

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-505810

(P2011-505810A)

(43) 公表日 平成23年3月3日(2011.3.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 3
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/0789 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 Q	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-537235 (P2010-537235)	(71) 出願人	510164027
(86) (22) 出願日	平成20年12月3日 (2008.12.3)		シャンハイ グオジアン バイオーテック
(85) 翻訳文提出日	平成22年8月10日 (2010.8.10)		インスティテュート
(86) 国際出願番号	PCT/CN2008/001963		中華人民共和国 シャンハイ 20120
(87) 国際公開番号	W02009/079922		3, ザンジャン ハイテック パーク,
(87) 国際公開日	平成21年7月2日 (2009.7.2)		リビング ロード ナンバー 399
(31) 優先権主張番号	200710094456.9	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成19年12月13日 (2007.12.13)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国	中国 (CN)	(74) 代理人	100095360
(31) 優先権主張番号	200810043016.5		弁理士 片山 英二
(32) 優先日	平成20年1月8日 (2008.1.8)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗ヒトCD34抗体、その調製方法および使用

(57) 【要約】

本発明は、ヒト化抗ヒトCD34抗体およびその調製方法を提供する。ヒト化抗ヒトCD34抗体は、原型であるマウス由来抗体の親和性および特異性を保持している。抗体は、ナノ磁気物質とコンジュゲートして、骨髄造血幹細胞を選別するための免疫磁気ビーズを調製することができる。この抗体を用いると、HAM Aの出現率が効果的に減少し、造血幹細胞の臨床的移植の安全性が改善される可能性があり、この抗体は一部の悪性血液病および固体腫瘍の治療に使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの抗原結合部位を含むヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体であって、前記抗原結合部位が、

配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有する第 1 の可変領域を含む第 1 ドメインと、

配列番号 8 に示すアミノ酸配列を有する第 2 の可変領域を含む第 2 ドメインと

を少なくとも含む、ヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体。

【請求項 2】

前記抗原結合部位が、

1) 前記第 1 の可変領域およびヒト免疫グロブリン重鎖定常領域またはその断片を含む免疫グロブリン重鎖またはその断片と、

2) 前記第 2 の可変領域およびヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域またはその断片を含む免疫グロブリン軽鎖またはその断片と

を含む、請求項 1 に記載のヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体。

10

【請求項 3】

前記ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域またはその断片が 型であり、前記ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域またはその断片が 型または 型である、請求項 2 に記載のヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体。

【請求項 4】

配列番号 5 に示す、第 1 の可変領域をコードするヌクレオチド配列と、配列番号 7 に示す、第 2 の可変領域をコードするヌクレオチド配列とを少なくとも含む、請求項 1 に記載のヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体をコードするヌクレオチド分子。

20

【請求項 5】

下記の配列、

a) 前記第 1 の可変領域をコードするヌクレオチド配列およびヒト免疫グロブリン重鎖定常領域またはその断片をコードするヌクレオチド配列を含む、免疫グロブリン重鎖またはその断片をコードするヌクレオチド配列と、

b) 前記第 2 の可変領域をコードするヌクレオチド配列およびヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域またはその断片をコードするヌクレオチド配列を含む、免疫グロブリン軽鎖またはその断片をコードするヌクレオチド配列と

を含む、請求項 4 に記載のヌクレオチド分子。

30

【請求項 6】

前記重鎖定常領域のヌクレオチド配列が配列番号 1 に示され、前記軽鎖定常領域のヌクレオチド配列が配列番号 3 に示される、請求項 5 に記載のヌクレオチド分子。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体を含有する免疫コンジュゲート。

【請求項 8】

免疫磁気ビーズである、請求項 7 に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 9】

骨髄造血幹細胞 / 骨髄造血前駆細胞の選別における、請求項 1 に記載のヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体の使用。

40

【請求項 10】

請求項 1 に記載のヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体の調製方法であって、

1) 請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載のヌクレオチド分子を使用して発現ベクターを形質転換し、得られた発現ベクターを使用して宿主細胞を形質転換するステップと、

2) 前記宿主細胞を培養するステップと、

3) 前記宿主細胞によって発現されたヒト化抗ヒト CD 3 4 抗体を採取、分離および精製するステップと

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明はバイオテクノロジー、特に、抗体、その調製方法および使用に関する。

【背景技術】

【0002】

造血幹細胞/造血前駆細胞(HSC)の移植は、現在、特定の悪性血液病および固形腫瘍に対する唯一の効果的治療方法であるとよく理解されている。しかし、グラフトに多数のTリンパ球が含有されるので、グラフティングした後に急性の重篤な移植片対宿主病(GVHD)が起こり、これは、グラフティングされる異種遺伝子の造血幹細胞が長く生存できるか否かに影響する主要な原因の1つである。造血幹細胞/造血前駆細胞の移植に関する主な問題は、グラフト中の不純物細胞による干渉を除くための多量の精製造血幹細胞をいかに得るかである。それゆえ、グラフト中の特定の細胞を一掃または濃縮することは、現在のグラフティング分野に関係する問題である。HSCには明確な形態学的特徴がないが、主にリンパ球様の単核芽細胞として機能するので、HSCは細胞表面上のいくつかのタンパク質によってのみ同定することができる。110kDaの膜貫通型糖タンパク質であるCD34は、今までのところヒトHSCで発現されることが認識されている抗原の最も広く古いものであり、HSCの質および量を評価するための良いマーカーである。CD34抗体に基づく正の選択技術の開発により、CD34+造血幹細胞は、実験動物および人間において造血機能の再構成を示し[Andrews RG, Bryant EM, Bartelmez SH, Muirhead DT, Knitter GH, Bensing W, Strong DM, Bernstien ID (1992) CD34+ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated baboons. Blood 80:1693][Shpall EJ, Jones RB, Franklin W, Bearman S, Stemmer S, Hamil L, Petsche D, Taffs S, Myers S, Purdy M, Heimfeld S, Halligan J, Berenson RJ (1994) Transplantation of autologous CD34+ hematopoietic progenitor cells into breast cancer patient following high-dose chemotherapy. J Clin Oncol 12:28]、それゆえ、CD34+はその独特の生物学的特性および機能のために、造血幹細胞グラフティングの最適な標的細胞になっている。

【0003】

現在、細胞を分離および精製するために最も用いられている方法としては、接着法、分画遠心法、不連続密度勾配法などが挙げられる。これらの技術は多くの実際的な問題を解決しているにもかかわらず、分離および精製に関して、操作時間が長いこと、細胞の回収率が低いこと、およびコストが高いことから、細胞生物学の進展ならびに細胞バイオテクノロジー製品の開発および適用を妨げている。免疫磁気による細胞選択技術は、近年開発された新規細胞分離技術であり、操作が単純かつ容易であること、分離純度が高いこと、および細胞活性が維持されることなどの利点を有し、種々の骨髄細胞および血球、腫瘍細胞、細菌および他の微生物などの分離および検査に使用することができる。したがって、免疫磁気による細胞選択技術は、生物医学分野の研究者に支持されている。近年、免疫磁気ビーズは、徐々にサブミクロンサイズに開発されており、それによって、磁気ビーズによる細胞分離を低い磁場勾配で容易かつ迅速に行うことができ、続いて分析および適用を、細胞表面から磁気ビーズを解離させずに直接行うことができ、またビーズは分離後に細胞活性に影響を与えない。分離の原理は、磁気ナノ粒子を、その表面に抗体をコンジュゲートするためのベクターとして用い、抗体の特異的な親和性によって、磁気ナノ粒子上の抗体が細胞上の特異的な表面抗原に結合して細胞-抗体-磁気ナノ粒子複合体が形成され、印加磁場の指向制御下で、標的細胞を元の細胞混合物から直接、親和性吸着、洗浄およ

10

20

30

40

50

び脱離などの操作による1ステップで単離することができるというものである。ナノ磁気細胞親和性分離は、容易かつ便利な磁気分離および高選択性親和性分離の二重の利点を有する。

【0004】

免疫磁気ビーズが世に出ると、骨髓造血幹細胞を選別するために、CD34モノクローナル抗体を磁気ナノ微粒子にコンジュゲートすることによって調製した免疫磁気ビーズの使用が、臨床的な造血幹細胞移植に適用されてきた。磁気分離が、細胞を選別する際に、操作が容易かつ便利である、分離が迅速かつ完璧である、細胞純度が高いなどの利点を有するという事実のおかげで、特定の悪性血液病、重篤な免疫不全ならびに腫瘍の放射線療法および化学療法に起因する造血機能の低下に対して、HSC移植が第1の選択になっている。造血幹細胞移植の過程に、磁気ビーズに結合したこれらの抗体は、造血幹細胞と一緒にヒトの体内に必然的に侵入する。ハイブリドーマ技術によって産生されるマウス由来モノクローナル抗体は、ヒトの体内に侵入後、ヒト抗マウス抗体反応(HAMA)を引き起こす可能性がある [Winter G, Harris WJ. Humanized antibodies. Immunol Today. 1993 Jun; 14(6): 243-6]。それゆえ、当業者にとって、遺伝子工学技術により、マウスの成分を減少させ、HAMAの発生率を効果的に減少させることができる免疫原性の低い抗体を構築することが差し迫った問題である。

10

【0005】

ヒト化抗体は、マウス由来モノクローナル抗体の欠陥を克服するために開発された遺伝子工学による新規の抗体である。ヒト化抗体の最初の世代は、マウスモノクローナル抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域から構成されるキメラ抗体である。抗体と抗原の間の親和性は抗体の可変領域で決定されるので、キメラ抗体は良好な親和性を保ち、それと同時に、免疫原性がある程度まで減少する。抗体の可変領域は、超可変領域(CDR)とフレーム領域(FR)から構成され、CDRは、抗体の抗原への結合を直接媒介する高度可変領域であり、FR領域は、比較的保存的であり、免疫原性を産生する可変領域内の主要領域であるCDR領域の空間的な位置を維持するための支持体として使用される。キメラ抗体はマウス由来抗体の可変領域を保持しているので、臨床的な適用において、なお強力なHAMA反応を引き起こす可能性がある。したがって、キメラ抗体の免疫原性を最大限減少させるために、マウスCDR領域をヒト由来抗体のFR領域に直接グラフトイングし、CDRグラフト抗体、すなわちヒト化抗体を得ることが考えられる。しかし、特定のフレームワーク残基がCDRコンホメーションの保存に重要である、または抗原結合に直接関連するため、マウスCDRを単独で移動させると、通常、抗原結合が著しく低下する。ほとんどの場合、ヒト化抗体を首尾よく設計するには、これらのキーマウス残基をヒトフレームワークに再導入して親和性を回復させることが必要である。それゆえ、抗体をヒト化するためには、FRの抗体活性に影響する重要な残基をいかに決定するかが重要である。

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、マウスCDR領域をヒト化抗体のフレームワーク領域内にグラフトイングすることによって得られた良好な親和性を保ち、同時にヒト化抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列を再形成している抗体である、ヒト化抗ヒトCD34抗体を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

したがって、本発明は、少なくとも1つの抗原結合部位を含むヒト化抗ヒトCD34抗体であって、前記抗原結合部位が、配列番号6に示すアミノ酸配列を有する第1の可変領域を含む第1ドメインと、配列番号8に示すアミノ酸配列を有する第2の可変領域を含む第2ドメインとを少なくとも含む、ヒト化抗ヒトCD34抗体を提供する。

50

【0008】

上記の第1の変換領域および第2の変換領域は、それぞれ、免疫グロブリンの重鎖可変領域および軽鎖可変領域に対応し、第1の変換領域の超可変領域(CDR)は順次CDR1、CDR2およびCDR3を含み、そのアミノ酸配列は、それぞれ、CDR1:GYTF TNYGMN、CDR2:WINTNTGEPKYAEEFKGおよびCDR3:GYGN YARGAWLAYである。上記のCDR領域に加え、第1の変換領域はヒト免疫グロブリン重鎖可変領域由来のフレームワーク領域(FR)をさらに含む。抗体の親和性を改善するために、本発明においてフレームワーク領域のアミノ酸を部分的に再形成させ、それによって、アミノ酸配列が配列番号6であり、配列番号5がそれをコードする対応ヌクレオチド配列である、第1の変換領域が得られる。同様に、第2の変換領域の超可変領域(CDR)は順次CDR1'、CDR2'およびCDR3'を含み、そのアミノ酸配列は、それぞれ、CDR1':RSSQTIVHSNGNTYLE、CDR2':QVSNRFSおよびCDR3':FQGS HV PRTである。上記のCDR領域に加え、第2の変換領域はヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域由来のフレームワーク領域(FR)をさらに含む。抗体の親和性を改善するために、本発明においてフレームワーク領域のアミノ酸を部分的に再形成させ、それによって、アミノ酸配列が配列番号8であり、配列番号7がそれをコードする対応ヌクレオチド配列である、第2の変換領域が得られる。

10

【0009】

さらに、本発明のヒト化抗ヒトCD34抗体において、前記抗原結合部位は、

- 1) 前記第1の変換領域およびヒト免疫グロブリン重鎖定常領域またはその断片を含む免疫グロブリン重鎖またはその断片と
 - 2) 前記第2の変換領域およびヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域またはその断片を含む免疫グロブリン軽鎖またはその断片と
- を含む。

20

【0010】

ヒト免疫グロブリン定常領域は、各種免疫グロブリンから選択することができ、ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域またはその断片が、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する型(IgG1)であり、ヒト軽鎖定常領域またはその断片が、型または型であることが好ましく、軽鎖定常領域の好ましいアミノ酸配列は配列番号4に示す。

【0011】

本発明の他の目的は、上記のヒト化ヒトCD34抗体をコードするヌクレオチド分子を提供することであり、そのヌクレオチド分子によって形質転換される宿主も本発明に含まれる。

30

【0012】

本発明は、さらに、上記のヒト化抗CD34抗体の調製方法であって、コンピュータを使った分子モデリングに基づいてヒト化抗体h4C8のアミノ酸配列を設計すること、重鎖可変領域遺伝子および軽鎖可変領域遺伝子の全遺伝子合成を行い、その遺伝子をヒト抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域で繋げること、それぞれ遺伝子組換えであるが、真核細胞発現ベクターにクローニングしてヒト化抗体の重鎖および軽鎖に対する発現ベクターを構築すること、次いで軽鎖発現ベクターおよび重鎖発現ベクターをリポソーム法によりCHO細胞中に共トランスフェクトすること、ならびに次いでスクリーニング、培養および精製して産物を得ることを含む方法も提供する。

40

【0013】

本発明において、得られた抗体を用いて連続した実験を行い、in vitroでの抗原結合活性アッセイの結果から、h4C8が、抗原CD34を高度に発現しているヒト骨髓性白血病細胞KG-1aに特異的に結合できることが示されている。競合阻害試験の結果から、h4C8が、原型であるマウス由来抗体の親和性および特異性を保持していることが示されている。この抗体は、骨髓造血幹細胞を選別するためにナノ磁気物質にコンジュゲートして免疫磁気ビーズを調製することができる。この抗体を用いると、HAMAsの出現率が効果的に減少し、造血幹細胞の臨床的移植の安全性が改善される可能性があり、

50

この抗体は一部の悪性血液病および固体腫瘍の治療に使用することができる。

【0014】

カルボジイミド/N-ヒドロキシスクシンイミド(EDC/NHS)法を用いて、磁気ビーズ表面のカルボキシル基を活性化させ、次いで活性化したカルボキシル基を抗体のアミノ基と反応させ、CD34抗体をコンジュゲートし、細胞を効果的に単離することができるCD34+免疫磁気ビーズを調製する。選別モデルを、CD34+KG-1a細胞およびCD34-Raji細胞を用いて調製し、CD34モノクローナル免疫磁気ビーズを用いてCD34+細胞を選別する。同じく、CD34+免疫磁気ナノ粒子を用いて臍帯血幹細胞を選別し、選別によって得られた細胞の純度および収率を分析する。

【0015】

磁気ナノ粒子に結合する抗CD34モノクローナル抗体を抗体ベクターとして用いてCD34+造血幹細胞/造血前駆細胞に結合させ、そのようにして免疫複合体を形成する。印加磁場の影響下で、この複合体を動的に移動させ、磁気ナノ粒子上の抗体に特異的に結合する造血幹細胞/造血前駆細胞を他の細胞(CD34抗原を発現しない腫瘍細胞)から単離する。精製した造血幹細胞を元の患者に移入して造血系および免疫系を再構築させ、腫瘍の再発を効果的に減少させる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】4C8モノクローナル抗体を分子シミュレーションした構造の概略図である。FR領域残基を薄い灰色のリボンで表し、CDR領域残基を濃い灰色のリボンで表し、CDR領域の周囲5オングストローム()以内の9個のFR領域残基を薄い灰色の球棒で表している。

【図2】ヒト化抗体h4C8の重鎖(図2-1)および軽鎖(図2-2)のアミノ酸配列と関連配列の並列図である。4C8VHおよび4C8VLはそれぞれ、マウス由来モノクローナル抗体4C8の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を表し、ヒト抗体AAC18206の重鎖可変領域およびヒト抗体BAC01734の軽鎖可変領域は、それぞれ、ヒト化抗体hu4C8の重鎖フレームワーク領域および軽鎖フレームワーク領域として選択され、hu4C8VHaおよびhu4C8VHbは、それぞれ異なるヒト化抗体の重鎖可変領域を表し、h4C8VLaおよびh4C8VLbは、それぞれ異なるヒト化抗体の軽鎖可変領域を表し、ダッシュは、ヒト抗体AAC18206またはBAC01734の対応残基と同一であるアミノ酸を表し、CDR領域は角括弧で表し、カバットの番号付け(Kabat numbering manner)に従ってアミノ酸に番号を付けている[E. A. Kabat, T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, C. Foeller, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth ed., United States Department of Health and Human Services, Bethesda, MD, 1991.]。

【図3】ヒト化4C8抗体の抗原結合活性アッセイの結果を示すグラフである。

【図4】競合阻害試験の結果を示すグラフである。

【図5】CD34免疫磁気ビーズを用いたCD34+細胞系の選別試験の結果を示すグラフである。前側は、選別前の混在した状態の細胞であり、左側のピークはCD34-Raji細胞であり、右側のピークはCD34+KG-1a細胞である。後ろ側は、選別後の正の細胞集団であり、CD34-Raji細胞が取り除かれてCD34+細胞が効果的に濃縮されている。

【図6】CD34免疫磁気ビーズを用いた、ヒト臍帯血幹細胞選別試験の結果を示すグラフである。前側は、選別前の臍帯血幹細胞であり、左側のピークはCD34-細胞集団であり、右側のピークはCD34+細胞集団である。後ろ側は、選別後の正の細胞集団であり、CD34-細胞が取り除かれてCD34+幹細胞が効果的に濃縮されている。

【図7】ヒト化抗CD34抗体とマウス由来抗体My10の競合阻害試験の結果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 8】ヒト化抗 CD 3 4 抗体およびマウス由来抗体 My 1 0 をビーズにコンジュゲートした後の臍帯血幹細胞選別の競合試験結果を示すグラフである（左側のピークは選別前の試験結果であり、右側のピークは選別後の試験結果である）。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下の実施例は、単に本発明をさらに説明するものであり、本発明を限定するものであると理解されるべきではない。

【0018】

K G - 1 a (ヒト白血病細胞、A T C C、C C L - 2 4 6 . 1)

【0019】

R a j i (ヒトBリンパ腫細胞、A T C C、C C L - 8 6)

【0020】

本発明において、4 C 8 は、本出願人により 2 0 0 7 年 1 2 月 1 3 日に出願された出願に基づく、2 0 0 8 年 8 月 2 0 日に公開されたタイトルが抗ヒト CD 3 4 抗体、その調製方法および使用である中国特許出願第 2 0 0 7 1 0 0 9 4 4 5 6 . 9 号の発明に開示されている方法によって得られたものを意味し、その方法は下記に詳細を述べる。

【0021】

ヒト抗体の軽鎖定常領域および重鎖定常領域をコードする遺伝子のクローニング

健康なヒトリンパ腫細胞をリンパ腫細胞分離溶液 (D i n g g u o B i o t e c h n o l o g y D e v e l o p m e n t C o m p a n y, C H I N A) から単離し、全 R N A を、T r i z o l 試薬 (I n v i t r o g e n) を用いて抽出し、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域をコードする遺伝子を、それぞれ参照文献 (C e l l, 1 9 8 0, 2 2 : 1 9 7 - 2 0 7) および参照文献 (N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h, 1 9 8 2, 1 0 : 4 0 7 1 - 4 0 7 9) で報告されている配列に従って設計したプライマーを用いて、R T - P C R 反応によって増幅した。P C R 産物を、アガロースゲル電気泳動により精製し、回収して p G E M - T ベクターにクローニングし、配列決定による検証によって正しいクローンを得た。配列番号 1 および 2 は、それぞれ、重鎖定常領域 (C H) のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。配列番号 3 および 4 は、それぞれ、軽鎖定常領域 (C L) のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。本例において、正しいクローンを p G E M - T / C H および p G E M - T / C L とマークした。

【実施例 1】

【0022】

抗ヒト CD 3 4 モノクローナル抗体 4 C 8 の調製 - - - 細胞融合ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の調製

B A L B / c マウス (S H A N G H A I L A B O R A T O R Y A N I M A L C E N T E R から入手) を、C D 3 4 を高度に発現している K G - 1 a 細胞 (K G - 1 a 細胞 A T C C C C L - 2 4 6 . 1) で免疫し、脾臓内の B リンパ球に抗ヒト CD 3 4 抗体を産生させ、免疫したマウス由来の脾細胞を N S - 1 (B A L B / c マウス骨髄腫細胞) と融合し、H A T により選択的に培養し、培養後、抗ヒト CD 3 4 の陽性クローンを選択し、クローニングした後、サブクローンを選択して単一のクローン細胞により抗体が産生されることを確実にし、次いで各クローン細胞の培養物の上澄みを採取し、次いで、P r o t e i n G カラムによる精製によって抗ヒト CD 3 4 モノクローナル抗体 4 C 8 を得た。

【実施例 2】

【0023】

キメラ抗体 c 4 C 8 の構築

抗ヒト CD 3 4 モノクローナル抗体 4 C 8 の可変領域をコードする遺伝子のクローニング

全 R N A を、抗ヒト CD 3 4 を分泌するハイブリドーマ細胞 4 C 8 2×10^6 個から、「T r i z o l R e a g e n t」試薬キット (G i b c o B R L, U S A) をその取扱説明書に従って用いて抽出した。3 種の遺伝子特異的プライマー、G S P 1、G S P

10

20

30

40

50

2、GSP3を、それぞれ、抗体(IgG1、)の重鎖定常領域および軽鎖定常領域の相応な位置を選択することにより設計した。ここで、GSP1は、可変領域遺伝子から最も遠く離れており、逆転写反応に使用し、GSP2は、PCR増幅の最初の実行に使用し、GSP3は、ネステッド増幅に使用する。プライマーは、SHANGHAI SANGON BIOLOGICAL TECHNOLOGY & SERVICES CO., LTDにより合成され、その配列は下記であった：GSP1-H, 5'-GTA GAG GTC AGA CTG CAG GAC-3'; GSP2-H, 5'-CTC AGG GAA ATA GCC CTT GAC-3'; GSP3-H, 5'-AGA TCC AGG GGC CAG TGG ATA GAC-3'。GSP1-L, 5'-TTG CTG TCC TGA TCA GTC CAA CT-3'; GSP2-L, 5'-TGT CGT TCA CTG CCA TCA ATC TT-3'; GSP3-L, 5'-TTG TTC AAG AAG CAC ACG ACT GA-3'

【0024】

GSP1をプライマーとして用い、5'RACE試薬キット(Gibco BRL, US)の取扱説明書に従って、全RNAをcDNAに逆転写し、次いでポリ(C)テールを第1鎖cDNAの3'末端に付加し、テーリング後、GSP2およびAAPをプライマーとして用いてPCR増幅を行い、増幅産物を100倍希釈し、AUAAPおよびGSP3をプライマーとして用いてネステッドPCR増幅を行った。どちらのPCR反応もホットスタートPCRで行い、反応条件は、94で5分; 94で45秒、60で45秒、72で70秒を30サイクル; 72で7分であった。ネステッドPCR産物を1%アガロースゲル電気泳動により分離し、次いで対象の断片を回収および精製し、pGEM-Tイージーベクターにクローニングし、陽性クローンを選択して配列決定し、配列決定の結果について分析を行った。次いで、配列決定により確認された正しいpGEM-T/V_Hを鋳型として利用し、HセンスプライマーAAG CTT GCC GCC ACC ATG GAT TGG CTG TGG AAC TTGおよびHアンチセンスプライマーGCT AGC TGC AGA GAC AGT GAC CAGを設計し、ワンステップRT-PCR反応を用いてV_H鎖可変領域遺伝子を増幅し、その5'末端にHindIII制限酵素部位が含まれ、3'末端にNheI制限酵素部位が含まれるようにした。反応条件は、50で30分; 95で15分; 94で50秒、58で50秒、72で50秒を30サイクル; 72で10分であった。PCR産物を、アガロースゲル電気泳動により精製し、回収してpGEM-Tベクター(Promega)にクローニングし、陽性クローンを選択し、配列決定により検証し、その結果から、配列が5'RACEの配列と完全に一致することが実証された。配列番号9および配列番号10は、それぞれ、4C8重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。本実施例において、正しいクローンをpGEM-T/V_Hと命名した。

【0025】

配列決定により検証された正しいpGEM-T/V_Lを鋳型として利用して、HセンスプライマーAAG CTT GCC GCC ACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTGおよびLアンチセンスプライマーGAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT CCG TTT GAT TTC CAG CTT Gを設計し、ワンステップRT-PCRを用いてV_L遺伝子を増幅し、その5'末端にHindIII制限酵素部位が含まれ、3'末端にヒト抗体軽鎖定常領域の5'末端に相補的な配列が含まれるようにした。反応条件は、94で5分; 94で50秒、58で50秒、72で1分を30サイクル; 72で10分であった。PCR産物を、アガロースゲル電気泳動により精製し、回収してpGEM-Tベクター(Promega)にクローニングし、陽性クローンを選択し、配列決定により検証し、その結果から、配列が5'RACEの配列と完全に一致することが実証された。配列番号11および配列番号12は、それぞれ、4C8軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。本実施例において、正しいクローンをpGEM-T/V_Lと命名した。

【0026】

10

20

30

40

50

キメラ抗体 c 4 C 8 の構築

ワンステップ RT - PCR 後、配列決定により正しいとされた上記のプラスミド p G E M - T / V H を、H i n d I I I および N h e I により消化し、アガロースゲル電気泳動により精製し、回収した後に得られた 4 3 0 b p の消化断片を、同じく H i n d I I I および N h e I によって消化したプラスミド p G E M - T / C H とライゲーションし、正しいクローンを選択し、H i n d I I I および E c o R I によって消化し、アガロースゲル電気泳動により精製した後、対象の断片を回収し、T 4 D N A リガーゼ (I n v i t r o g e n , U S) を用いて、H i n d I I I および E c o R I によって消化した p c D N A 3 . 1 (+) (I n v i t r o g e n , U S) とライゲーションし、真核細胞発現ベクター - p c D N A 3 . 1 (+) (V H C H) を構築した。

10

【 0 0 2 7 】

ワンステップ RT - PCR 後、配列決定により正しいとされた上記プラスミド p G E M - T / V L を、反応条件が、5 0 で 3 0 分 ; 9 5 で 1 5 分 ; 9 4 で 5 0 秒、5 8 で 5 0 秒、7 2 で 5 0 秒を 3 0 サイクル ; 7 2 で 1 0 分であるオーバーラッピング PCR を用いて、正しいクローン p G E M - T / V L の軽鎖定常領域に直接融合し、5 ' 末端に H i n d I I I 制限酵素部位が含まれ、3 ' 末端に E c o R I 制限酵素部位が含まれる PCR 産物 V L C L を得た。アガロースゲル電気泳動により精製した後、PCR 産物を回収し、p G E M - T ベクター (P r o m e g a) にクローニングし、陽性クローンを選択し、配列決定した。配列決定により正しいとされた V L C L 遺伝子を、H i n d I I I および E c o R I によって p G E M - T ベクターから切断し、p c D N A 3 . 1 / Z E O (+) ベクター (I n v i t r o g e n , U S) にクローニングして真核細胞発現ベクター - p c D N A 3 . 1 / Z E O (+) (V L C L) を構築した。

20

【 0 0 2 8 】

3 × 1 0 ⁵ 個の C H O - K 1 細胞を、3 . 5 c m の組織培養皿に播種し、細胞が 9 0 ~ 9 5 % 融合するまで培養した時にトランスフェクトした : プラスミド 1 0 μ g (プラスミド c D N A 3 . 1 (+) (V H C H) 4 μ g、プラスミド p c D N A 3 . 1 / Z E O (+) (V L C L) 6 μ g) および L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 R e a g e n t (I n v i t r o g e n) 2 0 μ l を、それぞれ、血清を含まない D M E M 培地 5 0 0 μ l に溶解させ、室温で 5 分間静置し、上記 2 種の液体を混合し、室温で 2 0 分間インキュベートして DNA - リポソーム複合体を形成した。この期間中、培地皿中の血清含有培地を、血清を含まない D M E M 培地 3 m l と入れ替え、次いで形成された DNA - リポソーム複合体をプレートに加え、C O ₂ インキュベーター内で 4 時間培養し、次いで 1 0 % 血清含有 D M E M 完全培地 2 m l を補充し、C O ₂ インキュベーター内で持続的に培養した。トランスフェクションの 2 4 時間後、細胞を 6 0 0 μ g / m l の G 4 1 8 および 2 5 0 μ g / m l の Z e o c i n を含有する選択培地に移して耐性クローンを選択した。細胞培養物の上澄みを利用し、E L I S A によって、高度に発現しているクローンを選択した : ヤギ抗ヒト I g G (F c) を E L I S A プレート上にコーティングし、4 で一晩置き、2 % B S A - P B S を用いて 3 7 で 2 時間、ブロックし、試験対象の耐性クローン培養物の上澄みまたは標準試料 (ヒト骨髄腫 I g G 1、) を加え、3 7 で 2 時間加温インキュベートし、化合物反応のために H R P - ヤギ抗ヒト I g G () を加え、3 7 で 1 時間加温インキュベートし、T M B を加えて 3 7 で 5 分間作用させ、最後に H ₂ S O ₄ を用いて反応を止め、A _{4 5 0} 値を測定した。選択によって得られた、高度に発現しているクローンを、血清を含まない培地で拡大培養し、P r o t e i n A 親和性カラム (G E c o m p a n y) によって、キメラ抗体 c 4 C 8 を単離し精製した。精製された抗体を、P B S を用いて透析し、紫外線吸収法を定量化に用いた。

30

40

【 実施例 3 】

【 0 0 2 9 】

ヒト化抗体 4 C 8 の構築

マウス由来 4 C 8 モノクローナル抗体の可変領域 (F v) の三次元構造の相同性モデリング

50

マウス由来4C8モノクローナル抗体の可変領域の三次元構造を、Accelrys companyのInsight IISoftウェアパッケージにより作製した。まず、4C8の重鎖可変領域タンパク質および軽鎖可変領域タンパク質の鋳型タンパク質を、それぞれ、BLASTプログラムによってProtein Data Bank (PDB) で検索した。最も高い相同性を有する抗体1A4Jを、図1に示したような、Insight IIプログラムを用いた4C8の三次元構造モデリングのための、4C8のモデリング鋳型として選択した。

【0030】

ヒト化4C8抗体の設計および構築

BLASTプログラムを用いて、4C8の軽鎖可変領域および重鎖可変領域に最も類似したヒト由来の鋳型を、Genbankデータベースで検索した。4C8の重鎖可変領域と最も高い相同性を有するヒト由来抗体は、68%の類似性を持つヒト抗体AAC18206 (GenBank No. AAC18206) であり、4C8の軽鎖可変領域と最も高い相同性を有するヒト由来抗体は、80%の類似性を持つBAC01734 (GenBank No. BAC01734) である。従って、AAC18206およびBAC01734を、それぞれ、4C8の重鎖および軽鎖のヒト化鋳型として使用した。まず、4C8の重鎖CDR領域および軽鎖CDR領域を、それぞれ、ヒト化鋳型AAC18206およびBAC01734にグラフィティングしてCDRがグラフィティングされた抗体、それぞれ重鎖および軽鎖に対して、h4C8Haおよびh4C8Laを形成した。h4C8Haの可変領域およびh4C8Laの可変領域のアミノ酸配列を図2に示す。ヒト化抗体の重鎖可変遺伝子および軽鎖可変遺伝子 (h4C8VHaおよびh4C8VL a) を全遺伝子合成により合成し、次いでh4C8VHa遺伝子およびpGEM-T/CHベクターを鋳型として用いて、オーバーラッピングPCRによってヒト化抗体の重鎖遺伝子を合成した。反応条件は、95 で15分; 94 で50秒、58 で50秒、72 で50秒を30サイクル; 72 で10分であった。加えて、このヒト化重鎖遺伝子は、5'末端にHindIII制限酵素部位およびシグナルペプチド遺伝子配列、3'末端に翻訳停止コードTAAおよびEcoRI制限酵素部位を有するようにした。シグナルペプチドの配列は配列番号: (ATGGATTTCAGGTGCAGATTTCAGCTTCTCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCAATAATATCCAGAGGA) に示す。最後に、PCR増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分離し、対象のバンドを回収し、pGEMTベクターにクローニングして陽性クローンを選択し配列決定した。正しい配列を持つクローンを選択し、HindIIIおよびEcoRIによって消化し、アガロースゲル電気泳動を行った後、ヒト化抗体の重鎖断片H4C8VHaCHを回収し、HindIIIおよびEcoRIによって消化したプラスミドpcDNA3.1 (+) (Invitrogen, USA) とライゲーションして、ヒト化重鎖真核生物発現ベクターpcDNA3.1 (+) (h4C8VHaCH) を構築した。

【0031】

h4C8VL a遺伝子およびpGEM-T/CLベクターを鋳型として用いて、オーバーラッピングPCRによって、ヒト化抗体の軽鎖遺伝子を合成した。反応条件は、95 で15分; 94 で50秒、58 で50秒、72 で50秒を30サイクル; 72 で10分であった。このようにして得られたPCR産物はh4C8VL aCLであり、5'末端にHindIII制限酵素部位およびシグナルペプチド遺伝子配列、3'末端に翻訳停止コードTAAおよびEcoRI制限酵素部位を含む。シグナルペプチドの配列は配列番号: (ATGGATTTCAGGTGCAGATTTCAGCTTCTCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCAATAATATCCAGAGGA) に示す。正しい配列を持つクローンを選択し、HindIIIおよびEcoRIによって消化し、アガロースゲル電気泳動を行った後、ヒト化抗体の軽鎖断片H4C8VL aCLを回収し、同じくHindIIIおよびEcoRIによって消化したプラスミドpcDNA3.1 (+) ベクター (Invitrogen, USA) とライゲーションして、ヒト化重鎖真核生物発現ベクターpcDNA3.1/ZEO (+) (h4C8VL aCL) を構築した。

【0032】

COS-1細胞(ATCC CRL 1650)を、 0.8×10^5 / ウェルで24ウェルの組織培養プレートに播種し、10% FCS含有RPMI 1640 / DMEM混合培地(16 / DM培地)を用いて90~95%融合するまで培養してトランスフェクションを行った: プラスミド1 μ g (軽鎖発現ベクター0.6 μ g、重鎖発現ベクター0.4 μ g) およびLipofectamine 2000 Reagent 2 μ lを、それぞれ、血清を含まない16 / DM培地50 μ lに溶解させ、室温で5分間静置し、上記2種の液体を混合し、室温で20分間インキュベートしてDNA-リボソーム複合体を形成した。この期間中に、24ウェル培養プレート中の血清含有培地を、血清を含まない16 / DM培地0.5 mlと入れ替え、次いで形成されたDNA-リボソーム複合体をウェルに加え、CO₂インキュベーター内で4時間培養し、次いで20% FCS含有16 / DM培地0.5 mlを補充し、CO₂インキュベーター内で持続的に培養した。72時間後、培養物の上澄みを分析のために利用し、培養物の上澄み中の抗体含有量をELISAにより決定した: ヤギ抗ヒトIgG (Fc)をELISAプレート上にコーティングし、4で一晚置き、2% BSA-PBSを用いて37で2時間、ブロッキングし、試験対象の培養物の上澄みおよび標準試料(ヒト骨髄腫IgG1、)を加え、37で2時間インキュベートし、化合物反応のためにHRP-ヤギ抗ヒトを加え、37で1時間インキュベートし、TMBを加えて37で5分間作用させ、最後にH₂SO₄を用いて反応を止め、OD₄₅₀値を測定した。

10

【0033】

ヒトKG-1a細胞を、細胞 1×10^6 個/mlになるように2% FCS-PBSに再懸濁させ、ヒト化抗体をトランスフェクトしたCOS細胞培養物の上澄みを、異なる希釈度で、それぞれ加え、それらを4で60分間インキュベートし、次いで細胞を2% FCS-PBSで2回洗浄し、次いでFITC-ヤギ抗ヒトIgG (H+L)を細胞に加え、4で60分間インキュベートし、洗浄した後、細胞をフローサイトメトリー(FCM)によって分析し、蛍光強度を計算した。その結果から、c4C8キメラ抗体と比べて、h4C8Haおよびh4C8Laから構成されるヒト化抗体(h4C8Ha/h4C8La)は、その活性がほとんど完全に失われることが示されている(図3)。それゆえ、高い親和性を持つヒト化抗体を得るために、さらに、4C8抗体の結合活性にもしかしたら影響しうるFR領域のマウス由来残基について分析および復帰突然変異を行う必要がある。

20

30

【0034】

モデリングした4C8モノクローナル抗体の可変領域の三次元構造を分析することにより、CDR領域の周囲5内の9つのフレームワーク残基、L3Leu、L4Leu、L46Leu、H2Ile、H46Lys、H68Ala、H69Leu、H82aAsn、およびH91Pheが、ヒト化鑄型の対応する位置と異なると同時に、原型である抗体のCDRコンホメーションに影響する可能性があることが発見された。構築されたCDRグラフィティング抗体内にこれらのマウス由来アミノ酸残基を残したままヒト化抗体(h4C8Hb/h4C8Lb)を得ることができる。h4C8Hbおよびh4C8Lbの可変領域に対するアミノ酸配列を図2に示す。配列番号5および6は、それぞれ、h4C8Hbのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。配列番号7および8は、それぞれ、h4C8Lbのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。h4C8Hbの3つのCDR領域のアミノ酸配列は、それぞれ、HCDR1(GYTFITNYGMN)、HCDR2(WINTNTGEPKYAE EFKG)、HCDR3(GYGNYARGAWLAY)である(図2-1のH4C8VHb参照)。h4C8Lbの3つのCDR領域のアミノ酸配列は、それぞれ、LCDR1(RSSQTI VHSNGNTYLE)、LCDR2(QVSNRFS)、LCDR3(FQGS HV PRT)である(図2-2のH4C8VLb参照)。ヒト化抗体の重鎖可変領域遺伝子および軽鎖可変領域遺伝子(h4C8VHb/h4C8VLb)を、それぞれ、オーバーラッピングPCRを用いて合成し、ヒト化抗体(h4C8Ha/h4C8La)についてと同じ方法を用いて軽鎖発現ベクターpcDNA3.1/ZEO(+)(h4C8VLbCL)および重鎖発現ベクターpcDNA3.1

40

50

(+) (h4C8VHbCH) を構築した。次いで、軽鎖発現ベクターおよび重鎖発現ベクターをCOS-1細胞に共トランスフェクトした。フローサイトメトリーアッセイを行って抗体の抗原結合活性を決定し、その結果、KG-1aに対するこの抗体の結合能は4C8キメラ抗体の結合能と同様であることが示され、よってこのヒト化抗体(h4C8Ha/h4C8La)をh4C8として設計した。

【実施例4】

【0035】

ヒト化抗体の安定発現および精製

3 × 10⁵ 個のCHO-K1細胞(ATCC CRL-9618)を、3.5 cmの組織培養皿に播種し、細胞が90~95%融合するまで培養した時にトランスフェクトした：プラスミド10 μg (プラスミドpcDNA3.1(+)(Vh4C8HbCH) 4 μg、プラスミドpcDNA3.1/ZERO(+)(Vh4C8LbCL) 6 μgおよびLipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) 20 μlを、それぞれ、血清を含まないDMEM培地500 μlに溶解させ、室温で5分間静置し、上記2種の液体を混合し、室温で20分間インキュベートしてDNA-リボソーム複合体を形成した。この期間中、培地皿中の血清含有培地を、血清を含まないDMEM培地3 mlと入れ替え、次いで形成されたDNA-リボソーム複合体をプレートに加え、CO₂インキュベーター内で4時間培養し、次いで10%血清含有DMEM完全培地2 mlを補充し、CO₂インキュベーター内で持続的に培養した。トランスフェクションの24時間後、細胞を600 μg/mlのG418および250 μg/mlのZeocinを含有する選択培地に移して耐性クローンを選択した。細胞培養物の上澄みを利用し、高度に発現しているクローンを選択した：ヤギ抗ヒトIgG(Fc)をELISAプレート上にコーティングし、4℃で一晩置き、2%BSA-PBSを用いて37℃で2時間、ブロッキングし、試験対象の耐性クローン培養物の上澄みまたは標準試料(ヒト骨髄腫IgG1、)を加え、37℃で2時間加温インキュベートし、化合反応のためにHRP-ヤギ抗ヒトIgG()を加え、37℃で1時間加温インキュベートし、TMBを加えて37℃で5分間作用させ、最後にH₂SO₄を用いて反応を止め、A₄₅₀値を測定した。選択によって得られた、高度に発現しているクローンを、血清を含まない培地で拡大培養し、Protein A親和性カラム(GE company)によって、ヒト化抗体h4C8を単離し、精製した。精製された抗体を、PBSを用いて透析し、紫外線吸収法を定量化に用いた。

【実施例5】

【0036】

競合阻害試験

固定したほぼ飽和濃度の蛍光標識精製抗体FITC-4C8と、非標識抗体の段階希釈液を、それぞれ混合し、次いで、標的のKG-1a細胞に加え(1 × 10⁶ 個/ml)、4℃で60分間インキュベートし、細胞を1%のFCS-PBSで2回洗浄し、分析のためにCellquestソフトウェアを用いたFCMによって試験した。ヒト化抗CD3モノクローナル抗体hu12F6を対照として用いた(調製については、Li BH, Wang H, Dai JX, Ji JJ, Qian WZ, Zhang DP, Hou S, Guo YJ. Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. Immunology. 2005, 116(4): 487-98を参照されたい)。競合抗体の各濃度について、管を3連で用意した。競合抗体が存在しない場合に得られた蛍光強度の平均を示す最大蛍光強度を用いてIC₅₀値を計算した。

【0037】

試験結果を図4に示す。抗体h4C8は、蛍光標識抗体FITC-4C8のKG-1aへの結合を完全に遮断し、h4C8とFITC-4C8のIC₅₀値はほぼ同じであり、こ

のことは、このヒト化抗体が、原型であるマウス由来抗体の特異性および親和性と同様の特異性および親和性を有することを示唆している。

【0038】

【表1】

表1. 競合阻害分析の結果

抗体の種類	IC ₅₀ (μg/ml) ^a	SD	n
4C8	1.723	0.145	3
c4C8	1.692	0.137	3
h4C8	1.764	0.158	3

10

【実施例6】

【0039】

免疫磁気ビーズの調製

活性化：pH 6.0、0.01 mol/LのNaH₂PO₄ Tween溶液（0.05% Tween-20）を活性化緩衝溶液として利用し、カルボキシルビーズ（Bangs Laboratories, BioMag Carboxyl (BM570), USA）2 mgを2 mlの遠心分離管に入れ、活性化緩衝溶液500 μlを加えてボルテックスミキサーで均一に混合し、次いで遠心分離管をMagnetic Separation Rack上に置き、磁気ビーズが完全に吸着した後、上澄みを小型の真空ポンプによって抽出した。活性化緩衝溶液500 μlを加えて磁気ビーズを2回、洗浄し直し、次いで、活性化緩衝溶液485 μlを磁気ビーズに加え、カルボジイミド（EDC、最初の濃度0.5 g/ml）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS、最初の濃度0.25 g/ml）をそれぞれ2.5 mg加え、ボルテックスミキサーで均一に混合して、磁気ビーズの表面のカルボキシル基2 mgを室温で30分間、活性化させた。

20

【0040】

コンジュゲート：pH 7.4、0.01 mol/Lのリン酸 Tween溶液（PBST、0.05% Tween-20）500 μlをコンジュゲート緩衝液として用い、活性化緩衝溶液500 μlを加えて活性化した磁気ビーズを3回洗浄し直し、次いでコンジュゲート緩衝液500 μlを加えて磁気ビーズを2回洗浄した。コンジュゲート緩衝液475 μlを加えて洗浄した磁気ビーズを再懸濁させ、6 mg/mlの抗CD34抗体25 μlを加え、磁気ビーズ上の活性化したカルボキシル基を、室温で3時間、抗CD34抗体のアミノ基と反応させ、次いで抗体を磁気ビーズの表面にコンジュゲートして、免疫磁気ビーズを得た。

30

【0041】

ブロッキング：コンジュゲートした磁気ビーズをコンジュゲート緩衝液500 μlで2回洗浄し、1%のウシ血清アルブミン（BSA）含有コンジュゲート緩衝液500 μlを加えて30分間磁気ビーズをブロッキングした。

40

【0042】

貯蔵：コンジュゲートした磁気ビーズをコンジュゲート緩衝液500 μlで2回洗浄し、磁気ビーズを、0.02% NaN₃、0.1% BSAを含有するpH 7.4、0.01 mol/Lのリン酸 Tween溶液（0.05% Tween-20）500 μl中に再懸濁させ、次いで使用するために冷蔵庫内で4℃で貯蔵した。

【実施例7】

【0043】

CD34免疫磁気ビーズによるCD34+細胞系の選別

CD34+KG-1a（ヒト白血病細胞）とCD34-Raji（ヒトBリンパ腫細胞）をin vitroで1:10の比率で混合し、ヒト臍帯血単核細胞（または動員され

50

細胞を、CD34-FITC(8G12、BD Bioscience、340668、選別抗体に対する競合作用を有さない)で染色し、選別によって得られた細胞の純度は95%を超えることが同定され、選別細胞を計測したところ、CD34+細胞の選別収率は90%を超えた。結果を図6に示す。

【0054】

この結果は、我々が調製したCD34免疫磁気ビーズを用いた臍帯血幹細胞の選別によって得られた純度および収率が、臨床に適用するための必要性に見合い、骨髄血幹細胞の臨床的移植において使用できることが見込まれることを示している。

【実施例9】

【0055】

ヒト化抗CD34抗体およびマウス由来抗体My10の競合阻害試験

ほぼ飽和濃度のFITC-CD34(My10)(BD、348053)ならびに非標識の精製抗体h4C8および非標識のMy10(マウス抗ヒトCD34ハイブリドーマ細胞(ATCC、HB8483、抗My10クローン)の段階希釈液を、血清を含まないハイブリドーマ-SFM培地(GIBCO、12045)で培養した。rProteinA親和性クロマトグラフィー(GE)により精製した後、培養物の上澄みをそれぞれ混合し、次いで標的細胞KG-1a(1x10⁶/ml)に加え、4で60分間インキュベートし、細胞を1%FCS-PBSで2回洗浄し、分析のためにCellquestソフトウェアを用いたFCMにより試験した。ヒト化抗CD3モノクローナル抗体hu12F6を対照として用いた(調製については、Li BH, Wang H, Dai JX, Ji JJ, Qian WZ, Zhang DP, Hou S, Guo YJ. Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. Immunology. 2005, 116(4): 487-98を参照されたい)。競合抗体の各濃度について、管を3連で用意した。競合抗体が存在しない場合に得られた蛍光強度の平均を示す最大蛍光強度を用いてIC₅₀値を計算した。この試験を3回繰り返し、統計的な結果を得る。表2を参照されたい。

【0056】

試験結果を図7に示す。抗体h4C8によって遮断される蛍光標識抗体FITC-My10のKG-1a細胞への結合についてのIC₅₀値は、マウス由来モノクローナル抗体My10によるものよりも小さく(P<0.05、t検定)、それゆえ、h4C8の親和性はマウス由来モノクローナル抗体My10よりもすぐれている。

【0057】

【表2】

表2. 競合阻害分析の結果

抗体の種類	IC ₅₀ (μg/ml)	$\bar{X} \pm SD$	p
My10	8.67	8.69±0.53	1.54×10 ⁻⁵
	9.23		
	8.18		
h4C8	1.11	1.09±0.06	
	1.14		
	1.02		

【実施例10】

【0058】

ヒト化抗CD34抗体およびマウス由来抗体My10の磁気ビーズへのコンジュゲート後の臍帯血幹細胞選別に対する比較試験

10

20

30

40

50

マウス抗ヒトCD34ハイブリドーマ細胞(ATCC、HB8483、抗My10クローン)を、血清を含まないハイブリドーマ-SFM培地(GIBCO、12045)を用いて培養した。培養物の上澄みをrProteinA親和性クロマトグラフィー(GE)により精製し、磁気ビーズ調製条件の必要性に見合った抗CD34モノクローナル抗体(My10)を得た。

【0059】

My10およびh4C8を、実施例6の方法に従って磁気ビーズにコンジュゲートして、CD34ナノ免疫磁気ビーズを調製した。

【0060】

ヒト臍帯血幹細胞を、実施例8の方法に従って、My10およびh4C8ナノ免疫磁気ビーズにより選別した。選別によって得られた陽性細胞を、血球計測プレートにより計測し、2種の磁気ビーズによる選別によって得られた細胞の収率を計算し、選別によって得られた陽性細胞をFITC-抗CD34(BD、348053、8G12)によって染色し、2種の磁気ビーズによる選択によって得られた細胞の純度を同定した。染色の結果を図8に示す(左側のピークは選別前の試験結果であり、右側のピークは選別後の試験結果である)。

10

【0061】

比較試験の結果を表3に示した。

【0062】

【表3】

20

表3

	My10磁気ビーズ	h4C8磁気ビーズ
収率(%)	78%	91%
純度(%)	91%	95%

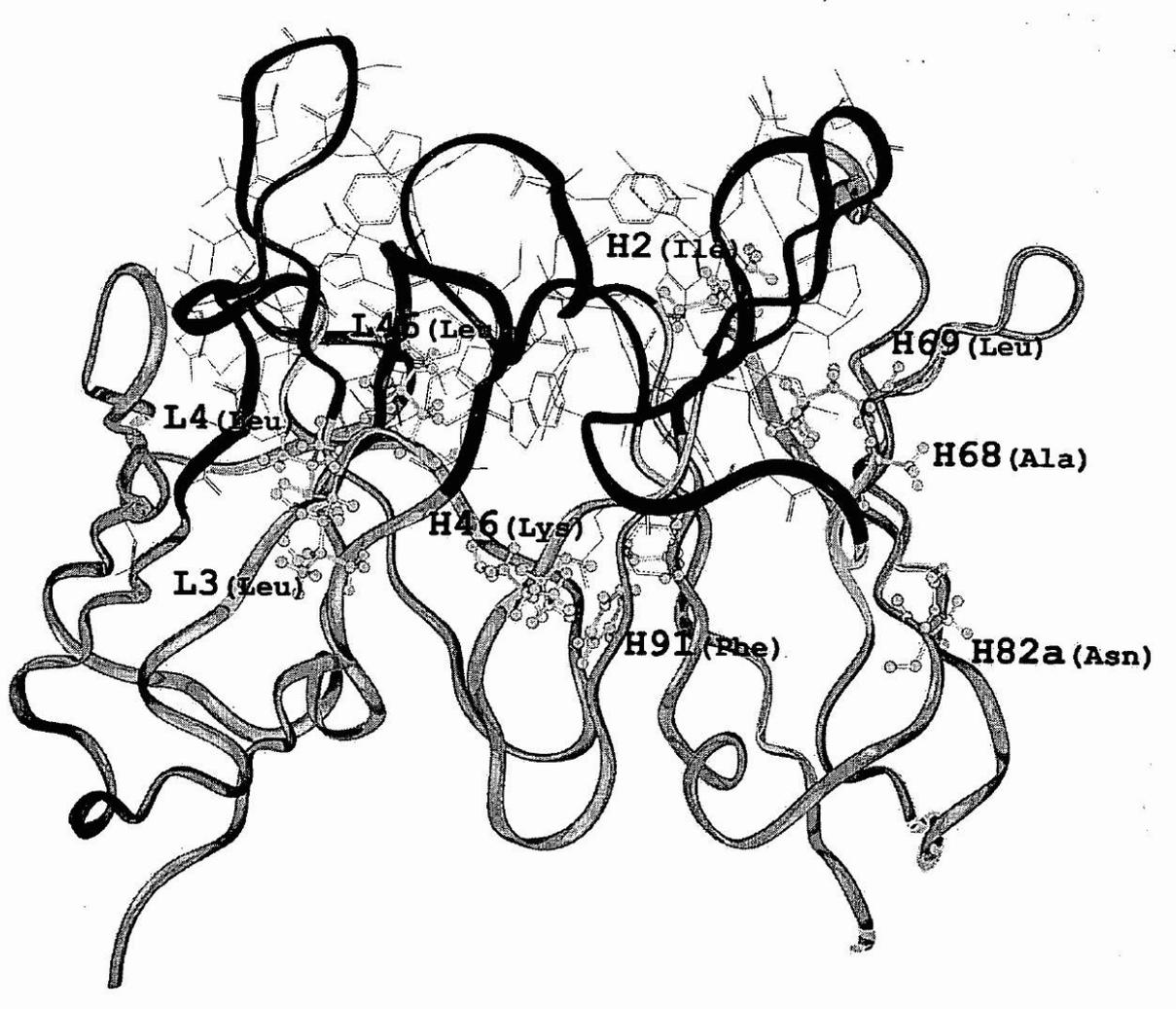
【産業上の利用可能性】

【0063】

本発明のヒト化抗CD34抗体は、原型であるマウス由来抗体の親和性および特異性を保持している。この抗体は、ナノ磁気物質とコンジュゲートして、骨髓造血幹細胞を選別するための免疫磁気ビーズを調製することができる。この抗体を用いると、HAMAの出現率が効果的に減少し、造血幹細胞の臨床的移植の安全性が改善される可能性があり、この抗体は、特定の悪性血液病および固形腫瘍の治療に使用することができる。本発明のヒト化抗CD34抗体は、遺伝子組換え技術によって得られる。

30

【 図 1 】



【 図 2 】

```

4C8VH      1 10 20 30 40 50
            QIQLVQSGPELKKPGETVNI20SCKAS [GYTF30TNYGMN]WVKQAPGKGLKWMG [W
AAC18206   QVQLVQSGSELKKPGASVKV20SCKAS [GYTF30TSYAMN]WVRQAPGQGLEWMG [W
h4C8VHa    ----- [----N-G--]----- [-
h4C8VHb    -I----- [----N-G--]-----K--- [-

```

```

4C8VH      a 60 70 80 abc 90
            INTNTGEPKYAEEFKG]RFALS70LETSASTAYLQ80INNabcLK90NEDTATYFCAR [GY
AAC18206   INTNTGNPTYAQGFTG]RFV70FSLDTSVSTAYLQ80ISSLKAEDTAVYYCAR [DV
h4C8VHa    -----E-K--EE-K-]----- [GY
h4C8VHb    -----E-K--EE-K-]--AL-----N-----F--- [GY

```

```

4C8VH      100abcde 110
            GNYARGAWLAY]WGQGT110LVTVSA
AAC18206   ATIDEN-WFDP]WGQGT110LVTVSS
h4C8VHa    GNYARGA-LAY]-----
h4C8VHb    GNYARGA-LAY]-----

```

図2-1

```

4C8VL      1 10 20 30 abcde 40
            DVLLTQTPLSLPVS10LG20DQASISC [RSSQ30TIVHSNGNTYLE]WFLQKPGQSP
BAC01734   DVVMTQSPLSLPVT10LQ20PASISC [RSSQ30SLVHSDGNTYLN]WFQQRPGQSP
h4C8VLa    ----- [----TI---N-----E]-----
h4C8VLb    --LL----- [----TI---N-----E]-----

```

```

4C8VL      50 60 70 80 90
            KLLIY [QVSNRFS]GVPDR60FSGSGSGTDF70TLKISRVEAEDLG80VYYC [FQ90GSHV
BAC01734   RRLIY [KVSNRDS]GVPDR60FSGSGSGTDF70TLKISRVEAEDVG80VYYC [MQG90THW
h4C8VLa    ----- [Q----F-]----- [F--S-V
h4C8VLb    -L--- [Q----F-]----- [F--S-V

```

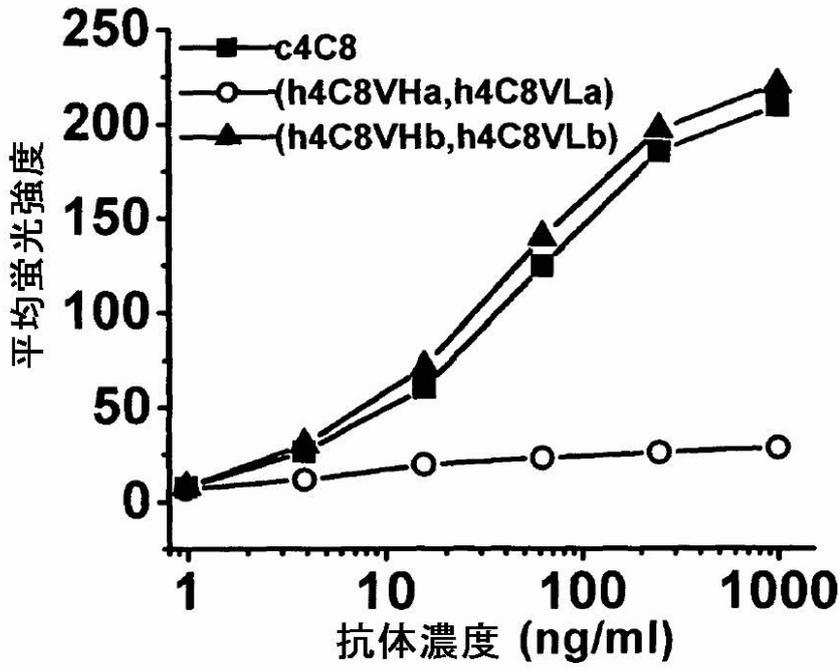
```

4C8VL      100
            PRT]FGGGTKLEIKR
BAC01734   PLT]FGGGTKVEIKR
h4C8VLa    -R-]-----
h4C8VLb    -R-]-----

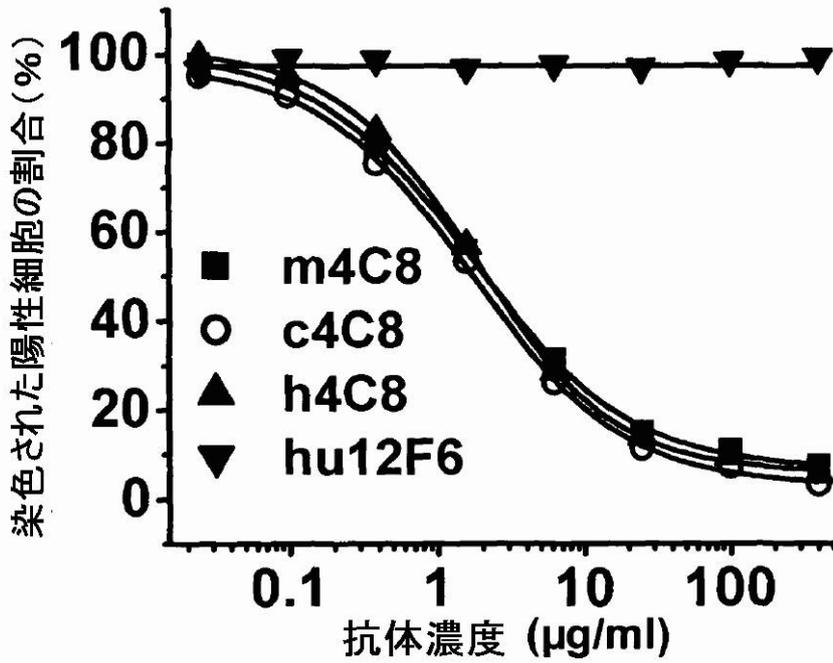
```

図2-2

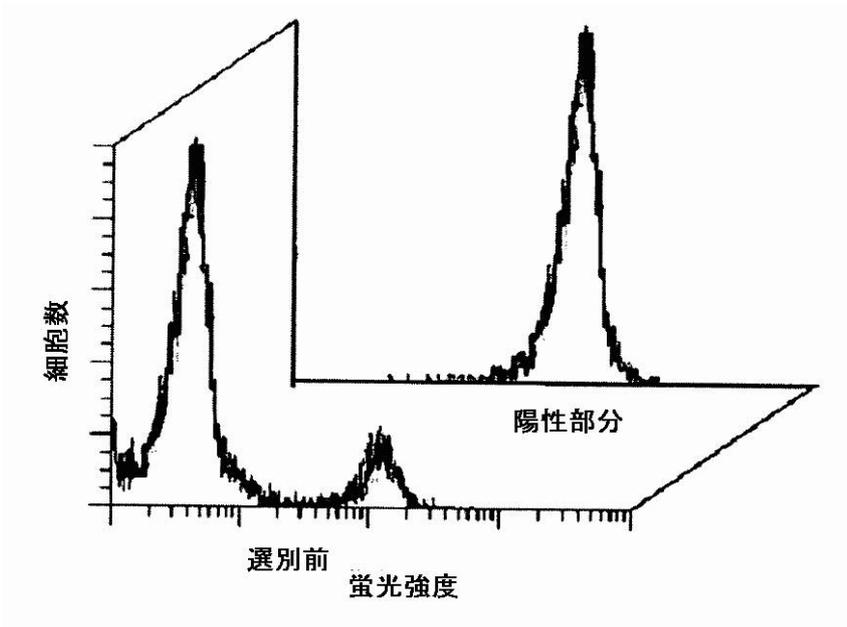
【 図 3 】



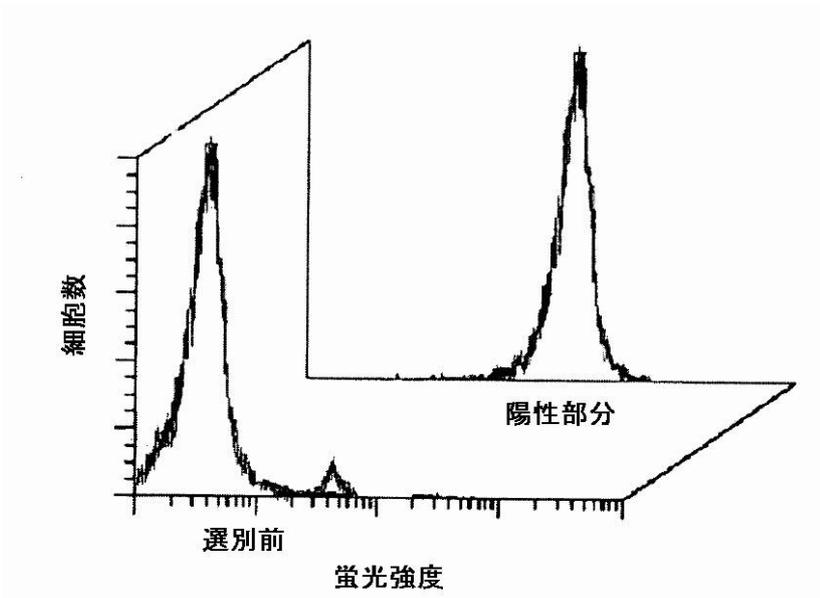
【 図 4 】



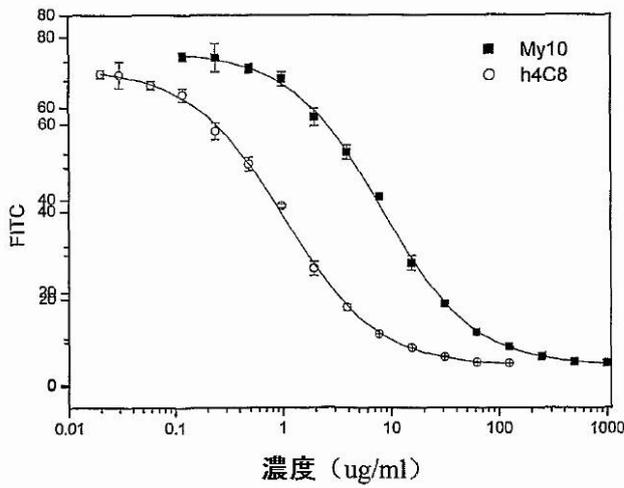
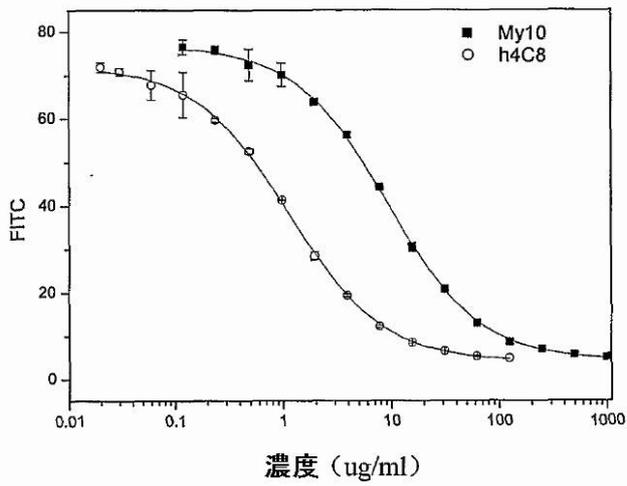
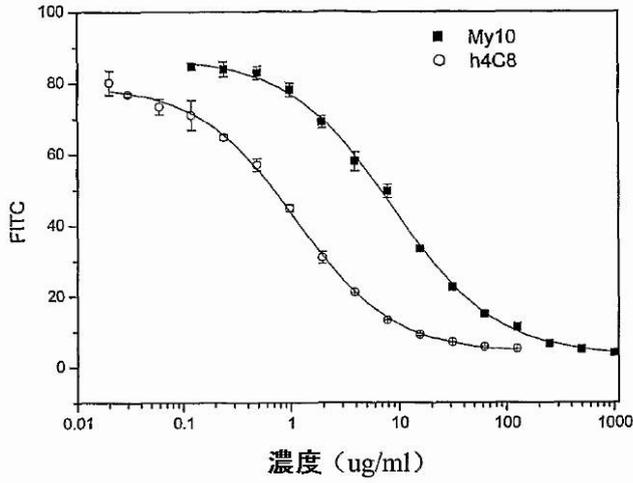
【 図 5 】



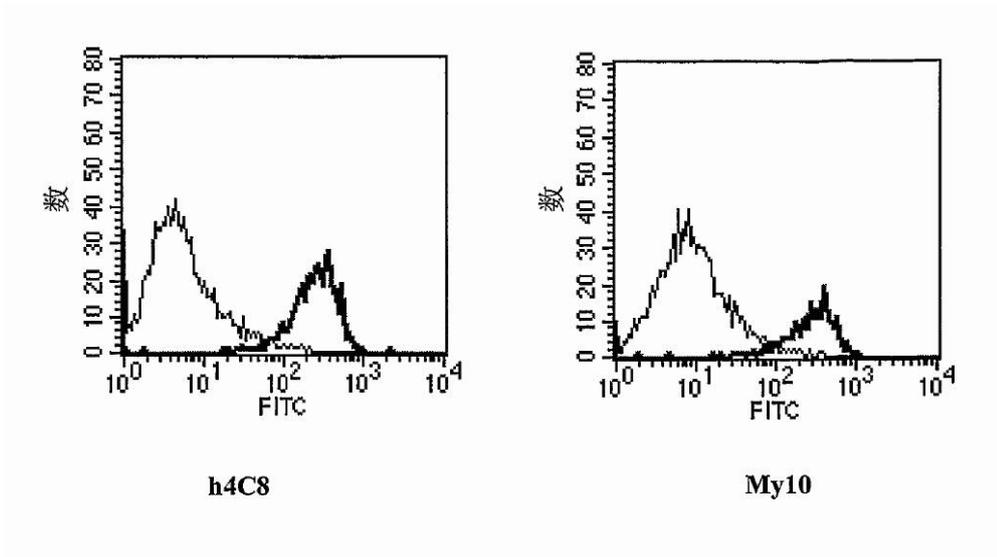
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

[2011505810000001.app](#)

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2008/001963
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C07K; C12P; G01N; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI; EPODOC; PAJ; CPRS; CNKI; BIOSIS; MEDLINE and keywords: CD34, antibody+, monoclonal antibody+, humaniz+, (SHAN w N), C07K16/IC, C07K16/EC, inventors, applicants FASTA, GenBank: SEQ ID NO:1-12		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	HOU S ET AL, Humanization of an anti-CD34 monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modeling, J Biochem, Jul. 2008, vol.144, no.1, pages 115-120, ISSN 0021-924X see the whole document, especially see page 118, the amino acid sequences of h4C8	1-10
PY	CN101245108 A (SHAN N) 20 Aug. 2008 (20.08.2008) examples 1-3, SEQ ID NOs.:1-2, claims	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&"document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 18 Feb.2009 (18.02.2009)	Date of mailing of the international search report 19 Mar. 2009 (19.03.2009)	
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer YU, Qun Telephone No. (86-10)62411103	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001963

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
 - in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in electronic form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001963

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	QIAN W ET AL, anti-human CD34 mAb 4C8 immunoglobulin heavy chain variable region 【Mus musculus】 , GenBank, Accession No. ABY61978, 19 Feb. 2008 see the amino acid sequence	1-10
PY	QIAN W ET AL, anti-human CD34 mAb 4C8 immunoglobulin light chain variable region 【Mus musculus】 , GenBank, Accession No. ABY61979, 19 Feb. 2008 see the amino acid sequence	1-10
Y	LI BO HUA, Preparation and Characterization of an Anti-human CD3 Humanized Antibody, CNKI-the whole document database of Chinese doctor's degree thesis, January 31, 2003 See paragraph 1, page 44 to paragraph 1, page 45	1-10
A	LI AI LING, Preparation and Functional Study of Monoclonal Antibodies against the Human CD20 and CD34, CNKI-the whole document database of Chinese doctor's degree thesis, January 31, 2003 see pages 57-60	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2008/001963

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101245108 A	20.08.2008	none	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/001963

Continuation of: Classification of subject

C07K16/28 (2006.01) i

C012P21/08 (2006.01) i

G01N33/543 (2006.01) i

A61K39/44(2006.01) i

A61P7/06(2006.01) i

A61P35/00(2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2008/001963
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07K; C12P; G01N; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI; EPODOC; PAJ; BIOSIS; MEDLINE 和关键词: CD34, antibody+, monoclonal antibody+, humaniz+, (SHAN w N), C07K16/1C, C07K16/EC, inventors, applicants		
CNKI; CPRS 和关键词: CD34, 抗体, 单克隆抗体, 人源, 发明人, 申请人		
FASTS, GenBank		
SEQ ID NO: 1-12		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	HOU S 等, Humanization of an anti-CD34 monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modeling, J Biochem, 7 月 2008, 第 144 卷, 第 1 期, 第 115-120 页, ISSN 0021-924X 参见全文, 尤其是第 118 页 h4C8 的氨基酸序列	1-10
PY	CN101245108 A (上海中信国健药业有限公司) 20.8 月 2008 (20.08.2008) 实施例 1-3, SEQ ID NO:1-2, 权利要求书	1-10
PY	QIAN W 等, anti-human CD34 mAb 4C8 immunoglobulin heavy chain variable region [Mus musculus], GenBank, Accession No. ABY61978, 19.2 月 2008 (19.02.2008)	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件		“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		“&” 同族专利的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期 18.2 月 2009 (18.02.2009)	国际检索报告邮寄日期 19.3 月 2009 (19.03.2009)	
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	授权官员 于群 电话号码: (86-10) 62411103	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2008/001963

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列表(接第1页第1(b)项)

1、关于国际申请中所公开的是对要求保护的发明所必要的核苷酸和/或氨基酸序列表,国际检索是在下列基础上进行的:

a. 材料的类型

 序列表 与序列表相关的表格

b. 材料的形式

 纸件形式 电子形式

c. 提交/提供时间

 包括于已提交的国际申请。 以电子形式与国际申请一起提交。 为检索之用随后提交本国际检索单位。

2、 另外,在提交/提供了多个序列表和/或与其相关的表格的版本或副本的情况下,提供了关于后提交的或附加的副本与已提交之国际申请中的序列表相同或未超出国际申请中序列表范围(如适用)的声明。

3. 补充意见

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2008/001963

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PY	QIAN W 等, anti-human CD34 mAb 4C8 immunoglobulin light chain variable region [Mus musculus], Accession No. ABY61979, GenBank, 19.2月 2008 (19.02.2008)	1-10
Y	李博华, 抗 CD3 人源化抗体的制备及生物学特性研究, CNKI—中国博士学位论文全文数据库, 1月 31日, 2003 参见第 44 页第 1 段—第 45 页第 1 段	1-10
A	李爱玲, 抗人 CD20 和 CD34 单抗的研制及其功能研究, CNKI—中国博士学位论文全文数据库, 1月 31日, 2003 参见第 57-60 页	1-10

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2008/001963	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101245108 A	20.08.2008	无	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2008/001963

续：国际专利分类(IPC)或国家分类和 IPC 两种分类：

C07K16/28 (2006.01) i

C012P21/08 (2006.01) i

G01N33/543 (2006.01) i

A61K39/44(2006.01) i

A61P7/06(2006.01) i

A61P35/00(2006.01) i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

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

- (72)発明者 クオ, ヤジュン
中華人民共和国 シャンハイ 2 0 1 2 0 3, ザンジャン ハイ - テック パーク, リビング ロード ナンバー 3 9 9
- (72)発明者 チエン, ウェイツウ
中華人民共和国 シャンハイ 2 0 1 2 0 3, ザンジャン ハイ - テック パーク, リビング ロード ナンバー 3 9 9
- (72)発明者 ホウ, シェン
中華人民共和国 シャンハイ 2 0 1 2 0 3, ザンジャン ハイ - テック パーク, リビング ロード ナンバー 3 9 9
- (72)発明者 リ, ボファ
中華人民共和国 シャンハイ 2 0 1 2 0 3, ザンジャン ハイ - テック パーク, リビング ロード ナンバー 3 9 9
- (72)発明者 ワン, ハオ
中華人民共和国 シャンハイ 2 0 1 2 0 3, ザンジャン ハイ - テック パーク, リビング ロード ナンバー 3 9 9
- (72)発明者 マ, ジン
中華人民共和国 シャンハイ 2 0 1 2 0 3, ザンジャン ハイ - テック パーク, リビング ロード ナンバー 3 9 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA07 DA02 EA04
4B063 QA01 QA18 QQ08 QR48 QS33 QX10
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90X AC20 BA25 BD14 CA44
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA50 DA76 EA34 EA61 FA74