AAATGCAACTGGTTATCTTC
26	LCseq3	P5	TGACTTTGGCCTCTGGGATA
27	7D8VLexrev	P6	CTGGAGATAAACGTACGGTGGC TGACC
28	7D8VLexfor	P7	GCGACTAACGCTTGGCCACCAT GGAAGCCCCAGCTCAGCTCTC
29	7D8VHexfor	P8	GCTGAAAGCTTGGCCACCATG GAGTTGGACTAGCTGGATT
30	pConKseq1	P9	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTC
31	pConGseq1	P10	GAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAA
32	HCseq5	P11	GGTCAGGGGCCCTGAGTCCCAC G
33	HCseq11	P12	ATGCAGGCTACTCTAGGGCACCT
34	2f8HCexrev	P13	GAAGACCGATGGGCCCTTGGTGC CTAGCTGAGGAGAC
35	IGG4gene2r	P14	TGAGAATTGGTGGGTGCTTAT TTCCATGCT
36	IGG4gene2f	P15	GTAGAACGTTACCATCGCGATA GACAAGAAC
37	IGG4S228Pf	P16	GGTCCCCCATGCCACCATGCC GGGTAAAGCCA
38	IGG4S228Pr	P17	TGGCTTACCCGGCATGGTGGG CATGGGGGAC
39	RACEKmm1	P18	TGTTAACGTGCTACTGGATGGTG GGA
40	RACEG1mm1	P19	TCCCTGGGCACAATTCTTGTC ACC
41	ShortUPMH3	P20	TGAAAGCTTCTAATACGACTCA ATAGGGC
42	LongUPMH3	P21	TGAAAGCTTCTAATACGACTCA ATAGGGCAGCACTGGTATCAC GCAGAGT

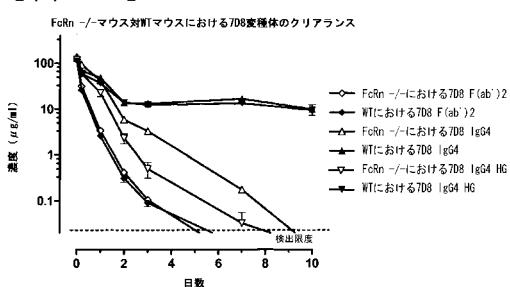
【図19】

Seq ID No	名称	長さ	オリゴ配列
43	A77VHfor1	62	TCTTCTCTGATGGCAGTGGTTACAG GGGTCAATTAGAGGTCAGCTGCAG CAGACTGGA
44	A77VHfor2	61	GATAAGCTTGCCGCCACCATGAAATG CAGCTGGTTATCTCTCCCTGATGGC AGTGGTTA
45	A77VHrev	45	GGATGGCCCTTGGTGTGGCGCA GAGACAGTGACCAAGAGTC
46	A77VLfor1	64	CCTCATGTCCTGCTGTTCTGGGTATC TGGTACCTGTGGGACGTTGTGATGA CCCAGACTCCA
47	A77VLfor2	62	ACGAAGCTTGGCCACCATGGAATC ACAGACTCAGGTCTCATGTCCTGC TGTTCGGGT
48	IgG4delfor	44	AACTCCCAATCTCTCTGCAGCTCA AGGCAGGACAGGTGCCC
49	IgG4delrev	44	GGGCACCTGTCCTGGCTTGAGCTGCA GAGAGAAAGATTGGGAGTT
50	RACEG1A1	22	GGGAGTAGCTCTGAGGAGCTG
51	RACEKA1'	22	TATCCACCTTCACTGTACTTT
52	2f8HCexfor	45	CGATGGAAGCTTGGCCACCATGGA ATTGGGCTGAGCTGGGTT
53	2f8HCexrev	36	GAAGACCGATGGGCCCTTGGTGTAG CTGAGGAGAC

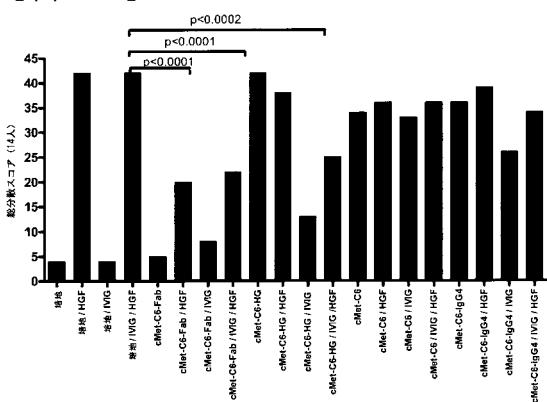
【図20】



【図21】



【図23】

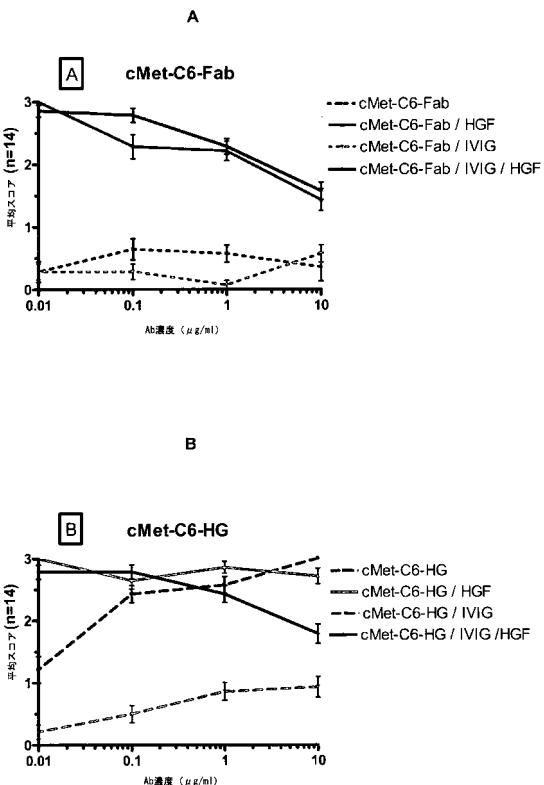


【図24】

1 2 3 4 5 6



【図22】



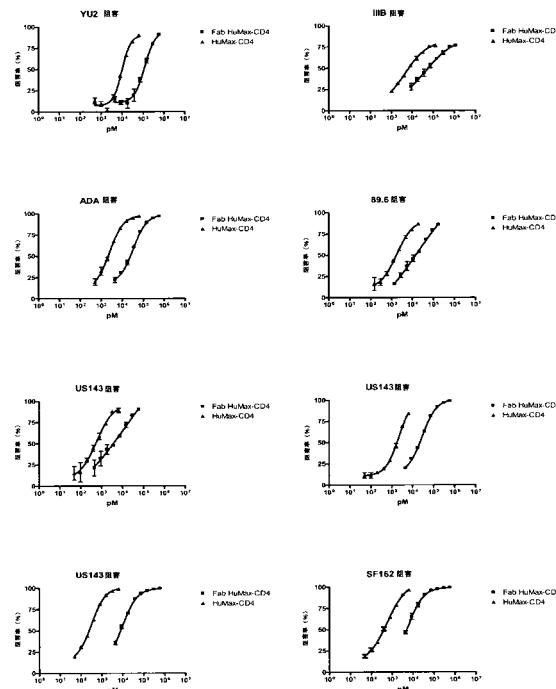
【図25】

HIV-1 単離体	HuMax-CD4 の 開始濃度 (μg/ml)	HuMax-CD4 阻害の IC50 (nM)	Fabフラグ メントの 開始濃度 (μg/ml)	Fab阻害の IC50 (nM)
YU2	10	9.9	30	119.9
IIIB	20	4.7	60	46.4
ADA	10	2.5	30	32.9
89.6	3	1.8	9	17.8
US143	1	0.6	3	11.9
JR-FL	1	2.1	30	29.1
JR- CSF	1	0.3	30	9.5
SF 162	1	0.6	30	6.3

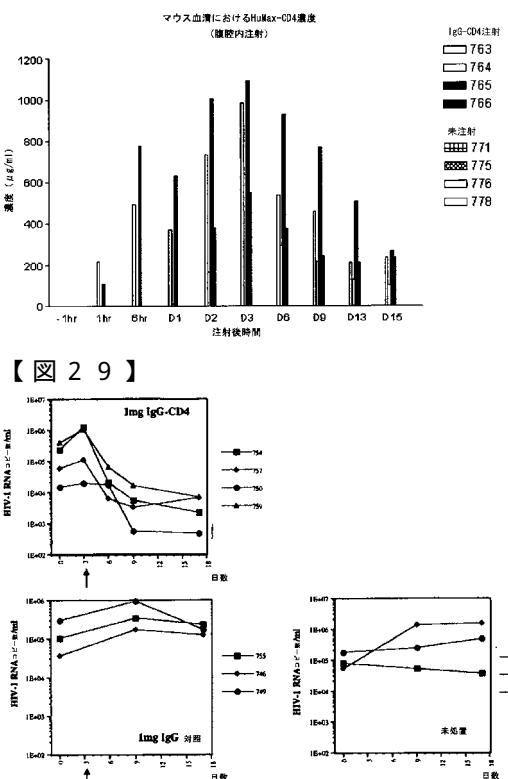
【図26】

マウス番号	分子	性別	相対数 (n)	感染日: 8/16/03		感査日: 9/06/03		感査日: 9/06/03		AVG	SD
				Vt (cell)	ヒト細胞の 割合 (%)	マウス細胞の 割合 (%)	CD4細胞の 割合 (%)	CD4CD8 割合 (%)			
755	IgG-CD4	F	1.5	7	5.51	0.03	0	0			
757	IgG-CD4	F	6	9.53	82.77	1.12	10.5	0.106			
750	IgG-CD4	F	2	7	22.25	69.45	1.82	20.8	0.08	0.1	
759	IgG-CD4	M	3	8	35.44	46.27	2.34	20.53	0.114		
755	IgG-対照	F	2	6	86.29	10.03	2.46	84.87	0.028		
746	IgG-対照	F	1	7	83.19	13.14	1.15	82.95	0.013	0.02	
749	IgG-対照	F	3.2	8	86.48	10.76	1.69	86.08	0.019		
756	未処理	F	3	6	58.88	38.57	1.19	58.7	0.02		
748	未処理	F	4	7	95.52	2.44	0.82	96.3	0.008	0.04	
758	未処理	M	3	6	86.28	10.73	7.37	79.72	0.092		
761	未感染	M	4	8	80.85	17.39	22.94	53.77	0.426	0.48	
762	未感染	M	4	7	48.5	13.2	16.6	30.93	0.536		

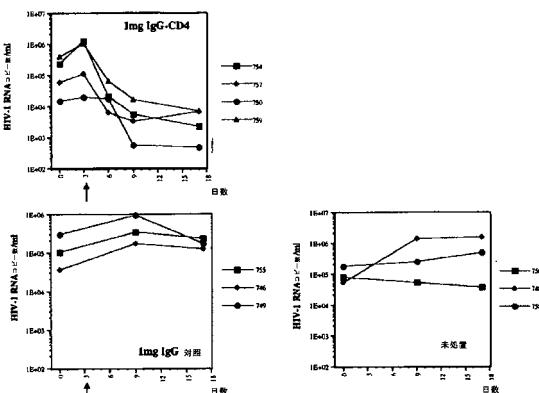
【図27】



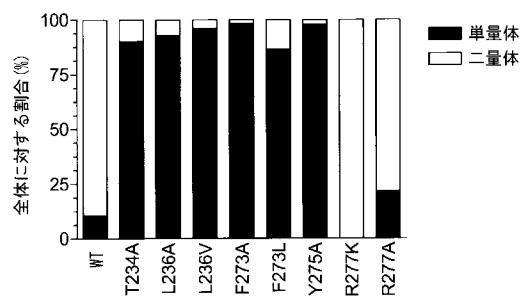
【図28】



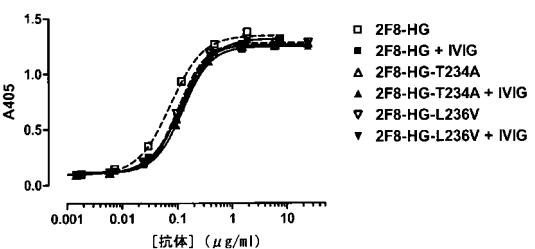
【図29】



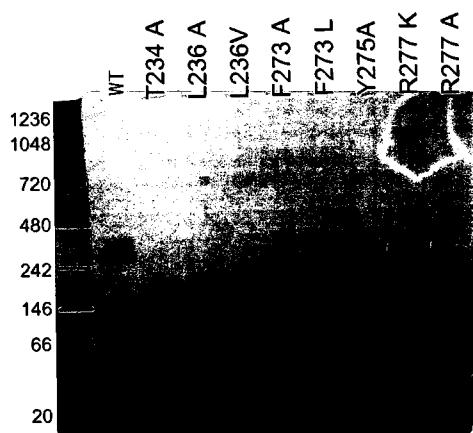
【図30】



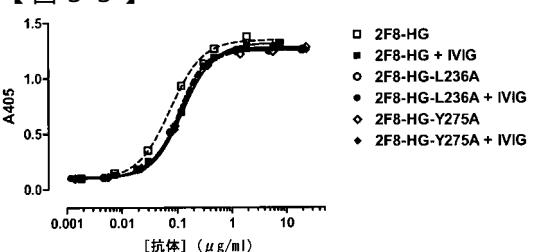
【図32】



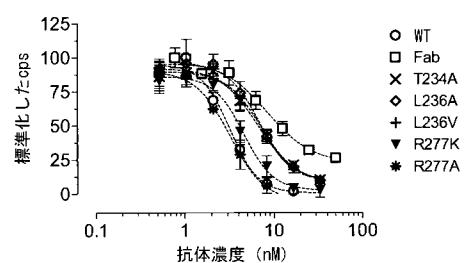
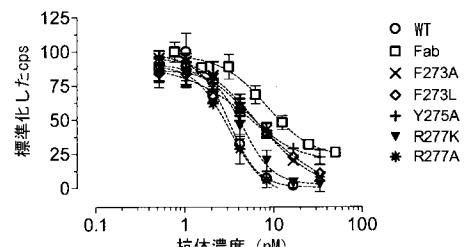
【図31】



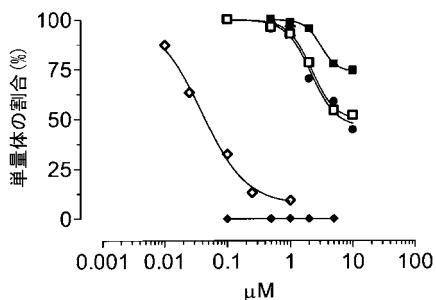
【図33】



【図3-4】



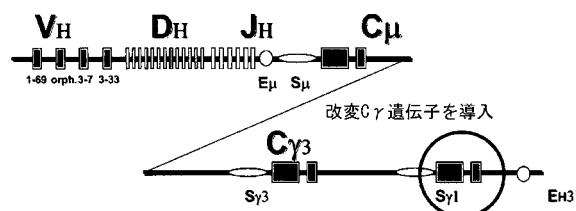
【図3-5】



分子	EC50 (μM)
WT	0.039
F273A	3.059
L236V	2.155
R277K	-
Y275A	2.192

【図3-6】

ヒト一価重鎖トランスジーン



【配列表】

0005570974000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 スピュールマン ジェニン
オランダ王国 ディーメン オラニエプラントスーン 85

(72)発明者 ピンク トム
オランダ王国 アルフェン アーン デン レイン スカーブマンストラート 25

(72)発明者 バン デ ウィンケル ヤン
オランダ王国 ザイスト フエルレングデ スロートラーン 80

(72)発明者 ラブレイン アラン フランク
オランダ王国 アムステルダム ヤン バン デル ハイデンストラート 2イー 66 - 3アル
ル

(72)発明者 パーレン ポール
オランダ王国 オディイク ウェルドルペルワード 17

(72)発明者 ブレーカー ウィレム カレル
オランダ王国 アムステルダム カイゼルスグラハト 704

(72)発明者 ビュースケンス フランク
オランダ王国 クレンボルフ エイチ. アール. ホルストストラート 40

(72)発明者 バン ベーケル パトリック
オランダ王国 ユトレヒト ウェステルパルクラーン 3イー 321

審査官 上條 肇

(56)参考文献 国際公開第2005/047336 (WO, A1)
国際公開第2007/024715 (WO, A2)
国際公開第2004/026427 (WO, A2)
国際公開第2004/045512 (WO, A2)
国際公開第2004/056847 (WO, A2)
国際公開第2005/047334 (WO, A1)
国際公開第2005/047335 (WO, A1)
国際公開第2005/047337 (WO, A1)
J. Immunol., 1993年, Vol.150, No.12, p.5400-5407
Immunol., 2002年, Vol.105, p.9-19
Biochemistry, 1998年, Vol.37, p.9266-9273

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N	1 5 / 0 2
A 01 K	6 7 / 0 2 7
C 07 K	1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C 1 2 P 2 1 / 0 8

MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

UniProt / GeneSeq