

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4460155号
(P4460155)

(45) 発行日 平成22年5月12日 (2010. 5. 12)

(24) 登録日 平成22年2月19日 (2010. 2. 19)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/02 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A C
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28

請求項の数 10 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2000-524459 (P2000-524459)	(73) 特許権者	500184121
(86) (22) 出願日	平成10年12月4日 (1998. 12. 4)		ザ・スクリプス・リサーチ・インスティテュート
(65) 公表番号	特表2001-526044 (P2001-526044A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、ラ・ホーヤ、ノース・トレイ・パインズ・ロード・10550、メイル・ドロップ・テイー・ピー・シー-8
(43) 公表日	平成13年12月18日 (2001. 12. 18)		
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/025828	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W01999/029888		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成11年6月17日 (1999. 6. 17)	(74) 代理人	100105393
審査請求日	平成17年11月24日 (2005. 11. 24)		弁理士 伏見 直哉
(31) 優先権主張番号	08/986, 016	(74) 代理人	100114188
(32) 優先日	平成9年12月5日 (1997. 12. 5)		弁理士 小野 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マウス抗体のヒト化

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト化マウスモノクローナル抗体の作成方法であって、

(a) 抗体重鎖又は抗体軽鎖からなる第一のヒト化抗体の重鎖又は軽鎖ライブラリーであって、該第一のヒト化抗体の軽鎖又は重鎖ライブラリーの各鎖が3つの相補性決定部 (CDR) ループを有し、それぞれの軽鎖及び重鎖の相補性決定部3 (CDR3) ループが、マウス抗体の重鎖又は軽鎖のCDR3ループに対応するアミノ酸配列からなり、ヒト不変フレームワーク領域に隣接し、それぞれの軽鎖又は重鎖のCDR1ループ及びCDR2ループは、マウス抗体の重鎖又は軽鎖のCDR1ループ及びCDR2ループに対応するアミノ酸配列からなってもよい、ヒト化抗体の重鎖または軽鎖ライブラリーを構築するステップ、

10

(b) 抗体重鎖又は抗体軽鎖からなる第二のヒト化抗体の重鎖又は軽鎖ライブラリーであって、該第二のヒト化抗体の軽鎖又は重鎖ライブラリーの各鎖が3つの相補性決定部 (CDR) ループを有し、それぞれの軽鎖及び重鎖の相補性決定部3 (CDR3) ループが、マウス抗体の重鎖又は軽鎖のCDR3ループに対応するアミノ酸配列からなり、ヒト不変フレームワーク領域に隣接し、それぞれの軽鎖又は重鎖のCDR1ループ及びCDR2ループは、マウス抗体の重鎖又は軽鎖のCDR1ループ及びCDR2ループに対応するアミノ酸配列からなってもよい、ヒト化抗体の重鎖または軽鎖ライブラリーを構築するステップであって、該第二のヒト化抗体の重鎖又は軽鎖ライブラリーの鎖が、前記第一のヒト化抗体の重鎖又は軽鎖ライブラリーの鎖に相補的であり、一つのライブラリーは軽鎖ライブ

20

ラリーであって、他方のライブラリーは重鎖ライブラリーである第二のヒト化抗体の重鎖又は軽鎖ライブラリーを構築するステップ、

(c) ステップ(a)の前記第一のヒト化抗体の重鎖又は軽鎖のライブラリーからの鎖を予め選択された抗原に結合する抗体由来のキメラマウス／ヒト鎖である相補的な鎖と組合せることによって、重鎖と軽鎖の対のライブラリーを形成するステップ、

(d) ステップ(c)におけるライブラリーから、前記予め選択された抗原に結合する重鎖と軽鎖の対を選択し、抗原に結合する重鎖と軽鎖の対から、ステップ(a)における該抗原に結合する鎖を単離するステップ、

(e) ステップ(d)における第一の単離された鎖がステップ(b)のライブラリーの相補的な第二の鎖とともに結合して重鎖と軽鎖のヒト化した対のライブラリーを形成するように、ステップ(d)で単離された抗原結合鎖とステップ(b)のライブラリーからの鎖を結合させることにより、ヒト化された対のライブラリーを作成するステップ、

(f) ステップ(e)におけるヒト化した対のライブラリーから、前記予め選択された抗原に結合するヒト化した重鎖と軽鎖の対を選択するステップ、及び

(g) ステップ(f)において選択されたヒト化された重鎖および軽鎖の対の2つを組合せ、完全な抗体を形成するステップ、

からなり、前記予め選択された抗原は前記マウスモノクローナル抗体によって認識される抗原と同じである方法。

【請求項2】

第一のヒト化抗体の重鎖及び軽鎖のライブラリーが軽鎖のみを含み、相補鎖は重鎖であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項3】

第一のヒト化抗体の重鎖及び軽鎖のライブラリーが重鎖のみを含み、相補鎖は軽鎖であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項4】

重鎖がFd断片であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項5】

ヒト化マウスモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の対の製造方法であって、

(a) 軽鎖ライブラリーの各軽鎖が3つの相補性決定部(CDR)ループを有し、各軽鎖における相補性決定部3(CDR3)ループが対応するマウス抗体の軽鎖CDR3ループのアミノ酸配列からなり、ヒト不変フレームワーク領域に隣接し、各軽鎖のCDR1ループ及びCDR2ループが、マウス抗体の軽鎖のCDR1ループ及びCDR2ループに対応するアミノ酸配列からなってもよい、ヒト化軽鎖ライブラリーを構築するステップ、

(b) ステップ(a)における軽鎖ライブラリーから軽鎖を選択するステップであって、該選択はステップ(a)のライブラリーからの軽鎖と、予め選択された抗原に結合する抗体からのキメラマウス／ヒト鎖である重鎖を結合させ、重鎖と軽鎖の対のライブラリーを形成し、該対のライブラリーを前記予め選択された抗原への結合によりスクリーニングし、該予め選択された抗原に結合する軽鎖を単離することを含むステップ、

(c) ヒト化重鎖ライブラリーを構築するステップであって、ヒト化重鎖のライブラリーの各重鎖が3つのCDRループを有し、各重鎖の相補性決定部3(CDR3)ループが対応するマウス抗体の重鎖のCDR3ループのアミノ酸配列からなり、ヒト不変フレームワーク領域に隣接し、各重鎖のCDR1ループ及びCDR2ループが、マウス抗体の重鎖のCDR1ループ及びCDR2ループに対応するアミノ酸配列からなってもよい、ヒト化重鎖ライブラリーを構築するステップ、

(d) ステップ(c)における重鎖ライブラリーからの重鎖と、ステップ(b)で選択された軽鎖を結合し、第二のヒト化マウスモノクローナル抗体の重鎖と軽鎖の対のライブラリーを作成するステップ、及び

(e) ステップ(d)のライブラリーを前記予め選択された抗原への結合と、前記予め選択された抗原に結合するヒト化マウスモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の対の単離によりスクリーニングし、ステップ(d)のライブラリーから抗原結合ヒト化マウスモノクロ

10

20

30

40

50

ーナル抗体の重鎖及び軽鎖の対を単離するステップ、
からなり、前記予め選択された抗原は前記マウスモノクローナル抗体によって認識される
抗原と同じである方法。

【請求項 6】

更に、選択した重鎖と軽鎖の対を結合し完全な抗体を得ることを含むことを特徴とする
請求の範囲第 5 項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (b) の重鎖が F d 断片であることを特徴とする請求の範囲第 5 項に記載の方
法。

【請求項 8】

F d がキメラマウス／ヒト重鎖断片又は鋳型マウス重鎖断片であることを特徴とする請
求の範囲第 7 項に記載の方法。

【請求項 9】

各軽鎖及び重鎖における C D R 3 ループが A T C C 番号 H B 9 5 3 7 で寄託されたハイ
ブリドーマ細胞株により産生される抗体 L M 6 0 9 由来の C D R 3 ループであることを特
徴とする請求の範囲第 5 項に記載の方法。

【請求項 10】

重鎖 F d が鋳型マウス重鎖断片であることを特徴とする請求の範囲第 7 項に記載の方法
。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明はマウス抗体のヒト化に関する。

【0002】

(発明の背景)

通常、抗体は、ジスルフィド結合により相互に結合した 2 つの重鎖及びジスルフィド結合
により各重鎖に結合した 2 つの軽鎖からなる。各重鎖の 1 端から可変ドメインが始まり、
その後に数個の不変ドメインがある。同様に、各軽鎖はその一端に可変ドメインを有する
が、その他端には 1 個の不変ドメインしかない。軽鎖には、ラムダ (λ) 鎖及びカッパ (κ) 鎖と
呼ばれる 2 種の鎖がある。 λ または κ 軽鎖を有する抗体の間に機能的な差違はない。しかしながら、2 種の軽鎖の比率は種毎に異なる。マウスにおける κ : λ 比は 20 :
1 であり、ヒトにおける κ : λ 比は 2 : 1 である。

【0003】

軽鎖及び重鎖の可変ドメインは、軽鎖の不変ドメイン及び重鎖の第 1 不変ドメインのよう
に一列に並んでいる。軽鎖及び重鎖の不変ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与し
ていない。

【0004】

複数の可変ドメインが抗体の抗原結合サイトを形成する。各軽鎖及び重鎖ドメインの一般
的構造は、3 つの相補性決定部 (C D R) により結合される 4 つのフレームワーク部から
なり、前記部の配列は比較的保存される。4 つのフレームワーク部は β -シートコンフォ
メーションを使用し、C D R は β -シート構造を接続するループを形成する (場合により
、その一部を形成する)。C D R はフレームワーク部により非常に接近して保持され、他
のドメインからの C D R と共に抗原結合サイトの形成に寄与する。

【0005】

腫瘍細胞の細胞表面抗原は抗体誘導ガン治療に対する一般的な標的であるが、充実性腫瘍
の治療のための主要な制限の 1 つは、腫瘍抗原が血流中を循環する抗体に接近しにくいこ
とである。腫瘍細胞の濃密充填及び腫瘍コア中の高い間質圧が手強い物理的バリアーとな
っている。

【0006】

抗体の充実性腫瘍への侵入不足の問題を解決するために、腫瘍細胞それ自体よりも腫瘍の

10

20

30

40

50

血管を覆う内皮細胞を攻撃する。成熟腫瘍血管構造を特異的に、すなわち健康な組織を破壊することなく標的することは困難であるが、有望な方法では血管化を抑制することを目的とする。

【0007】

血管形成とも称される血管化は、主要細胞から分泌されるサイトカインにより誘発され、細胞接着分子 (CAM) 及びプロテアーゼにより調節される血管細胞遊走及び侵入プロセスに依存する。これらの分子は、現在血管形成阻害剤に対する潜在的標的と見做されている。これに関して、血管インテグリン $\alpha_v \beta_3$ が血管形成性血管のマーカーとして最近同定された。Brooks, P. C. ら, 「血管形成に対するインテグリン $\alpha_v \beta_3$ の要件 (Requirement of integrin $\alpha_v \beta_3$ for angiogenesis)」, Science, 264, 569-571 (1994) 参照。更に、インテグリン $\alpha_v \beta_3$ に対するマウスモノクローナル抗体 (Mab) LM609 は血管形成を抑制し得たことが判明し、このことからインテグリン $\alpha_v \beta_3$ が血管形成において重要な役割を有することが示される。

10

【0008】

更に、LM609 が刺激されて血管形成を受けた血管細胞のアポトーシスを選択的に促進することも立証された。Brooks, P. C. ら, 「インテグリン $\alpha_v \beta_3$ は血管形成性血管のアポトーシスを誘発することにより腫瘍退縮を促進する (Integrin $\alpha_v \beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels)」, Cell, 79, 1157-1164 (1994) 参照。これらの知見から、インテグリン $\alpha_v \beta_3$ は標的であり得、LM609 はガン診断及び治療のための道具であり得ることが示唆される。

20

【0009】

実際、LM609 は、ニワトリ胚の絨毛尿膜に移植した組織学的に異なるヒト腫瘍の増殖を防止し、該腫瘍の退縮をも誘発した。Cell, 79, 1157-1164 参照。腫瘍増殖のより臨床的に適切なモデルを用いると、LM609 はSCIDマウス/ヒトキメラモデルにおいてヒト乳ガンの増殖を阻止した。重大なことに、LM609 は腫瘍増殖を阻止しただけでなく、試験した乳ガンの転移をも抑制した。Brooks ら, 「抗-インテグリン $\alpha_v \beta_3$ はヒト乳ガン増殖及びヒト皮膚における血管形成を阻止する (Anti-integrin $\alpha_v \beta_3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin)」, J. Clin. Invest., 96, 1815-1822 (1995) 参照。

30

【0010】

Brooks らの結果は、血管形成が乳ガン細胞の転移蔓延の原因になることを示唆した以前の研究と一致している。Weidner, N. ら, 「腫瘍起因性血管形成及び転移：湿潤性乳ガンにおける関係 (Tumor angiogenesis and metastasis: Correlation in invasive breast carcinoma)」, N. Engl. J. Med., 324, 1-8 (1991) 及びWeidner, N. ら, 「腫瘍起因性血管形成：早期乳ガンにおける新規な有意且つ独立した予後インジケータ (Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma)」, J. Natl. Cancer Inst., 84, 1875-1887 (1992) 参照。

【0011】

過去数年間の間に、血管形成の2つのサイトカイン依存経路があること及びこれらの経路は異なる血管インテグリンへの依存性により規定されることの証拠が提出された。Friedlander, M. ら, 「異なるAVインテグリンによる2つの血管形成経路の定義 (Definition of two angiogenic pathways by distinct AV integrins)」, Science, 270, 1500-1502 (1995) 参照。Friedlander らの研究結果は、抗- $\alpha_v \beta_3$ 抗体LM809 はbFGF及びTNF α に応答して血管形成を阻止したが、VEGF、TGF α またはホルボールエステルPMAにより誘発される血管形成に対する影響は少ないことを示す。対照的に、抗- $\alpha_v \beta_3$ 抗体P1F6 抗体は、VEGF、TGF α 及びホルボールエステルPMAにより誘発される血管形成を阻止するが、bFGFまたはTNF α により誘発される血管形成に対する影響は少ない。

40

50

【0012】

よって、抗- $\alpha_v\beta_3$ 抗体に対して低感受性を示す腫瘍は $\alpha_v\beta_5$ 依存的に血管形成を促進するサイトカインを分泌することが考えられる。これらを考慮すると、抗- $\alpha_v\beta_3$ 抗体及び $\alpha_v\beta_5$ 抗体はガンの診断及び治療用の有望な道具である。

【0013】

しかしながら、LM609のようなマウスモノクローナル抗体はヒトにおいてかなり免疫原性であり、よってガン治療のための使用可能性が限定され、特に反復投与を必要とするときにはそうである。マウスモノクローナル抗体の免疫原性を低減するために、マウスモノクローナル抗体の可変Igドメインをヒト不変Igドメインに融合したキメラモノクローナル抗体を作成した。Morrison, S. L., 「キメラヒト抗体分子：ヒト不変領域ドメインを有するマウス抗原結合ドメイン(Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains)」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6841-6855 (1984) 及び Boulianne, G. L. ら, 「機能性キメラマウス／ヒト抗体の作成(Production of a functional chimaeric mouse/human antibody)」, Nature, 312, 673-646 (1984) 参照。この方法は、通常抗体の「ヒト化」と呼ばれている。

【0014】

通常、キメラモノクローナル抗体は、マウスモノクローナル抗体の結合特異性を維持し、ヒトエフェクター細胞と改良された相互作用を示す。これにより、腫瘍細胞をモノクローナル抗体を用いて除去する方法の1つであると見做される改良された抗体依存性細胞性細胞傷害が生ずる。Morrison, S. L., 「インビトロ抗体：作成及び使用方法(In vitro antibodies; Strategies for production and application)」, Ann. Rev. Immunol., 10, 239-265 (1992) 参照。幾つかのキメラモノクローナル抗体はヒトにおいて低免疫原性であることが判明したが、マウス可変Igドメインのためになお有意なヒト抗-マウス応答が生じ得る。Bruggemann, M. ら, 「キメラ抗体の免疫原性(The immunogenicity of chimeric antibodies)」, J. Exp. Med., 170, 2153-2157 (1989)。従って、治療目的のためには、可変及び不変Igドメインを改変することによりマウスモノクローナル抗体を完全にヒト化することが必要である。

【0015】

完全ヒト化は、マウスの重鎖及び軽鎖可変Igドメイン由来の6つのCDRをヒト可変Igドメインの適当なフレームワーク部に導入することにより実現可能である。このCDRグラフティング方法(Reichmann, L. ら, 「治療用の再成形ヒト抗体(Reshaping human antibodies for therapy)」, Nature, 332, 323 (1988))は、抗原との主接触物であるCDRループを支持するための足場として作用する4つのフレームワーク部(FR1-FR4)を有する可変Igドメインの保存構造の利点を有する。Walldmannらの米国特許第5,502,167号明細書は、ヒトT細胞抗体にグラフトした、LCDR3を介してCDRループLCDR1及びラットIgG2bモノクローナル抗体であるYTH655(5)6由来のHCDR3を介してHCDR1を有する「ヒト化抗体」を開示している。

【0016】

しかしながら、CDRグラフティング方法の欠点は、フレームワーク部のアミノ酸が抗原結合に寄与し得、CDRループのアミノ酸も2つの可変Igドメインの結合に影響を及ぼし得ることである。ヒト化モノクローナル抗体のアフィニティーを維持するために、CDRグラフティング方法では、抗原結合サイトのコンピューターモデリングを利用するヒトフレームワーク部及び単一アミノ酸の部位特異的組換えを使用している(例えば、Co, M. S. ら, 「血小板インテグリン gp11b/11a に特異的なヒト化抗体(A humanized antibody specific for the platelet integrin gp11b/11a)」, J. Immunol., 152, 2968-2976 (1994))。合理的設計によるマウスモノクローナル抗体のヒト化の成功例は多数報告されている。これらの中には、潜在的な臨床用途を有

10

20

30

40

50

するヒトインテグリンに対するモノクローナル抗体が幾つかある。J. Immunol., 152, 2968-2976; Hsiao, K. C. ら, 「抗-CD18抗体60.3のヒト化: L2ループの重要性(Humanization of 60.3, an anti-CD18 antibody; Importance of the L2 Loop)」, Protein Eng., 7, 815-822 (1994)、及びPoul, M. A. ら, 「T細胞活性化のヒト化抗- β_1 インテグリン鎖mAbにより抑制(Inhibition of T cell activation with a humanized anti-beta 1 integrin chain mAb)」, Mol. Immunol., 32, 101-116 (1995) 参照。

【0017】

ヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスは、マウスモノクローナル抗体のヒト化のための有望な代替物を提供する。例えば、Fishwild, D. M. ら, 「ミニ座トランスジェニックマウスの新規株由来の高アビディティを有するヒトIgGκモノクローナル抗体(High-avidity human IgGκ monoclonal antibodies from a novel strain of mini locus transgenic mice)」, Nature Biotechnology, 14, 845-851 (1996) 参照。免疫化に応答して、これらのマウスは慣用のハイブリドーマ方法により入手できるヒトモノクローナル抗体を発現する。

【0018】

タンパク質エンジニアリングにおける合理的設計方法は、主にファージディスプレイライブラリーに基づくインビトロ選択方法により攻撃した。Clackson, T. 及びWells, J. A., 「タンパク質及びペプチドライブラリーからのインビトロ選別(In vitro selection from protein and peptide libraries)」, TIBTECH, 12, 173-184 (1994) 参照。特に、ファージディスプレイライブラリー由来の抗体のインビトロ選択及び作成は強力な道具となった。Burton, D. R. 及びBarbas III, C. F., 「組合せライブラリー由来のヒト抗体(Human antibodies from combinatorial libraries)」, Adv. Immunol., 57, 191-280 (1994) 及びWinter, G. ら, 「ファージディスプレイ法による抗体の作成(Making antibodies by phage display technology)」, Annu. Rev. Immunol., 12, 433-455 (1994) 参照。

【0019】

ヒト抗体遺伝子のレパトアを作成するための技術の開発及びフィラメント状バクテリオファージの表面上でのコード化抗体断片の表示により、ヒト抗体を直接作成するための手段が提供された。ファージ方法により作成した抗体は、バクテリアにおいて抗原結合断片(通常、FvまたはFab断片)として産生され、よってエフェクター機能を欠いている。エフェクター機能は2つの方法の1つにより導入され得る。断片は、哺乳動物細胞において発現するための完全抗体に、またはエフェクター機能をトリガーし得る第2結合サイトを有する二重特異性抗体断片に改変され得る。

【0020】

通常、抗体のFd断片(V_H-C_H1)及び軽鎖(V_L-C_L)はPCRにより別々にクローン化され、組合せファージディスプレイライブラリーにランダムに組換えられ、その後前記ライブラリーは特定抗原への結合のために選択され得る。Fab断片はファージ表面上で発現され、すなわち該断片をコードする遺伝子に物理的に結合する。よって、Fabを抗原結合により選択すると、Fabコーディング配列をも選択される。前記Fabコーディング配列はその後増幅され得る。パンニングと言われる手順である抗原結合及び再増幅を繰り返すことにより、抗原に対して特異的なFabが富化し、最後に単離される。

【0021】

1994年に、「誘導選択(guided selection)」と呼ばれる抗体のヒト化方法が公知となった。誘導選択は、マウスモノクローナル抗体のヒト化のためのファージディスプレイ法の力を利用する。Jespers, L. S. ら, 「抗原の単一エピトープに対するファージディスプレイレパトアからのヒト抗体の選択のガイド(Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen)」, Bio/Technology, 12, 899-903 (1994) 参照。このために、

マウスモノクローナル抗体のF d断片はヒト軽鎖ライブラリーと組合せて表示され得、次いで生じたハイブリッドF a bライブラリーは抗原を用いて選択され得る。こうして、マウスF d断片は選択をガイドするための鋳型を提供する。

【0022】

その後、選択したヒト軽鎖はヒトF d断片ライブラリーと組合わされる。生じたライブラリーを選択すると、完全なヒトF a bが生ずる。

【0023】

マウスモノクローナル抗体の完全ヒト化のために、本発明はC D Rグラフティング及び誘導選択の独自の組合せを使用する。生じた抗-インテグリン抗体はガンの診断及び治療のために有用である。

【0024】

(発明の要旨)

マウスモノクローナル抗体は、誘導選択及びC D Rグラフティングの組合せによりヒト化される。本明細書及び添付の請求の範囲中に使用される用語「ヒト化」は、マウスモノクローナル抗体の少なくとも1つの鎖がヒトモノクローナル抗体の部分を含むことを意味する。

【0025】

ヒト化マウスモノクローナル抗体は、各鎖が可変ドメインを含み且つ対応するマウスの重鎖及び軽鎖抗体の相補性決定部(C D R)アミノ酸配列である少なくとも1つのC D Rアミノ酸配列を有するヒト抗体重鎖または軽鎖のライブラリーを構築し、次いでこうして構築したライブラリーを、予備選択した抗原を結合する抗体由来の相補鎖と組合せることにより作成される。この方法では、構築されたライブラリー中に存在するヒト鎖と相補鎖が一緒になって、ヒト化鎖対のライブラリーにおいて重鎖と軽鎖の対を形成する。その後、特定のヒト化重鎖と軽鎖の対を上記した相補鎖を用いてヒト化対ライブラリーから選択する。

【0026】

特定実施態様では、マウスモノクローナル抗体は、各軽鎖が少なくともその可変ドメイン及び少なくとも1つのマウス軽鎖のC D Rアミノ酸配列を含むヒト軽鎖ライブラリー、及び各重鎖が少なくともその可変ドメイン及び少なくとも1つのマウス重鎖のC D Rアミノ酸配列を含むヒト重鎖ライブラリーを構築することによりヒト化され得る。重鎖のサイズは、通常約200以下のアミノ酸残基である。

【0027】

マウスC D Rを有するヒト軽鎖を、予備選択した抗原を結合する抗体由来の重鎖を用いて構築したヒト軽鎖ライブラリーから選択する。構築した重鎖ライブラリーを、マウスC D Rを有する選択したヒト軽鎖と組合せると、各々が少なくとも1つのマウスC D Rを有する重鎖と軽鎖の対のヒト化ライブラリーが作成される。その後、マウスC D Rを有する重鎖と軽鎖の対は、マウスC D Rを有する選択したヒト軽鎖を用いて上記したヒト化ライブラリーから選択される。上記したライブラリーの構築の順序は臨界的でなあ。

【0028】

好ましくは、モノクローナル抗体の軽鎖相補性決定部3(L C D R 3)ループのみをヒト軽鎖にグラフトする。同様に、H C D R 3ループのみをヒト重鎖(H C)断片にグラフトすることが好ましい。グラフト化マウスC D Rを有するヒト軽鎖またはヒト重鎖は、鋳型としてキメラマウス/ヒト相補鎖を使用することにより選択することが好ましい。

【0029】

ヒト軽鎖上へのC D Rグラフティングでは、ヒト軽鎖をクローン化し、次いでクローンを無作為に組換えて、組合せファージディスプレイライブラリーのようなライブラリーを形成する。同一の方法が、ヒト重鎖上にグラフト化するためにも使用され得る。

【好ましい実施態様の説明】

本発明は多くの異なる形態の実施態様が許容するが、本発明の好ましい実施態様を以下に述べる。但し、本開示は本発明の原理の例示とみなされるべきであり、本発明を例示した

10

20

30

40

50

特定実施態様に限定することを意図しないことは理解されるべきである。

【0030】

マウスモノクローナル抗体LM609のcDNAクローニング

LM609ハイブリドーマ細胞系(ATCC名称HB9537)から出発して、RNA単離キット(Stratagene, La Jolla, CA)を使用して108LM609ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製した。基本的にA. S. Kangらにより「ファージ1におけるコンビネーション免疫グロブリンライブラリー」(Methods 2, 119 (1991))の中で述べられているように、Fd断片及びκ鎖コード配列の逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を実施した。

【0031】

Fd断片及びK鎖をコードするPCR産物をそれぞれXhoI/SpeIとSacI/XbaIで切断し、適切に消化したファージミドベクターpComb3Hに連続的に連結した。連結産物を電気形質転換により大腸菌株XL1-Blueに導入し、その後の段階はC. F. Barbas IIIらにより「ファージ表面でのコンビネーション抗体ライブラリーの構築：遺伝子III部位」(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7978-7982)に述べられているようにして、表面にFabを示すファージを作製した。固定化したインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対するパニングによってファージを選択した。2回のパニング操作後、単一クローンをLM609 Fab断片の発現に関して分析した。IPTG誘導培養からの上清を、アルカリホスファターゼに複合したヤギ抗マウスFab'を二次抗体として使用して、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)により固定化インテグリン $\alpha_v\beta_3$ への結合に関して検査した。陽性クローンの各々のFd断片の配列及び各々のκ鎖コード配列をDNAの塩基配列決定によって決定した。

【0032】

ヒト軽鎖及びFd断片配列の増幅

TRI試薬(Molecular Research Center; Cincinnati, OH)を使用して5名のドナーの骨髄(Poietic Technologies; Germantown, MD)から全RNAを調製し、塩化リチウム沈降反応によってさらに精製した。Sambrook, J. ら(1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY参照。オリゴ(dT)プライミングによる第一鎖cDNA合成キット用のSUPERScript Preamplification System(Life Technologies; Gaithersburg, MD)を使用して第一鎖cDNAを合成した。生じた5つの第一鎖cDNAを別々のPCR増幅に供した。

【0033】

第一鎖cDNAの各々の V_λ 配列を、4個のセンスプライマーと2個のアンチセンスプライマー(下記のリスト参照)を組み合わせた8種類の別々の反応で増幅した。9個のセンスプライマーと1個のアンチセンスプライマー(下記のリスト参照)を組み合わせた9種類の別々の反応においてVK配列を増幅した。下線を付したCDRループを含めて、 V_λ と V_κ のアミノ酸配列をそれぞれ図2aと2bに示す(それぞれ配列番号44と配列番号45も参照)。

【0034】

4個のセンスプライマーと1個のアンチセンスプライマー(下記のリスト参照)を組み合わせた4種類の反応において V_H 配列(配列番号56参照)を増幅した。増幅はすべて、Taqポリメラーゼ(Pharmacia; Uppsala, Sweden)を使用して標準PCR条件下で実施した。センスプライマーは種々の V_g 、 V_λ 及び V_H 族のN末端アミノ酸をコードする配列ハイブリッド形成するが、アンチセンスプライマーはそれぞれ、高度に保存される V_g 、 V_λ あるいは V_H のC末端アミノ酸をコードする配列にハイブリッド形成する。

【0035】

ヒト抗体配列の増幅に使用したプライマーのリストを次のものを含む：

V_g センスプライマー：

H S C K 1 - F	配列番号 3	H S C L a m 6	配列番号 1 4
H S C K 2 4 - F	配列番号 4		
H S C K 3 - F	配列番号 5	H S C L a m 7 0	配列番号 1 5
H S C K 5 - 5	配列番号 6		

V_g アンチセンスプライマー：

B K F R 3 U N	配列番号 7	H S C L a m 7 8	配列番号 1 6
B K 2 F R 3 U N	配列番号 8	H S C L a m 9	配列番号 1 7

V_λ センスプライマー：

H S C L a m 1 a	配列番号 9	V_λ アンチセンスプライマー：	
H S C L a m 1 b	配列番号 1 0	B L F R 3 U N	配列番号 1 8
H S C L a m 2	配列番号 1 1		
H S C L a m 3	配列番号 1 2	V_H センスプライマー：	
H S C L a m 4	配列番号 1 3	H F V H 1 - F	配列番号 1 9
H F V H 2 - F	配列番号 2 0		
H F V H 3 5 - F	配列番号 2 1		
H F V H 4 - F	配列番号 2 2		

V_H アンチセンスプライマー：

B F R 3 U N	配列番号 2 3
-------------	----------

【0036】

LM609の V_H をヒト C_H1 に融合することによるキメラマウス／ヒトFd断片の構築LM609 Fab配列を含むファージミドベクターpComb3Hをテンプレートとして使用して、PCRプライマー対、PELSEQ（配列番号24）／BFR3UN（配列番号25）によってLM609の V_H のN末端FR1からFR3までの断片をコードする配列を増幅した。センスプライマーPELSEQは、pComb3HにおいてFd断片をコードする配列の上流のpelBリーダー配列にハイブリッド形成する。アンチセンスプライマーBFR3UNは、高度に保存され、LM609の V_H の対応するアミノ酸配列（配列番号27）と1個のアミノ酸が異なる、 V_H のFR3の8個のC末端アミノ酸をコードする配列（配列番号26）にハイブリッド形成する。

【0037】

オーバーラップ伸長PCR（McArn Horton, R. とReadington Pease, L. (1991) RECOMBINATION AND MUTAGENESIS OF DNA SEQUENCES USING PCR IN DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, M. J. McPherson編集、IRL Press, Oxford, UK, p. 217-247参照）により、PELSEQ／BFR3UN産物を、 V_H のFR4に結合したLM609のHCDR3（配列番号1）及びヒト抗gp120抗体b8の C_H1 ドメイン全体をコードするPCRフラグメントに融合した。このフラグメントはあらかじめPCRプライマー対、CR501（配列番号28）／CR301（配列番号29）によって増幅しておいたものである。センスプライマーCR501は、FR3の9個のC末端アミノ酸、LM609のHCDR3（配列番号1）を形成する8個のアミノ酸、及びb8のFR4の6個のN末端アミノ酸の合成リンクをコードする。b8のFR4は、C末端のアミノ酸を除いてLM609の V_H のFR4と同じであるため、ここでは好ましい選択である。C末端アミノ酸は、LM609についてはA、b8についてはSである。CR501とBFR3UNの24bpがオーバーラップすることから、オーバーラップ伸長PCRによって対応するPCR産物を融合させた。

【0038】

センスプライマーCR301は C_H1 のC末端をコードする配列にハイブリッド形成し、

10

20

30

40

50

そのPCR産物をpComb3H上の遺伝子III ORFに連結することを可能にするSpeI部位を導入する。このオーバーラップ伸長PCRの産物をXhoI/SpeIで切断し、適切に消化されたファージミドベクターpComb3Hに連結して、正しい配列をDNA配列決定によって確認した。

【0039】

LM609のLCDR3を含有するヒト軽鎖によるLM609軽鎖の置換オーバーラップ伸長PCRを使って、 V_{κ} と V_{λ} のN末端FR1～FR3断片をコードする増幅ヒト配列を、ヒト V_{κ} または V_{λ} のFR4およびヒト C_{κ} または C_{λ} ドメインに結合したLM609のLCDR3（配列番号2）をコードするPCR断片に融合した。pComb3中の抗gp120抗体b11の配列をテンプレートとして使用し、PCRプライマー対CR503（配列番号30）/T7B（配列番号31）およびCR508（配列番号32）/T7Bによって、2つの κ 断片を生成させた。

10

【0040】

センスプライマーCR503とCR508は、ヒト V_{κ} のFR3の8個のC末端アミノ酸（配列番号33または配列番号34）、LM609のLCDR3を形成する9個のアミノ酸（配列番号2）およびb11のFR4の7個のN末端アミノ酸の合成リンクをコードする。b11のFR4が好ましい選択肢である。なぜならこれは、LM609ではGとTであるのに対してb11ではQとAである三番目のN末端アミノ酸とC末端アミノ酸を除けば、LM609の V_{κ} のFR4と同一だからである。CR503とBKFR3UNおよびCR508とBK2FR3UNの間の23bpのオーバーラップにより、オーバーラップ伸長PCRで対応するPCR産物を融合することができた。

20

【0041】

バックワードプライマーT7Bは、軽鎖コード配列の下流にあるpComb3配列にハイブリッド形成する。ヒト骨髓由来のCLe xtプライムド第一鎖cDNAをテンプレートとして使用し、PCRプライマー対CR510（配列番号35）/CLe xt（配列番号36）によって、 λ 断片を生成させた。

【0042】

センスプライマーCR510はヒト V_{λ} のFR3の7個のC末端アミノ酸（配列番号37）、LM609のLCDR3を形成する9個のアミノ酸およびヒト V_{λ} のFR4の7個のN末端アミノ酸（配列番号38）の合成リンクをコードする。CR510とBLFR3UNの間の21bpのオーバーラップにより、オーバーラップ伸長PCRで対応するPCR産物を融合することができた。バックワードプライマーCLe xtはヒト C_{λ} コード配列の3'末端にハイブリッド形成し、XbaI部位を導入する。

30

【0043】

生成した軽鎖コード配列をSacI/XbaIで切断し、キメラマウス/ヒトFd断片を含有する適切に消化されたファージミドベクターpComb3Hに連結した。その連結生成物を大腸菌ER2537株（New England Biolabs社；マサチューセッツ州ビバリー）に電気形質転換することにより、 1.5×10^8 個の独立した形質転換体からなる軽鎖ライブラリーを得た。DNA配列決定により、融合断片の正しい集合が明らかになった。

40

【0044】

固定化ヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ に対する4ラウンドのパニングを、基本的にC. F. Barbas, IIIらがその論文「設計と選択による高アフィニティー自己反応性ヒト抗体：インテグリンリガンド結合部位を標的として（原題：High-affinity self-reactive human antibodies by design and selection: targeting the integrin ligand binding site）」（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10003-10007 (1993)）に記述しているようにして、金属緩衝液（25mM Tris-HCl, pH 7.5；137mM NaCl；1mM KCl；1mM MgCl₂；1mM CaCl₂；1mM MnCl

50

2) 25 μ l 中のタンパク質 200 ng をコーティングに、また TBS 中の 0.05% Tween 20 を洗浄に、また TBS 中の 10 mg/ml トリプシンを溶出に使用して行った。洗浄段階は、第一ラウンドでの 5 回から第二ラウンドでは 10 回に、また第三および第四ラウンドでは 15 回に増やした。各ラウンドのアウトプットファージプールをファージ ELISA によってモニターした。

【0045】

第四ラウンド後に、各単クローンからファージを生成させ、ファージ ELISA により、固定化インテグリン $\alpha_v \beta_3$ への結合について試験した。pComb3H 中の軽鎖コード配列の上流にある ompA リーダー配列にハイブリッド形成するプライマー OMPSEQ (配列番号 39) を使った DNA 配列決定によって、陽性クローンの軽鎖コード配列を分析した。

10

【0046】

LM609 の重鎖相補性決定領域 3 (HCDR3) を含有するヒト Fd 断片による LM609 Fd 断片の置換

3 つの PCR 断片をオーバーラップ伸長 PCR により 1 段階で融合した。軽鎖パニングで得られた選択ファージミドをテンプレートとして、断片 1 を PCR プライマー対 RSCF (配列番号 40) / leader-B (配列番号 41) で増幅した。センスプライマー RSCF は軽鎖コード配列の上流にある配列にハイブリッド形成し、一方、アンチセンスプライマー leader-B は Fd 断片コード配列の上流にある配列にハイブリッド形成する。VH の FR1 ~ FR3 断片をコードする増幅されたヒト配列 (上記参照) を断片 2 として使用した。

20

【0047】

断片 3 は、ハイブリッドマウス / ヒト Fd 断片 (上記参照) をテンプレートとして、PCR プライマー対 CR501 / HIGG1-B (配列番号 42) で増幅した。アンチセンスプライマー HGG1-B は C_H1 コード配列の 3' 末端にハイブリッド形成する。leader-B と HFVH-F プライマーの間の 21 bp のオーバーラップおよび BFR3UN と CR501 の間の 24 bp のオーバーラップを利用して、PCR プライマー対 RSCF / FSC-B (配列番号 43) で、これら 3 つの断片を融合し、増幅した。アンチセンスプライマー RSC-B は HIGG1-B とオーバーラップする。RSCF と RSC-B は 2 つの非対称的 SfiI 部位を導入する。

30

【0048】

高い複雑性を維持するために、軽鎖パニングで選択された各ファージミド (断片 1) と、5 つの第一鎖 cDNA 源に由来する 5 つの V_H 断片プールのそれぞれ (断片 2) について、個別の PCR 反応を行なった。選択されたヒト軽鎖がヒト Fd 断片に連結されているものをコードする生成断片を SfiI で切断し、適切に消化されたファージミドベクター pComb3H に連結して、 3×10^7 個の独立した形質転換体からなるライブラリーを生成させた。

【0049】

DNA 配列決定により、融合した DNA 断片の正しい集合が明らかになった。固定化ヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ に対する 4 ラウンドのパニングを、ちょうど軽鎖パニングについて記述したように行なった。各ラウンドのアウトプットファージプールをファージ ELISA によってモニターした。第四ラウンド後に、軽鎖および Fd 断片コード配列を、選択されたファージミドから、SfiI 消化によって単離し、互換発現ベクター pPhoA-H6HA にサブクローニングした。

40

【0050】

リン酸欠乏培地で生育した個々のクローンの溶解液を、アルカリ性ホスファターゼに結合したヤギ抗ヒト F(ab')₂ (Pierce 社) を二次抗体とする ELISA によって、固定化インテグリン $\alpha_v \beta_3$ への結合について分析した。陽性クローンの軽鎖および Fd 断片コード配列を、それぞれプライマー OMPSEQ および PELSEQ を使った DNA 配列決定によって分析した。

50

【0051】

結果

LM609のcDNAクローニング

LM609発現ハイブリドーマ細胞から出発して、 λ 鎖Fd断片と全 κ 鎖をコードするcDNAをPCRによってクローニングした。それらのPCR産物をpComb3に由来するファージミドpComb3Hにクローニングし、M13繊維状ファージの表面へのFabの発現が容易になるように操作した。LM609 Fabをディプレイするファージを、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対するパニングによって選択し、対応するcDNAを配列を決定した。大腸菌から精製された可溶性LM609 FabをELISAによって分析したところ、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に特異的に結合することがわかった。

10

【0052】

誘導的選択(guided selection)とCDR移植の組合せによるLM609の逐次的ヒト化法を図1に図解する。ヒト軽鎖選択については、2つの適合するヒト定常ドメイン C_κ と C_{H1} の相互作用によって第一選択段階のハイブリッドFabを安定化するために、マウスFd断片をヒト C_{H1} に連結されたマウス V_H からなるキメラFd断片で置換する。ハイブリッドFabの安定化はその抗原結合部位を安定化することにもなる。

【0053】

誘導的選択は、LM609の移植LCDR3ループを含有するヒト κ および λ 軽鎖ライブラリーでLM609の κ 軽鎖を置換することによって開始される。次に、ハイブリッドFabをディスプレイする対応ファージライブラリーを、固定化インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対する4ラウンドのパニングによって選択する。アウトプット数はラウンドごとに増加しないものの、各ラウンドで得られたアウトプットファージプールをファージELISAによってインテグリン $\alpha_v\beta_3$ への結合について分析すると、見出されるシグナルが増える。第四ラウンド後に、各クローンからファージを調製し、ファージELISAにより、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ への結合について試験する。

20

【0054】

これらのクロンの大半は、バックグラウンドを超える何らかの結合を示すシグナルを与えるが、この場合は6つのクロンが極めて強いシグナルを与えた(図3a~3eを参照されたい)。これらのクロンのDNA配列により、3つの異なる軽鎖配列が明らかになった。6つの陽性クロン中5つに見出された2つの軽鎖配列は4つのアミノ酸しか相違せず、すなわち96%同一だった。第三の軽鎖配列は他の2つの配列と約80%の同一性を有する。しかしこの配列は、そのそれぞれを異なる V_κ ファミリーの生殖系列と整列させることができる2つの部分を持ったことから、これはおそらく、増幅抗体配列中にしばしば出現することが報告されている人為産物、PCRクロスオーバーから生じたと思われる。

30

【0055】

図3a~3eについて述べると、6つのヒト V_κ の分析により、高度に関連する κ 鎖配列のグループ2つが明らかになった。また、 V_κ と V_λ の集合に或る役割を果たすと考えられる、選択された6つのヒト V_κ のCDR1ループはすべて、LM609 V_κ の対応する領域に似ている。これは、LM609のテンプレート V_λ が、LM609抗原、ヒトインテグリン $\alpha_v\beta_3$ と共に、LM609 κ 鎖に関連するヒト κ 鎖に、選択したことを示している。反復配列が見出されなかったという事実は、選択されたヒト κ 鎖のすべてで同一なLM609の移植されたLCDR3ループが、LM609 κ 鎖の抗原結合への寄与の主たる原因であることを示しているのかもしれない。

40

【0056】

この推測は2つのさらなる観察によって支持される。第一に、最初のヒト化法はヒト κ 鎖ライブラリーに基づくものだった。4ラウンドのパニングにより、LM609 κ 鎖に関連する配列を持つ反復ヒト κ 鎖が選択された。しかし対応するハイブリッドFabはヒトインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に弱く結合するに過ぎないようだった。そこで、LM609のLCD

50

R 3 ループをヒト κ 鎖ライブラリーに移植したところ、E L I S A から大雑把に見積もっただけではあるが、対応する選択されたハイブリッド F a b のヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ への結合が改善された。

【0057】

第二に、選択されたファージを、固定化ヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ に対するさらに 2 ラウンドのパニングで選択した。再び、選択されたファージミドに由来する可溶性のものを、E L I S A によって固定化ヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ への結合について分析した。今度は、分析した 20 クローンが全て特異的に結合することがわかった。しかし 16 個のクロンを配列決定したが反復配列は見出されなかった。したがって、L M 6 0 9 の L C D R 3 ループを含有する多くの異なるヒト κ 鎖配列が、ヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ への結合に大きな相違を伴わずに L M 6 0 9 κ 鎖を置換できるようである。この発見は、ヒト化 L M 6 0 9 の治療への応用にとって重要であると考えられる。

10

【0058】

アロタイプの配列変異性ゆえに、ヒト化抗体は、反復注射後に患者の免疫系によって中和されうる。この問題は、同じ抗原結合性を持つがアミノ酸配列が異なるヒト化抗体を反復投与に使用することによって回避される。

【0059】

元の L M 6 0 9 軽鎖と同様に、選択された軽鎖はそれぞれ κ 軽鎖である。さらに、データベーススクリーニングにより、それらが $V_\kappa 6$ ファミリーに属する同じ生殖系列、すなわち D P K - 2 6 に由来することが明らかになった。 $V_\kappa 6$ ファミリーはヒト抗体には頻繁には見出されないの、これはこれらの配列への強い選択を物語っている。この強い選択の一つの明白な理由は、元のマウス軽鎖に対する選択されたヒト軽鎖の比較的高い配列類似性である。

20

【0060】

比較のために図 4 を参照すると、未選抜ライブラリーから 4 個のクロンを無作為に選び、その軽鎖の配列決定を行った。比較のために使用した 3 個の選択されたヒト軽鎖は、元のマウス L C D R 1 の長さである 11 個の L C D R 1 アミノ酸からなっていたが、選抜されなかった 4 個のヒト軽鎖のうち、1 個だけは、元のマウス配列を有する同じ L C D R 1 の長さを有していた（図 4 参照）。

【0061】

さらに、選択されたヒト軽鎖の L C D R 1 および L C D R 2 はともに、対応するマウス配列と非常に類似している。元のマウス軽鎖配列の構造領域 2 の C 末端アミノ酸は、図 4 において括弧で示されているリジン（L y s）であるが、このアミノ酸はこの位置では異常なアミノ酸である。従って、この C 末端アミノ酸は抗原結合部位の形成に関与していると考えられる。驚くべきことに、選択されたヒト軽鎖配列のすべてがこの位置にリジンを含有しているが、選抜されなかった配列すべては、代わりにチロシン（T y r）を含有している。実際、 $V_g 6$ ファミリーは、その位置にリジンを含有する唯一のヒト V_g ファミリーである。

30

【0062】

まとめると、上記の事実により、マウスの V_H テンプレートと、偏ったヒト V_g 配列について選択された抗原とは元のマウス V_g 配列と関連していることが明らかにされる。軽鎖の選択から得られた 3 個のクロンは、上記の 6 個のクロンよりも弱いインテグリン $\alpha_v \beta_3$ を明らかにしているが、バックグラウンドを越える有意な結合を依然として有しており、これらのクロンもまた D N A 配列決定によって分析された。これらの分析により、3 個の関連しない V_λ 配列が、選択された V_g 配列とともに（ただし、P C R の交差的人工物から生じた 1 個を除く）、L M 6 0 9 の重鎖のヒト化におけるテンプレートとして使用されることが明らかにされた。

40

【0063】

上記のヒト化方法に基づいて、抗ヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ モノクローナル抗体 L M 6 0 9 のヒト化体を 5 個作製した。この 5 個の改変体が、 $\alpha_v \beta_3$ に結合する 14 個のヒト化

50

クローンを配列分析することによって明らかにされた。図 8 a および図 8 b を参照すると、マウス V_L のアミノ酸配列（配列番号 45）が、改変体 A ならびに結合体（または群）の B、C、D および E のアミノ酸配列と比較されている。

【0064】

同様に、図 8 c ～図 8 e は、マウス V_H のアミノ酸配列（配列番号 56）が、5 個の改変体（または群）A ～ E のアミノ酸配列と比較されている。これらの改変体のうち、クローン 7、8 および 22（B 群）；クローン 4、31 および 36（C 群）；クローン 24、34 および 40（D 群）；ならびにクローン 2（E 群）により示される 4 個はアミノ酸配列が非常に関連している。図 8 a および図 8 b における配列群 BCDE は、同一な V_L ドメイン（配列番号 49）を有する 4 個の改変体を表している。すべてが生殖系列 DP-65 またはそれに非常に関連する DP-78 に由来するそれらの V_H ドメインのアミノ酸配列（配列番号 50 ～ 53）は、各改変体について少なくとも 90% の同一性を有する。

10

【0065】

対照的に、改変体 5 は、クローン 10、11 および 37（A）を含み、異なる生殖系列ファミリーに由来する V_H ドメイン（配列番号 54）を有するヒト化改変体を表す。このヒト化改変体もまた、異なる V_L ドメイン（配列番号 55）を含有する。しかし、このドメインは 95% の同一性を有し、同じ生殖系列に由来する。生殖系列は、the MRC Center for Protein Engineering から得られる Human V Gene Sequences の VBASE ディレクトリーによって提供される DNAPLOT ソフトウェアを使用する核酸の配列比較によって決定された。

20

【0066】

LM609 の LCDR3（配列番号 2）配列および HCDR3（配列番号 1）配列などの元の相補性決定領域配列を保存することにより、開示されたヒト化方法によってエピトープの保存が確実にされる。エピトープの保存は、抗体のヒト化において、特に LM609 の場合には重要な要求である。機能を阻止する抗ヒトインテグリン $\alpha_V \beta_3$ のマウスモノクローナル抗体 LM609 は、 α_V ポリペプチド鎖および β_3 ポリペプチド鎖の両方を含むまだ同定されていない非線形エピトープに結合する。重要なことは、このエピトープに結合することによって、LM609 は、 $\alpha_V \beta_3$ を発現する血管細胞におけるアポトーシスを誘導する。これは、多数の抗ヒトインテグリン $\alpha_V \beta_3$ マウスモノクローナル抗体における特徴的な特徴である。LM609 は、関連するヒトインテグリン $\alpha_{IIb} \beta_3$ を認識しない。血小板において発現されるヒト $\alpha_{IIb} \beta_3$ との何らかの交差反応性は、ガン治療における手段としての LM609 の使用を妨げる。

30

【0067】

LM609 の 5 個のヒト化改変体（クローン 2、4、7、11 および 24）は、固定化された、従って変性した可能性があるヒトインテグリン $\alpha_V \beta_3$ に対する結合によって選択されたが、細胞表面に発現する無傷のヒトインテグリン $\alpha_V \beta_3$ に対する結合について試験された。これに関して、トランスフェクションしていない CS-1 ハムスター細胞、およびヒト β_3 cDNA または β_5 cDNA のいずれかでトランスフェクションされた CS-1 ハムスター細胞に対するヒト化 LM609 の結合をフローサイトメトリーによって分析した。マウス LM609 と同様に、しかし対照抗体とは対照的に、LM609 の 5 個のヒト化改変体はすべて、ヒト β_3 cDNA でトランスフェクションされた CS-1 ハムスター細胞に対する特異的な結合が明らかにされた（図 5 a ～ 5 f 参照）。

40

【0068】

ヒト化 LM609 とヒトインテグリン $\alpha_{IIb} \beta_3$ との交差反応性の可能性を ELISA によって分析した。既知の交差反応性を有する抗体 Fab-9 は、固定化されたヒトインテグリン $\alpha_V \beta_3$ および $\alpha_{IIb} \beta_3$ の両方に結合したが、交差反応性は、マウス LM609 またはその 5 個のヒト化改変体のいずれに対しても検出されなかった（図 6 参照）。

【0069】

従って、これらのすべての事実は、LM609 のヒト化プロセスによるエピトープ保存に有利であることを示している。

50

【0070】

親和性の成熟は、治療的に適用するために抗体を操作する際には非常に問題となる工程である。標的親和性を増大させることによって、治療に効果的であるように達しなければならない抗体のインビボ濃度は低下させられる。抗体療法の費用を低下させることに加えて、低い効果的なインビボ濃度は、免疫応答の機会を減らすのに役立つ。

【0071】

抗体の親和性成熟に関するCDRウォーキング法が、別途記載されているが、関連分野においては知られている。ヒト化LM609の親和性成熟に関して、LCDR3およびHCDR3の段階的な最適化が選ばれた(図7参照)。両方のCDRにおけるランダム化領域は、ヒトの抗体配列において最も大きな変化が明らかにされた4アミノ酸の範囲に限定した。Kabat, E. A.ら(1991)、SEQUENCES OF PROTEIN S OF IMMUNOLOGICAL INTEREST、米国保健省、Washington, D. C.を参照のこと。NNKドープング(Barbas, C. F. 他(1994)、IN VITRO EVOLUTION OF A NEUTRALIZING HUMAN ANTIBODY TO HIV-1 TO ENHANCE AFFINITY AND BROADEN STRAIN CROSS-REACTIVITY、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91、3809~3813)を使用することにより、4つのコドンのランダム化は32または 1×10^6 の異なるヌクレオチド配列が生じる。これに基づき、そしてポアソン分布を(Clackson, T. および Wells, J. A. (1994)、IN VITRO SELECTION FROM PROTEIN AND PEPTIDE LIBRARIES、Trends in Biotechnol.、12、173~184)を仮定すると、 5×10^6 の独立した形質転換体が、99%の信頼性を有する完全なライブラリーには必要である。LM609の5個のヒト化改変体のそれぞれについて、独立的なLCDR3ランダム化ライブラリーを作製した。各ライブラリーにおける独立的な形質転換体の数は 5×10^6 を十分に越えている(下記の実験手順を参照のこと)。10個の完全に異なるLCDR3配列が、5個の各ライブラリーの2クローンをDNA配列決定することによって分析したときに得られた。同一の軽鎖と、生殖系列DP-65に由来する非常に関連する重鎖とを含有するヒト化LM609に基づく3個のライブラリー(クローン2、4および24)をまとめた。それらの元となる生殖系列配列に対応して、3個の残るライブラリーを、DPK-26 ran LCDR3/DP-10、DPK-26 ran LCDR3/DP-65およびDPK-26 ran LCDR3/DP-78と名付けた。これらの3個のライブラリーを平行して選抜した。

【0072】

より大きな親和性のLCDR3変異体の選抜を改善するために、固相オフレイト(off-rate)選抜(Yang, W. P. ら(1995)、CDR WALKING MUTAGENESIS FOR THE AFFINITY MATURATION OF A PROTEIN HUMAN ANTI-HIV-1 ANTIBODY INTO THE PICOMOLAR RANGE、J. Mol. Biol.、254、392~403)を使用した。5回の連続した選抜において、20 μ gのLM609のIgGを、200 ngまたは50 ngの固定化したヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ とともにウエルに加え、その後、ファージのインキュベーションおよび洗浄を行った。室温で24時間後、ウエルを再度洗浄して、結合したファージをトリプシンにより溶出した。このオフレイト選抜工程を次節で説明する。

【0073】

タンパク質の相互作用は、熱力学的パラメーターおよび運動論的パラメーターによって特徴づけられる。親和性定数($K_a = k_{on} / k_{off}$)は平衡定数であるが、会合速度定数(k_{on})および解離速度定数(k_{off})は、平衡を過ぎたインビボのプロセスに対する関連がより大きい。Williams, A. F. (1991)、OUT OF EQUILIBRIUM、Nature、353、473~474を参照のこと。実際、イン

10

20

30

40

50

ビボで生じるためには、大きな親和性（すなわち、大きな K_a 値）を有する相互作用は、迅速な会合（すなわち、大きな k_{on} 値）に依然として依存する。抗体は、抗原クリアランスに十分な時間を許容するために、大きな親和性の結合に関する熱力学的な選択と同時に、迅速に標的抗原に結合することに基づく速度論的选择に対する対象である。Foot, J. および Milstein, C. (1991)、KINETIC MATURATION OF AN IMMUNE RESPONSE、Nature、352、530～532を参照のこと。 K_a 値が $10^9 M^{-1}$ の範囲にある代表的な抗体／抗原相互作用は、 k_{on} 値が $10^5 M^{-1} s^{-1} \sim 10^6 M^{-1} s^{-1}$ の範囲にある場合には迅速に会合し、そして k_{off} 値が $10^{-3} s^{-1} \sim 10^{-4} s^{-1}$ の範囲にある場合にはゆっくりと解離する。親和性成熟（すなわち、 k_{off} を減少させること）に関するオフレイト選抜には、 $t_{1/2} = \ln 2 / k_{off}$ によって示される抗体／抗原相互作用の半減期の考慮が必要である。 $k_{off} = 1 \times 10^{-4} s^{-1}$ である抗体／抗原相互作用は、半減期が約2時間である。解離定数が10分の1である場合、すなわち、 $k_{off} = 1 \times 10^{-5} s^{-1}$ である場合、半減期は10倍になる：すなわち、約20時間になる。このような長い半減期は、本発明者らの親和性成熟プロトコルにおけるオフレイト選抜を制限する。妥当な時間範囲を使用して、解離定数が $1 \times 10^{-6} s^{-1}$ 未満である抗体は、多数の選抜サイクルの後でも濃縮することができない。しかし、類似するプロトコルを使用して、 k_{off} 値が $10^{-6} s^{-1}$ の範囲にあるgp120に対する抗体が選抜された。対応する親和性定数は $10^{11} M^{-1}$ の範囲であり、元の抗体の400倍を越える改善であった。

【0074】

3個の独立的に選択されたライブラリーのそれぞれから得られた8個のクローンをDNA配列決定により分析した。LCDR3の配列を下記の表1に示す。元の配列と非常に関連しているコンセンサス配列に対する厳しい選抜を行った。24個の分析したクローンはすべて、ランダム化領域の91位にセリン（Ser）を含有し、そしてその92位グルタミン（Gln）を含有する。元のLCDR3における対応するアミノ酸は、それぞれ、セリン（Ser）およびアスパラギン（Asn）である。驚くべきことに、NNKの遺伝コードの3つのセリンコドンのすべて（TC T、TC GおよびAC T）が91位に見出される。94位は、元のLCDR3においてはトリプトファン（Trp）であるが、24クローン中、22クローンにおいて再度選抜された。2クローンは、代わりにヒスチジン（His）を含有する。93位のみにおいて、より大きな変化が明らかにされる。元のセリン（Ser）は、芳香族アミノ酸または疎水性アミノ酸により置換されている：フェニルアラニン（Phe-13/24）、トリプトファン（Trp-6/24）、バリン（Val-3/24）、チロシン（Tyr-1/24）またはヒスチジン（His-1/24）のいずれかである。重鎖配列の分析により、これらの3つの独立的に選択されたライブラリーの間での公差反応は起こっていないことが明らかにされた。ライブラリーDPK-26ranLCDR3/DP-65から選択された8個のクローンはすべて、生殖系列DP-65に由来する配列をコードする3つの非常に関連する重鎖のプールを含有していたが、これらは同一であり、ヒト化LM609クローン24に由来した。

【0075】

保存されたLCDR3配列により、ヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ に対する非常に明確なエピトープに有利であることが示される。細胞表面での天然のヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ に対する結合はまだ明らかにする必要があるが、変性したヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ へのエピトープ変化は可能性がないと考えられる。選択されたファージプールを、ファージELISAにより、そしてLM609のIgGとの競合においてヒトインテグリン $\alpha_v \beta_3$ に対する結合について分析した。これらの分析により、LM609ならびにヒト化LM609と比較して、選択されたクローンの著しくより小さい解離定数が示唆される。3位における元のセリンが芳香族残基により置換されることによって、全体的な親和性に対する強い影響を伴う新しい疎水性相互作用が生じ得る。

【0076】

【表 1】

表 1

選択された L C D R 3 変異体

k a b a t 位置 ¹	91	92	93	94
LM609	Ser	Asn	Ser	Trp
ライブラリー DPK-26ranLCDR3/DP-10 ²	Ser	Gln	Trp	Trp
	Ser	Gln	Trp	Trp
	Ser	Gln	Trp	Trp
	Ser	Gln	Trp	Trp
	Ser	Gln	Val	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Phe	His
ライブラリー DPK-26ranLCDR3/DP-65 ³	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
ライブラリー DPK-26ranLCDR3/DP-78 ⁴	Ser	Gln	Trp	Trp
	Ser	Gln	Trp	Trp
	Ser	Gln	Val	Trp
	Ser	Gln	Val	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Phe	Trp
	Ser	Gln	Tyr	Trp
	Ser	Gln	His	Trp

1. 参照 K a b a t ら (1991)

2. ヒト化 LM609 クローン 11 に基く。

3. ヒト化 LM609 クローン 2、4 及び 24 に基く。

4. ヒト化 LM609 クローン 7 に基く。

【0077】

実験過程

材料

ハイブリドーマ培養物から精製された LM609 IgG は、Dr. David A. Cheresh により提供された。ヒト・インテグリン $\alpha_v \beta_3$ 及びヒト・インテグリン $\alpha_{IIb} \beta_3$ は、HIGH-AFFINITY SELF-REACTIVE HUMAN ANTIBODIES BY DESIGN AND SELECTION: TARGETING THE INTEGRIN LIGAND BINDING SITE, Barbas III, C. F., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10003-10007 に記載された起源由来であった。

トランスフェクトされていない CS-1 ハムスター細胞、及びヒト β_3 又は β_5 cDNA のいずれかでトランスフェクトされた CS-1 ハムスター細胞は、Dr. David A. Cheresh より入手され (Filarido, E. J., et al. (1995)

REQUIREMENT OF THE NPXY MOTIF IN THE INTEGRIN SUBUNIT CYTOPLASMIC TAIL FOR MELANOMA CELL MIGRATION IN VITRO AND IN VIVO

, J. Cell Biol. 130, 441-450)、5%ウシ胎仔血清(CFS)が追加されたRPMI培地中で7%CO₂中37℃で維持された。

【0078】

可溶性ヒト化LM609 Fabの大腸菌発現

ファージ・ライブラリーの増幅の後、選択されたヒト化LM609ファージミド・プールのSfiI挿入物を、 $\alpha_v\beta_3$ に結合するものを検出するため、大腸菌発現ベクターpPhoA-H6HA(Rader, C., and Barbas III, C. F. (1997) PHAGE DISPLAY OF COMBINATORIAL ANTIBODY LIBRARIES, Curr. Opin. Biotechnol. 8, 503-508を参照)へとクローニングした。14個のクローンの配列決定により、クローン2、4、7、11、及び24により表される、5種の異なるヒト化LM609が明らかとなった。これらのクローンのcDNAをSacI/SpeI消化により切断し、SacI/NheI切断されたpComb3Hに連結し、それによりpComb3Hの遺伝子IIIコーディングcDNAを除去し、可溶性Fabの産生を可能にした(Rader, C. (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8, 503-508を参照)。連結産物を大腸菌株XL1-Blueへと電気的に形質転換した。記載に従い(Barbas III, C. F., et al. (1991) ASSEMBLY OF COMBINATORIAL ANTIBODY LIBRARIES ON PHAGE SURFACES: THE GENE III SITE, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7978-7982)、イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシドの添加により、Fab産生を誘導した。

【0079】

ELISA

37℃で90分間、ヒト・インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 及び $\alpha_{IIb}\beta_3$ を、1ウェル当たり60ng/25 μ l金属緩衝液(25mM トリス-HCl、pH7.5; 137mM NaCl; 1mM KCl; 1mM MgCl₂; 1mM CaCl₂; 1mM MnCl₂)の濃度で、96穴プレート(Costar #3690)にコーティングした。37℃で1時間の150 μ lの3%BSA/TBSによるブロッキングの後、可溶性LM609又はヒト化LM609 Fabを発現する大腸菌株XL1-Blueの一晩培養物由来の25 μ lの粗上清を、ウェルに添加し、37℃で2時間インキュベートした。ヒト・インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 及び $\alpha_{IIb}\beta_3$ でコーティングされたウェル、そしてコーティングされていないがブロッキングはされているウェルへの各上清の結合を、三重で分析した。陽性対照として25 μ lの50ng/ μ lの精製されたFab-9なるヒト・インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 及び $\alpha_{IIb}\beta_3$ の両方に結合する抗体(Barbas III, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10003-10007)、陰性対照として25 μ lの単純な細菌培養培地を使用した。水道水で十分に洗浄した後、アルカリホスファターゼに結合したヤギ抗マウスF(ab')₂又はヤギ抗ヒトF(ab')₂の1:2,000希釈物(それぞれPierce #31324又は31312)を含む25 μ lの1%BSA/TBSをウェルに添加し、37℃で1時間インキュベートした。再び水道水で十分に洗浄した後、50 μ lのアルカリホスファターゼ基質(5mgのリン酸p-ニトロフェニルナトリウム6水和物(disodium p-nitrophenyl phosphate hexahydrate)(Sigma #104-105)が溶解した5mlの10%ジエタノールアミン、1mM MgCl₂、3mM NaN₃、pH9.8)をウェルに添加した。室温で15分間のインキュベーションの後、プレートをELISA読み取り機(Molecular Devices)で分析した。

【0080】

フローサイトメトリー

Becton Dickinson FACScan装置を使用してフローサイトメトリーを実施した。各決定のため、 5×10^3 個の、トランスフェクトされていないハムスタ

ーCS-1細胞、又はヒト β_3 もしくは β_5 のいずれかを発現するハムスターCS-1細胞を分析した。可溶性ヒト化LM609 Fabを発現する大腸菌株XL1-Blueの粗溶解物、又は陰性対照としての無関係なヒトFabを用いて、間接的な免疫蛍光染色を達成した。FITC結合ヤギ抗ヒトF(ab')₂ (Jackson #109-096-097)の1:100希釈物を検出に使用した。

【0081】

LCDR3ライブラリーの構築

pPhoA-H6HA中のヒト化LM609クローン2、4、7、11、及び24を、記載に従い(Barbas III, et al. (1994) IN VITRO EVOLUTION OF A NEUTRALIZING HUMAN ANTIBODY TO HIV-1 TO ENHANCE AFFINITY AND BROADEN STRAIN CROSS-REACTIVITY, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3809-3813)、オーバーラップ伸長PCR突然変異導入のためのテンプレートとして、別々に使用した。この操作に必要な2個の断片は、それぞれ、PCRプライマーOMPSEQ(配列番号39)/CR320(配列番号46)、及びCR520(配列番号47)/DPSEQ(配列番号48)を用いて得た。ランダム化されたLCDR3を有する得られた5個のcDNAをSfiIで切断し、適切に消化されたファージミド・ベクターpComb3Hへと連結し、大腸菌株ER2537へと電氣的に形質転換した。5個のライブラリーのそれぞれ2個のクローンをDNA配列決定により分析したところ、正確な編成、そして10個の異なるLCDR3配列が明らかとなった。選択の前に、クローン2、4、及び24に基づくライブラリー(V_L生殖系DP-26; V_H生殖系DP-65)を組み合わせ、 6×10^7 個の独立した形質転換体の混合物を得た。クローン11に基づくライブラリー(V_L生殖系DP-26; V_H生殖系DP-78)は、それぞれ 3×10^7 個及び 4×10^7 個の独立した形質転換体の混合物と共に別に維持した。

【0082】

LCDR3ライブラリーの選択

3個のLCDR3ライブラリーを、固定化インテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対する6サイクルの増幅により別々に選択した。増幅は、LM609ヒト化に関する上記の記載と実質的に同様にして実施した。コーティングのためのヒト・インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の濃度は第1サイクルから第4サイクルにおいては200 ng/25 μ l、第5及び第6サイクルにおいては50 ng/25 μ lであった。また、通常通り第1サイクルから第4サイクルにおいては 10^{1-2} 個の範囲であった、ファージの入力数を、第5サイクルでは10倍、第6サイクルでは100倍減少させた。選択の第2サイクルから第6サイクルにおいて、5回から10回の洗浄工程により未結合のファージを除去した後、20 μ gのLM609 IgGを含む50 μ lの金属緩衝液(25 mM トリス-HCl、pH 7.5; 137 mM NaCl; 1 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 1 mM MnCl₂)をウェルに添加した。次に、プレートを室温で24時間インキュベートした後(オフレート(off-rate)選択)、記載に従いさらに5回の洗浄工程及びトリプシン溶出を行った。第6サイクルの後、単一クローンからファージを産生させ、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合したヒツジ抗M13抗体(Pharmacia #27-9411-01)を二次抗体として用いたファージELISAにより、固定化ヒト・インテグリン $\alpha_v\beta_3$ への結合に関して試験した。陽性クローンの軽鎖コーディング配列及び重鎖コーディング配列を、それぞれプライマーOMPSEQ(配列番号39)及びPELSEQ(配列番号24)を用いたDNA配列決定により分析した。

【0083】

CDRランダム化によるLM609の最適化

ヒト化に加え、2つの点で、第一には、 $\alpha_v\beta_3$ への親和性を増加させることにより、第二には、種間交差反応性を広域化することにより、LM609を最適化することができる。操作されたLM609の増加した親和性は、可能性のある癌治療の効力を増加させ、コ

ストを減少させる。

【0084】

元のマウス・モノクローナル抗体LM609は、既に、広域の種間交差反応性を有している。それは、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウサギ、及びニワトリの $\alpha_V\beta_3$ に結合するが、マウス $\alpha_V\beta_3$ には結合しない。ヒト癌のマウス・モデルにおいてLM609が宿主 $\alpha_V\beta_3$ を認識しないという事実は、LM609の治療への応用可能性にとって大きな問題である。ヒト及びマウス両方の $\alpha_V\beta_3$ に結合する操作されたLM609は、臨床試験に向けた重要な道具となるであろう。モノクローナル抗体の親和性の改良のためのインビトロの方法には、チェーン・シャッフリング(chain shuffling)(Marks, J. D., et al. (1992) BY-PASSING IMMUNIZATION: BUILDING HIGH HUMAN ANTIBODIES BY CHAIN SHUFFLING, Bio/Technology 10, 779-783)が含まれる。 $\alpha_V\beta_3$ への結合は、CDRウォーキング(CDR walking)と呼ばれる手法である、二次CDRランダム化によりさらに改良されうる(Barbas III, C. F., et al. (1994) IN VITRO EVOLUTION OF A NEUTRALIZING HUMAN ANTIBODY TO HIV-1 TO ENHANCE AFFINITY AND BROADEN STRAIN CROSS-REACTIVITY, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3809-3813を参照)。LM609のヒト化及び親和性改良のためのインビトロ戦法は、同時に、マウス $\alpha_V\beta_3$ との交差反応性を生じる可能性が高い。マウス $\alpha_V\beta_3$ 認識のための特異的な選択は、マウス $\alpha_V\beta_3$ が未だ精製されていないという事実により複雑になっている。しかし、いくつかのマウス細胞系、例えばNIH/3T3は、 $\alpha_V\beta_3$ を発現することが知られており、従ってスクリーニング過程に含ませることが可能である。

【0085】

以上の考察及び添付の実施例は例示のために提示されるものであり、本発明を制限するものと見なされるべきではない。本発明の精神及び範囲内でさらにその他の改変が可能であり、当業者は容易にそれらを考えつくことであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ヒト化Fab断片を作製するためのCDR移植と誘導選択の結合手法における各段階の配列を示す図式的例示である。

【図2】 図2aと2bはそれぞれ、マウスモノクローナル抗体LM609の V_λ と V_K アミノ酸配列を示す。それぞれベクタークロニング部位、CTCGAG(XhoI)とGAGCTC(SacI)によってコードされる、VAのN末端の2個のアミノ酸(Leu)(Glu)と V_K のN末端の2個のアミノ酸(Glu)(Leu)は人為的である。CDRループに下線を付している。

【図3a】 マウスLV609 V_K (各配列群の一番上の列)及び6個の選択ヒト V_K (No. 1-6)のアミノ酸配列アラインメントを示す。フレームワーク領域(FR1-3)とCDR(CDR1-2)ループを分けている。(一)のラインは同じアミノ酸を表す。FR3のLCDR3移植部分により、CDR3全体とFR4全体がマウスLM609 V と選択ヒト V_K において同一であることに留意しなければならない。

【図3b】 マウスLV609 V_K (各配列群の一番上の列)及び6個の選択ヒト V_K (No. 1-6)のアミノ酸配列アラインメントを示す。フレームワーク領域(FR1-3)とCDR(CDR1-2)ループを分けている。(一)のラインは同じアミノ酸を表す。FR3のLCDR3移植部分により、CDR3全体とFR4全体がマウスLM609 V と選択ヒト V_K において同一であることに留意しなければならない。

【図3c】 マウスLV609 V_K (各配列群の一番上の列)及び6個の選択ヒト V_K (No. 1-6)のアミノ酸配列アラインメントを示す。フレームワーク領域(FR1-3)とCDR(CDR1-2)ループを分けている。(一)のラインは同じアミノ酸を表す。FR3のLCDR3移植部分により、CDR3全体とFR4全体がマウスLM609

Vと選択ヒトV_Kにおいて同一であることに留意しなければならない。

【図3d】 マウスLV609 V_K（各配列群の一番上の列）及び6個の選択ヒトV_K（No. 1-6）のアミノ酸配列アラインメントを示す。フレームワーク領域（FR1-3）とCDR（CDR1-2）ループを分けている。（-）のラインは同じアミノ酸を表す。FR3のLCDR3移植部分により、CDR3全体とFR4全体がマウスLM609 Vと選択ヒトV_Kにおいて同一であることに留意しなければならない。

【図3e】 マウスLV609 V_K（各配列群の一番上の列）及び6個の選択ヒトV_K（No. 1-6）のアミノ酸配列アラインメントを示す。フレームワーク領域（FR1-3）とCDR（CDR1-2）ループを分けている。（-）のラインは同じアミノ酸を表す。FR3のLCDR3移植部分により、CDR3全体とFR4全体がマウスLM609 Vと選択ヒトV_Kにおいて同一であることに留意しなければならない。

10

【図4】 3個の選択ヒト断片配列及び4個の非選択ヒト断片配列と、マウスLCDR1及びLCDR2ループのオリジナル配列との比較を示す。

【図5】 図5aから図5fまでは、それぞれヒト化LM609クローン2、4、7、11、24及び対照抗体による細胞表面のヒトインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合を示す折れ線グラフである。ラインAはトランスフェクトしていないCS-1ハムスター細胞を表す；ラインBはヒト β_3 cDNAでトランスフェクトしたCS-1ハムスター細胞を表す（図5fでは基本的にラインAと同じライン）；そしてラインCはヒト β_3 cDNAでトランスフェクトしたCS-1ハムスター細胞を表す。

【図6】 それぞれLM609抗体とクローン2、4、7、11、24及び対照抗体の交差反応性を示す棒グラフである。柱は3回の平均を表し、左の柱はヒトインテグリン $\alpha_v\beta_3$ への結合、中央の柱はヒトインテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ への結合、そして右の柱はバックグラウンド結合を表す。誤差バーは標準偏差を示す。

20

【図7】 至適化した軽鎖相補性決定領域3（LCDR3）と重鎖相補性決定領域3（HCDR3）における4個のアミノ酸の伸長の図式的例示である。

【図8a】 A群（クローン10、11及び37）と、結合したB群（クローン7、8及び22）、C群（クローン4、31及び36）、D群（クローン24、34、35及び40）及びE群（クローン2）によって表される5つのバージョンのヒト化クロンのアミノ酸配列と比較した、マウス抗体のVLアミノ酸配列の断片化した例示である。

【図8b】 A群（クローン10、11及び37）と、結合したB群（クローン7、8及び22）、C群（クローン4、31及び36）、D群（クローン24、34、35及び40）及びE群（クローン2）によって表される5つのバージョンのヒト化クロンのアミノ酸配列と比較した、マウス抗体のVLアミノ酸配列の断片化した例示である。

30

【図8c】 A群（クローン10、11及び37）、B群（クローン7、8及び22）、C群（クローン4、31及び36）、D群（クローン24、34、35及び40）及びE群（クローン2）によって表される5つのバージョンのヒト化クロンのアミノ酸配列と比較した、マウス抗体のV_Hアミノ酸配列の断片化した例示である。

【図8d】 A群（クローン10、11及び37）、B群（クローン7、8及び22）、C群（クローン4、31及び36）、D群（クローン24、34、35及び40）及びE群（クローン2）によって表される5つのバージョンのヒト化クロンのアミノ酸配列と比較した、マウス抗体のV_Hアミノ酸配列の断片化した例示である。

40

【図8e】 A群（クローン10、11及び37）、B群（クローン7、8及び22）、C群（クローン4、31及び36）、D群（クローン24、34、35及び40）及びE群（クローン2）によって表される5つのバージョンのヒト化クロンのアミノ酸配列と比較した、マウス抗体のV_Hアミノ酸配列の断片化した例示である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Scripps Research Institute
 <120> HUMANIZATION OF MURINE ANTIBODY
 <130> TSRI 598.0
 <140> Not yet known
 <141> 1998-12-04
 <150> 08/986,016
 <151> 1997-12-05
 <160> 56
 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 1

His Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 2

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His Thr
 1 5

<210> 3
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 3

gggcccaggc ggccgagctc cagatgaccc agtctcc 37 20

<210> 4
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 4

gggcccaggc ggccgagctc gtgatgacgc agtctcc 37

<210> 5
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 5

gggcccaggc ggccgagctc gtgwtgacgc agtctcc 37

<210> 6
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 6

gggcccaggc ggccgagctc acactcacgc agtctcc 37

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 7

cagtaataca ctgcaaaatc ttc 23

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 8

cagtaataaa cccaacatc ctc 23 40

<210> 9		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 9		
gggcccaggc ggccgagctc gtggtgacgc agccgccttc	40	
<210> 10		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 10		
gggcccaggc ggccgagctc gtgctgactc agccaccctc	40	
<210> 11		
<211> 43		
<212> DNA		10
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 11		
gggcccaggc ggccgagctc gccctgactc agcctccctc cgt	43	
<210> 12		
<211> 46		
<212> DNA		
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 12		
gggcccaggc ggccgagctc gagctgactc agccaccctc agtgctc	46	
<210> 13		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 13		
gggcccaggc ggccgagctc gtgctgactc aatcgccctc	40	20
<210> 14		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 14		
gggcccaggc ggccgagctc atgctgactc agcccccactc	40	
<210> 15		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 15		
gggcccaggc ggccgagctc gggcagactc agcagctctc	40	
<210> 16		
<211> 40		
<212> DNA		30
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 16		
gggcccaggc ggccgagctc gtggtgacgc aggagccmtc	40	
<210> 17		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 17		
gggcccaggc ggccgagctc gtgctgactc agccaccttc	40	
<210> 18		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Murine hybridoma LM609		
<400> 18		
gcagtaataa tcagcctert c	21	40

<210> 19
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 19
 gctgcccac cagccatggc ccaggtgcag ctggtgcagt ctgg 44

<210> 20
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 20
 gctgcccac cagccatggc ccagatcacc ttgaaggagt ctgg 44

<210> 21
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 21
 gctgcccac cagccatggc cgaggtgcag ctggtgsagt ctgg 44 10

<210> 22
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 22
 gctgcccac cagccatggc ccaggtgcag ctgcaggagt cggg 44

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 23
 cgcacagtaa tacacggccg tgtc 24 20

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 24
 acctattgcc tacggcagcc g 21

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 25
 cgcacagtaa tacacggccg tgtc 24

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 26
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 30
 1 5

<210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 27
 Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 1 5

<210> 28
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609 40

```

<400> 28
gacacggcgg tgtattactg tgcgcgtcat aactacggca gttttgctta ctggggccag 60
ggaaccctg                                     69

<210> 29
<211> 42
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 29
gaggaggagg aggagactag ttttgtcaca agatttgggc tc                                     42

<210> 30
<211> 73
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 30
gaagattttg cagtgtatta ctgccaaca gagtaacagc tggcctcaca cgtttggcca 60
ggggaccaag ctg                                     73
10

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 31
aatacgactc actatagggc g                                     21

<210> 32
<211> 72
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 32
gaggatgttg gggtttatta ctgccaacag agtaacagct ggcctcacac gtttggccag 60
gggaccaagc tg                                     72
20

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 33
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
1          5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 34
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
1          5

<210> 35
<211> 69
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 35
gaygaggctg attattactg ccaacagagt aacagctggc ctcacacgtt cggcggaggg 60
accaagctg                                     69
30

<210> 36
<211> 50
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 36
agagagagag agagagagag cgccgtctag aattatgaac attctgtagg                                     50

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609
40

```

<400> 37
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 1 5

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 38
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 1 5

<210> 39
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 39
 aagacagcta tcgcgattgc ag

22

10

<210> 40
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 40
 gaggaggagg aggaggaggc gggggccagg cggccgagct c

41

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 41
 ggccatggct gggtgggcag c

21

<210> 42
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 42
 gcagagccca aatcttgtga cactagtggc caggccggcc ag

42

20

<210> 43
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 43
 gaggaggagg aggaggagcc tggccggcct ggccactagt g

41

<210> 44
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 44

Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser
 20 25 30
 Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Lys Val
 35 40 45
 Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Gln Gly Arg
 50 55 60
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Asn Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His
 85 90 95
 Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly
 115 120 125

30

Ser Ala
130

<210> 45
<211> 109
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 45
Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn His
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105

10

<210> 46
<211> 57
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 46
gggtcccttg ccaaactgtg gaggmnnmnn mnnnnnctgt tggcagtaat acactgc 57

<210> 47
<211> 23
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 47
cctcaccgtt tggccagggg acc 23

20

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 48
agaagcgtag tccggaact c 21

<210> 49
<211> 109
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 49
Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Glu Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Thr Ser
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Lys Tyr Ala Ser Gln Pro Val Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

30

<210> 50
<211> 118
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609

```

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

```

10

```

<210> 51
<211> 118
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 51

```

```

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

```

20

```

<210> 52
<211> 118
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 52

```

```

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

```

30

```

<210> 53
<211> 118
<212> PRT
<213> Murine hybridoma LM609
<400> 53

```

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1      5      10      15

```

40

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

<210> 54
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 54

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

<210> 55
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 55

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

<210> 56
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Murine hybridoma LM609
 <400> 56

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

10

20

30

40

【図 1】

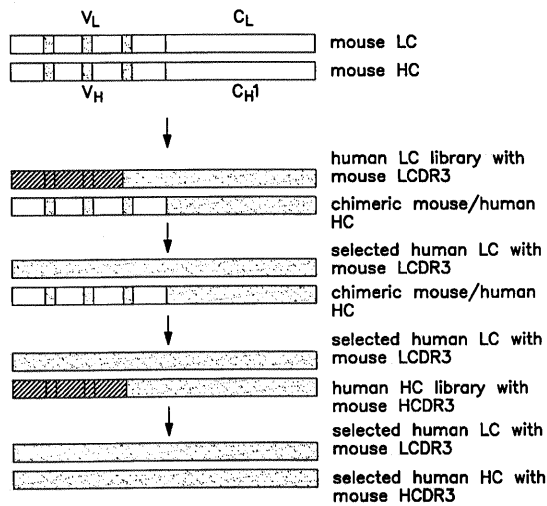


FIG. 1

【図 2】

V_L

Leu Glu Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
5 10 15 20
Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp
25 30 35 40
Val Ala Lys Val Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Gln Gly Arg Phe Thr
45 50 55 60
Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Met Ser Ser Leu Asn Ser Glu Asp Thr
65 70 75 80
Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
85 90 95 100
Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
105 110 115 120 125 130

FIGURE 2a

V_H

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

FIGURE 2b

【図 3 a】

FR 1

V_L

.. Thr Gln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
#1 - - - - - Leu Ser - - - - - Glu Arg Ala Thr - - - - -
#2 - - - - - Leu Ser - - - - - Glu Arg Gly Ser - - - - -
#3 - - - - - Leu Ser - - - - - Glu Arg Ala Thr - - - - -
#4 - - - - - Ala Ser Val - - - - - Arg - Thr Ile Thr - - - - -
#5 - - - - - Ala Ser Val - - - - - * - Thr Ile Thr - - - - -
#6 - - - - - Ala Ser Val - - - - - Arg - Thr Ile Thr - - - - -

FIGURE 3a

【図 3 b】

CDR1

V_L Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn His Leu His
#1 - - - - - Val - Ser Ser Tyr Leu Ala
#2 - - - - - Val - Ser Ser Phe Leu Ala
#3 - - - - - Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala
#4 - - - - - - - Thr Phe - Asn
#5 - - - - - Ser Tyr - Asn
#6 - - - - - Ser Tyr - Asn

FIGURE 3b

【図 3 c】

FR2

V_L Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
#1 - - - - - Pro Gly Gln Ala - - - - - Tyr
#2 - - - - - Pro Gly Gln Ala - - - - - Tyr
#3 - - - - - Pro Gly Gln Ala - - - - - Tyr
#4 - - - - - Pro Gly Lys Ala - Lys Phe - - - - - Tyr
#5 - - - - - Arg - Pro Gly Lys Ala - Lys Leu - - - - - Tyr
#6 - - - - - Pro Gly Lys Ala - Lys Leu - - - - - Tyr

FIGURE 3c

【図 3 d】

CDR2

V_L Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
#1 Gly - - Ser-Arg-Ala-Thr
#2 Gly - - Ser-Arg-Ala-Thr
#3 Gly - - Ser-Arg-Ala-Thr
#4 Ala - - Thr Leu Gln -
#5 Ala - - Thr Leu Gln -
#6 Ala - - Thr Leu Gln -

FIGURE 3d

【図 3 e】

FIG. 3e

PR3	Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser	
V _H	Val Glu Thr Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys	
#1	Leu - - Asp - - Ala Val - - Tyr - - Ile - - Thr - - Ser Arg	
#2	Leu - - Pro - - Asp - - Ala Val - - Tyr - - Val - - Thr - - Ser Arg	
#3	Leu - - Pro - - Asp - - Ala Val - - Tyr - - Ile Phe Thr - - Ser Arg	
#4	Leu - - Val - - - - - Ala Val - - Tyr - - - - - Thr - - Ser -	
#5	Leu - - Val - - - - - Ala Val - - Tyr - - - - - Thr - - Ser -	
#6	Leu - - Val - - - - - Ala Val - - Tyr - - - - - Thr - - Ser -	

FIGURE 3e

【図 4】

mouse	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn	His Leu His	LCDR2	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
selected human	3 x Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr	Ser Leu His	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
2 x Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn	Ser Leu His	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 x Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Trp	Ser Leu His	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser	(Lys) Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
unselected human	Arg Ser Ser Gln Ser Ile Asn Ile	Tyr Leu Ala	(Tyr) His Ala Ser Lys Arg Ala Ser	(Tyr) His Ala Ser Lys Arg Ala Ser
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn	Tyr Leu Ala	(Tyr) Arg Ala Ser Ser Arg Ala Thr	(Tyr) Arg Ala Ser Ser Arg Ala Thr	(Tyr) Arg Ala Ser Ser Arg Ala Thr
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr	Tyr Leu Asn	(Tyr) Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser	(Tyr) Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser	(Tyr) Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser
Thr Ala Ser Gln Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr	Tyr Leu Ser	(Tyr) Met Val Ser Asn Arg Asp Ser	(Tyr) Met Val Ser Asn Arg Asp Ser	(Tyr) Met Val Ser Asn Arg Asp Ser

FIGURE 4

【図 5】

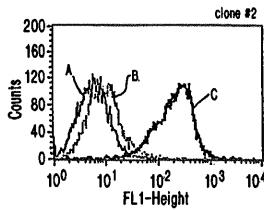


FIG. 5a

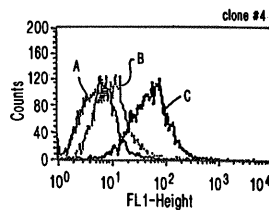


FIG. 5b

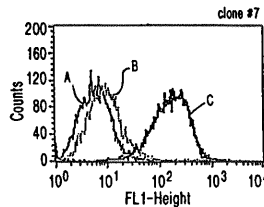


FIG. 5c

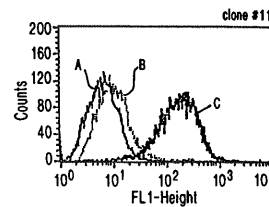


FIG. 5d

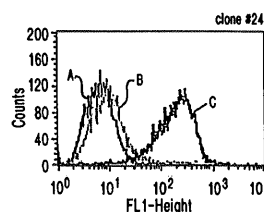


FIG. 5e

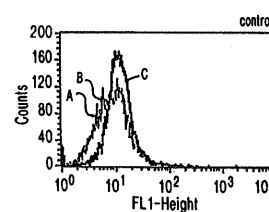


FIG. 5f

【図 6】

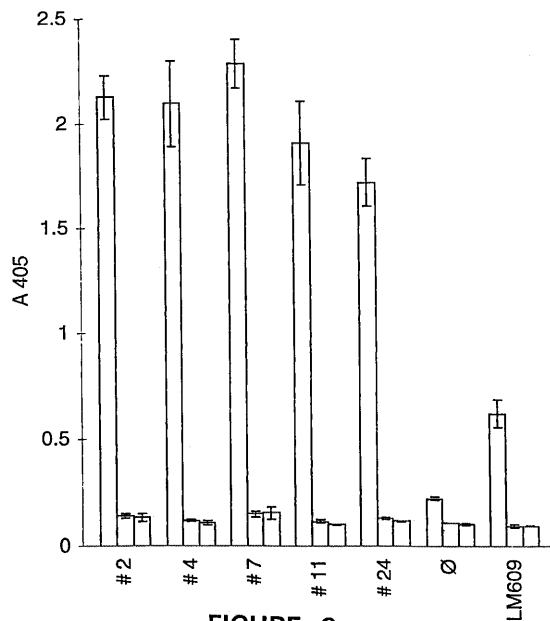


FIGURE 6

【図 7】

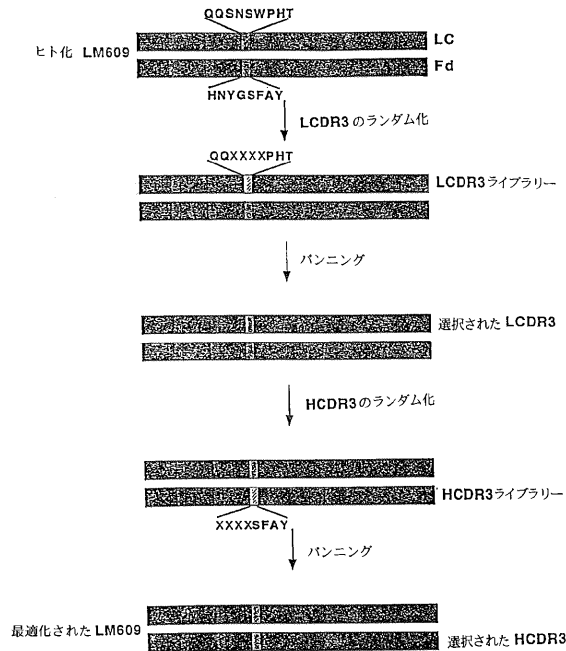


FIGURE 7

【図 8 b】

FIGURE 8b

V_L amino acid sequences

FR3
MOUSE
Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val
Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys
human (Group A)
Gln Ala Glu Asp Phe Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr Ser Leu
human (Group B)
Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

FR4
MOUSE
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
human (Group A)
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
human (Group B)
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

【図 8 a】

FIGURE 8a

V_L amino acid sequences

FR1
MOUSE
Glu Leu Val Met Thr Cln Thr Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Gly Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys
human (Group A)
Gln Ser Pro Cln Phe Cln Ser Val Thr Pro Lys Cln Thr Val Thr Ile Thr Cys
human (Group B)
Glu Leu Val Met Thr Cln Thr Pro Cln Phe Cln Ser Val Thr Pro Lys Cln Thr Val Thr Ile Thr Cys

CDR1
MOUSE
Arg Ala Ser Cln Ser Ile Ser Asn His Leu His
human (Group A)
Arg Ala Ser Cln Asp Ile Gly Thr Ser Leu His
human (Group B)
Arg Ala Ser Cln Asp Ile Gly Asn Ser Leu His

CDR2
MOUSE
Trp Tyr Cln Cln Lys Ser His Cln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
human (Group A)
Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
human (Group B)
Trp Tyr Cln Cln Lys Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys

CDR3
MOUSE
Tyr Ala Ser Cln Ser Ile Ser
human (Group A)
Tyr Ala Ser Cln Pro Val Phe
human (Group B)
Tyr Ala Ser Cln Pro Val Phe

【図 8 c】

FIGURE 8c

V_H amino acid sequences

FR1
MOUSE
Glu Val Cln Leu Glu Cln Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys
Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser
human (Group A)
Val Cln Ser Gly Ala Cln Val Arg Lys Pro Gly Ser Val Arg Val Ser Cys
Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
human (Group B)
Gln Val Cln Leu Cln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Cln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
human (Group C)
Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser
human (Group D)
Gln Val Cln Ser Gly Ser Ile Ser
human (Group E)
Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
human (Group F)
Gln Val Cln Leu Cln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Cln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
human (Group G)
Gln Val Cln Leu Cln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Cln Thr Leu Ser Leu Thr Cys
Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

FR2
MOUSE
Trp Val Arg Cln Ile Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala
human (Group A)
Trp Val Arg Cln Ala Pro Gly Cln Arg Phe Glu Trp Leu Gly
human (Group B)
Trp Ile Arg Cln Tyr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
human (Group C)
Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
human (Group D)
Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
human (Group E)
Trp Ile Arg His His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

CDR1
MOUSE
Ser Tyr Asp Met Ser
human (Group A)
Gly Phe Val Ser
human (Group B)
Arg Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
human (Group C)
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
human (Group D)
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
human (Group E)
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser

【 8 d 】

FIGURE 8d

V_H amino acid sequences

CDR2
 human Val Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Gln Gly
 human (Group A)
 Gly Ile Val Val Ala Ser Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Asp
 human (Group B)
 Tyr Ile His
 human (Group C)
 His Arg Ala Ala Pro Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 human (Group D)
 Tyr Ile His
 human (Group E)
 His Ser Ala Gly Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 Tyr Ile His
 human (Group F)
 His Ser Ala Gly Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

FR3
 mouse
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Asn Ser
 Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
 human (Group A)
 Lys Leu Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ala Thr Val Tyr Met Glu Met Arg Asn Leu Arg Ser
 human (Group B)
 Arg Val Thr Ile Ile Ala Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 human (Group C)
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln Ile Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 human (Group D)
 Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 human (Group E)
 Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu Lys Leu Ala Ser Val Thr Ala
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

【 8 e 】

FIGURE 8e

V_H amino acid sequences

CDR3
 human
 human Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
 human (Group A)
 His Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
 human (Group B)
 His Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
 human (Group C)
 His Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
 human (Group D)
 His Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr
 human (Group E)
 His Asn Tyr Gly Ser Phe Ala Tyr

FR4
 mouse
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Val Ser Ala
 human (Group A)
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Val Ser Ser
 human (Group B)
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Val Ser Ser
 human (Group C)
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Val Ser Ser
 human (Group D)
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Val Ser Ser
 human (Group E)
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Val Ser Ser

フロントページの続き

- (72)発明者 バルバス, カルロス・エフ, テルセロ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・92122、サン・ディエゴ、ウエラー・ストリート・708
1
(72)発明者 ラダー, クリストフ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・92111、サン・ディエゴ、マーレスタ・ドライブ・362
3

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 特表平06-510671 (JP, A)
Curr. Opi. Struc. Biol., vol. 3, pages 113-118 (1993)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, pages 6471-6475 (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95, pages 8910-8915 (1998)
BIO/TECHNOLOGY, vol. 12, pages 899-903 (1994)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12P 21/08
C07K 16/28
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)