(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2010-512790
(P2010-512790A)
(43)公表日　平成22年4月30日(2010.4.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA	4B064
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C085
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 93 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-542902 (P2009-542902)
(86)(22)出願日　平成19年12月20日 (2007.12.20)
(85)翻訳文提出日　平成21年8月7日 (2009.8.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/025975
(87)国際公開番号　WO2008/079246
(87)国際公開日　平成20年7月3日 (2008.7.3)
(31)優先権主張番号　60/876,109
(32)優先日　平成18年12月21日 (2006.12.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　502066649
メダレックス，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニュージャージー　０８５４０，　プリンストン，　ステイト　ロード　７０７
(71)出願人　593141953
ファイザー・インク
アメリカ合衆国１００１７ニューヨーク州ニューヨーク市イースト・フォーティーセカンド・ストリート２３５
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100105290
弁理士　三輪　昭次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ４４抗体

(57)【要約】
本発明は、ＣＤ４４に結合し、そしてＣＤ４４を阻害する機能を果たす、ヒト抗体及びその抗原結合部分を含む抗体に関する。本発明は、また、ヒトＣＤ４４抗体に由来する重鎖及び軽鎖免疫グロブリン、及びそのような免疫グロブリンをコードする核酸分子に関する。本発明は、また、ヒトＣＤ４４抗体を作製する方法、これらの抗体を含む組成物、及び治療のために抗体及び組成物又は薬剤を使用する方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）配列番号１７に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号１９に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、そして配列番号２１に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３；
ｂ）配列番号５３に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号５５に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、そして配列番号５７に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３；
ｃ）配列番号８９に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号９１に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、そして配列番号９３に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３；及び
ｄ）配列番号１２５に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号１２７に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、そして配列番号１２９に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３；
から成る群から選択される、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３領域を含む重鎖可変（Ｖ$_H$）ドメインアミノ酸配列を含む、ヒトＣＤ４４に特異的に結合する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分。
【請求項２】
ａ）配列番号２３に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号２５に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、そして配列番号２７に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３；
ｂ）配列番号５９に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号６１に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、そして配列番号６３に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３；
ｃ）配列番号９５に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号９７に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、そして配列番号９９に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３；及び
ｄ）配列番号１３１に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号１３３に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、そして配列番号１３５に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３；
から成る群から選択される、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３領域を含む軽鎖可変（Ｖ$_L$）ドメインアミノ酸配列を更に含む、請求項１に記載の単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分。
【請求項３】
配列番号１７に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号１９に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、配列番号２１に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３、配列番号２３に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号２５に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、及び配列番号２７に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３を含む、請求項２に記載の単離された抗体又はその抗原結合部分。
【請求項４】
配列番号８９に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号９１に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、配列番号９３に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３、配列番号９５に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号９７に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、及び配列番号９９に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３を含む、請求項２に記載の単離された抗体又はその抗原結合部分。
【請求項５】
Ｖ$_H$ドメインアミノ酸配列が、配列番号１１、４７、８３及び１１９から成る群から選択され、又は保存的アミノ酸置換を有することにより配列番号１１、４７、８３及び１１９のうちのいずれか１つと異なる、請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項６】
アミノ酸配列において、配列番号１１、４７、８３及び１１９のうちのいずれか１つに少なくとも９５％同一であるＶ$_H$ドメインを含む、請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項７】
Ｖ$_L$ドメインアミノ酸配列が、配列番号１５、５１、８７及び１２３から成る群から選択され、又は保存的アミノ酸置換を有することにより配列番号１５、５１、８７及び１２３のうちのいずれか１つと異なる、請求項２に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項８】
アミノ酸配列において、配列番号１５、５１、８７及び１２３のうちのいずれか１つに少なくとも９５％同一であるＶ$_L$ドメインを含む、請求項２に記載の抗体又はその抗原結

合部分。
【請求項９】
（V_H）ドメインアミノ酸配列及び（V_L）ドメインアミノ酸配列が、
ａ）配列番号１１に示されるV_Hドメイン及び配列番号１５に示されるV_Lドメイン；
ｂ）配列番号４７に示されるV_Hドメイン及び配列番号５１に示されるV_Lドメイン；
ｃ）配列番号８３に示されるV_Hドメイン及び配列番号８７に示されるV_Lドメイン；及び
ｄ）配列番号１１９に示されるV_Hドメイン及び配列番号１２３に示されるV_Lドメイン；
から成る群から選択される、請求項７に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項１０】
配列番号１１に示されるV_Hドメイン及び配列番号１５に示されるV_Lドメインを含む、請求項９に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項１１】
配列番号８３に示されるV_Hドメイン及び配列番号８７に示されるV_Lドメインを含む、請求項９に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項１２】
ａ）配列番号９に示される重鎖、及び配列番号１３に示される軽鎖；
ｂ）配列番号４５に示される重鎖、及び配列番号４９に示される軽鎖；
ｃ）配列番号８１に示される重鎖、及び配列番号８５に示される軽鎖；及び
ｄ）配列番号１１７に示される重鎖、及び配列番号１２１に示される軽鎖；
から成る群から選択される重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列を含む、ＣＤ４４に特異的に結合する単離されたヒト抗体。
【請求項１３】
配列番号９に示される重鎖及び配列番号１３に示される軽鎖を含む、請求項１２に記載の単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分。
【請求項１４】
配列番号９に示される重鎖及び配列番号１３に示される軽鎖を含む、請求項１２に記載の単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分。
【請求項１５】
ＩｇＧである、請求項９に記載の抗体。
【請求項１６】
ＩｇＧがIgG_2である、請求項１５に記載の抗体。
【請求項１７】
請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分、及び場合により薬学的に許容される担体を含む薬剤組成物。
【請求項１８】
請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分の有効量を対象に投与する工程を含む、抗ＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分を用いて、それを必要とする対象のＣＤ４４媒介疾患の症状を治療、予防又は軽減する方法。
【請求項１９】
ＣＤ４４媒介疾患が炎症性又は自己免疫疾病である、請求項１７に記載の治療方法。
【請求項２０】
疾患が関節リウマチ、若年性関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、肉芽腫性疾患、多発性硬化症、喘息、クローン病、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、尋常性乾癬及びがんから成る群から選択される、請求項１８に記載の治療方法。
【請求項２１】
請求項１に記載の抗体の重鎖又はその抗原結合部分及び／又は軽鎖又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。
【請求項２２】

ベクターが場合により核酸分子に機能可能に連結した発現制御配列を含む、請求項２１に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項２３】
請求項２２に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項２４】
ハイブリドーマが、２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２.（ＡＴＣＣ　Ｎｏ.ＰＴＡ－６９２９）（ＬＮ１５９２０）、１Ａ９.Ａ６.Ｂ９（ＡＴＣＣ　Ｎｏ.ＰＴＡ－６９２７）（ＬＮ１５９２２）及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４.（ＡＴＣＣ　Ｎｏ.ＰＴＡ－６９２８）（ＬＮ１５９２１）から成る群から選択される、請求項１に記載のヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。
【請求項２５】
ハイブリドーマが、１Ａ９.Ａ６.Ｂ９（ＡＴＣＣ　Ｎｏ.ＰＴＡ－６９２７）（ＬＮ１５９２２）である、請求項２４に記載のハイブリドーマ細胞系。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連特許及び特許出願への相互参照
本出願は、２００６年１２月２１日に出願された米国仮出願第６０／８７６１０９号の利益を請求する。本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本発明は、ヒトＣＤ４４に結合する抗体及びその抗原結合部分に関する。本発明は、また、そのような抗体及び抗原結合部分をコードする核酸分子、ＣＤ４４抗体及び抗原結合部分の作製方法、これらの抗体又はその抗原結合部分を含む組成物並びに抗体、抗原結合部分、及び組成物又は薬剤を治療のために使用する方法にも関する。
【背景技術】
【０００３】
例えば、身体損傷、感染又は免疫応答によって引き起こされる体液の局所的蓄積である炎症は、単球及びＴ細胞などの炎症細胞の細胞外マトリックスへの動員によって開始される（非特許文献１）。この細胞動員は、典型的にはＴＮＦ－α、ＩＬ－６及びＩＬ－１βなどのサイトカインの、細胞外マトリックスへの更なる浸潤と増加をもたらす（同上）。このような細胞の動員と浸潤は、例えば、増殖の調節、接着、分化、侵入及び生存などの様々な他の細胞過程と共に、接着受容体のスーパーファミリーとしての膜貫通糖タンパク質細胞接着分子によって媒介される。細胞接着受容体ファミリーのメンバーには、広範に分布しているクラスＩ膜貫通糖タンパク質であるＣＤ４４が含まれる。ＣＤ４４は、接着、移動、活性化及び生存を含み、様々な細胞挙動において重要な役割を果たしている（非特許文献２）。
【０００４】
ＣＤ４４の分子量は８０から９０ｋＤａの範囲であり、また差示的オルタナティブスプライシングにより、８００に近い変異型アイソフォームを生成する可能性がある（非特許文献３）。現在、数十のアイソフォームが知られている。ＣＤ４４は白血球、線維芽細胞、上皮細胞、角化細胞及び幾つかの内皮細胞を含む多くの細胞型に遍く発現しており、最も豊富に発現するアイソフォームである、いずれの変異型エキソンも欠く標準ＣＤ４４（ＣＤ４４ｓ）型を有している。
【０００５】
ＣＤ４４は、その一次リガンドである、親水性、線状、細胞外多糖類のヒアルロナン又はヒアルロン酸（ＨＡ）と一緒に、炎症において主要な役割を担っている（非特許文献１及び４）。例えば、インビボ研究では、ＣＤ４４媒介ＨＡ結合活性を誘導するモノクローナル抗ＣＤ４４抗体、ＩＲＡＷＢ１４は、プロテオグリカン誘発関節炎マウスにおいて炎症症状の憎悪を引き起こした（非特許文献５）。
【先行技術文献】

【非特許文献】
【０００６】
【非特許文献１】Naor, D. et al., (2003) Arthritis Res Ther, 5:105-115
【非特許文献２】Ponta, H. et al., (2003) Molecular Cell Biology, 4:33-45
【非特許文献３】Cichy, J. et al., (2003) Journal of Cell Biology, 161:5, 839-843
【非特許文献４】Aruffo, A. (1990) Cell 61, 1301-1313
【非特許文献５】Pure, E. et al., (2001) TRENDS in Molecular Medicine, 7:213-221
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
本発明によれば、ＣＤ４４を特異的に結合し、またＣＤ４４アンタゴニストとして作用し得る単離された抗体又はその抗原結合部分、及び該抗体又はその抗原結合部分を含む組成物又は薬剤が提供される。本発明の別の側面によれば、抗体又は抗原結合部分がヒト抗体である、本明細書に記載の任意の該抗体又はその抗原結合部分が提供される。更なる側面では、該抗体又は抗原結合部分はヒト組換抗体である。
【０００８】
本発明によれば、（ｉ）重鎖及び／又は軽鎖、又は（ｉｉ）その可変ドメイン、又は（ｉｉｉ）その抗原結合部分、又は（ｉｖ）その相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むＣＤ４４を特異的に結合する抗体が提供される。
【０００９】
さらに、本発明によれば、抗体又はその抗原結合部分が、以下のａ）からｇ）に記載される少なくとも１つの機能特性を有する、ＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分が提供される。
ａ）表面プラズモン共鳴によって測定して、１０００ｎＭ以下のK_DでＣＤ４４に結合する；
ｂ）表面プラズモン共鳴によって測定して、０．０１$^{s^{-1}}$より小さいか又は等しいＣＤ４４に対するオフレート（ｏｆｆ　ｒａｔｅ）（K_{off}）を有する；
ｃ）ＦＡＣＳ又はＥＬＩＳＡ結合アッセイによって測定して、５００ｎＭ、７５μｇ／ｍｌより小さいEC_{50}でＣＤ４４に結合する；
ｄ）ＥＬＩＳＡ結合アッセイによって測定して、５００ｎＭ、７５μｇ／ｍｌより小さいIC_{50}でＣＤ４４及びＨＡ間の相互作用を抑制する；
ｅ）ＦＡＣＳによって測定して、約１００ｎＭより小さいIC_{50}で、Ｄ３+　Ｔ細胞などの炎症細胞におけるＣＤ４４受容体のインビボ表面発現を減少させる；
ｆ）インビトロにおいて５０ｎＭより小さいIC_{50}で、ＣＤ４４受容体の表面発現を減少させる；
ｇ）リンパ管内皮ヒアルロナン受容体１タンパク質（ＬＹＶＥ－１）を、少なくとも１００倍を超えてＣＤ４４への選択性を有する。
【００１０】
別の実施態様では、本発明は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分のいずれかをコードする、ヌクレオチド配列を含む分離核酸分子を提供する。１つの特別の実施態様では、本発明は、本明細書に記載の配列番号のいずれかに記載されるヌクレオチド配列を含む分離核酸分子を提供する。本発明は、更に本明細書に記載の核酸分子のいずれかを含むベクターを提供するが、その場合、ベクターは、場合により、核酸分子に機能可能に連結した発現調節配列を含む。
【００１１】
別の実施態様は、本明細書に記載のベクターのいずれかを含む又は本明細書に記載の核酸分子のいずれかを含む宿主細胞を提供する。本発明は、また、本明細書に記載の抗体又は抗原結合部分のいずれかを産生する、又は該抗体又は該抗原結合部分のいずれかの重鎖又は軽鎖を産生する、単離された細胞系を提供する。
【００１２】

別の実施態様では、本発明は、適切な条件下に本明細書に記載の宿主細胞又は細胞系のいずれかを培養すること、そして抗体又はその抗原結合部分を回収することを含む、該ＣＤ４４抗体又は該抗原結合部分を産生する方法を提供する。

【００１３】

本発明は、非ヒトトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物が本明細書に記載の核酸を発現する、該核酸のいずれかを含む非ヒトトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物をも提供する。

【００１４】

本発明は、更に、本明細書に記載の非ヒトトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物からの抗体を単離する工程を含む、ＣＤ４４に結合する抗体又はその抗原結合部分を単離する方法を提供する。

【００１５】

本発明は、（ｉ）前記ＣＤ４４抗体、又はそれらをコードする核酸分子の、重鎖及び／又は軽鎖、その可変ドメイン若しくはその抗原結合部分、又はそのＣＲＤ；及び（ｉｉ）薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。本発明の組成物は、更に治療薬又は診断薬などの別の成分を含んでもよい。

【００１６】

本発明は、また、本明細書に記載の任意の抗体又はその抗原結合部分、そして場合により、結合した又は懸濁状態の薬学的に許容される担体を含む薬剤組成物又は薬剤を提供する。本発明の組成物は、更に治療薬又は診断薬などの別の成分を含んでもよい。

【００１７】

診断及び治療方法も、また、本発明によって提供される。

【００１８】

本発明は、また、それが必要な哺乳動物において、本明細書に記載の任意の抗体又はその抗原結合部分、又は薬剤組成物のいずれかを該哺乳動物に投与する工程を含む、炎症性細胞浸潤又は動員の治療方法を提供する。

【００１９】

本発明の別の側面は、前記抗体又は抗原結合部分がヒト抗体である、本明細書に記載の任意の抗体又はその抗原結合部分を提供する。更なる側面では、該抗体又は抗原結合部分はヒト組換抗体である。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１】免疫グロブリン（ＩｇＧ）の略図である。

【図２ａ】対応する重鎖及び軽鎖遺伝子の生殖細胞系のアミノ酸配列との、単離された抗ＣＤ４４モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインの予想アミノ酸配列の配列アラインメントである。クローンと生殖細胞系配列間の同一残基はダッシュ記号で示し、欠失／挿入はナンバー記号（hash mark）で示し、変異を掲記し、またＣＤＲに下線を引いてある。

【図２ｂ】対応する重鎖及び軽鎖遺伝子の生殖細胞系のアミノ酸配列との、単離された抗ＣＤ４４モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインの予想アミノ酸配列の配列アラインメントである。クローンと生殖細胞系配列間の同一残基はダッシュ記号で示し、欠失／挿入はナンバー記号（hash mark）で示し、変異を掲記し、またＣＤＲに下線を引いてある。

【図２ｃ】対応する重鎖及び軽鎖遺伝子の生殖細胞系のアミノ酸配列との、単離された抗ＣＤ４４モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインの予想アミノ酸配列の配列アラインメントである。クローンと生殖細胞系配列間の同一残基はダッシュ記号で示し、欠失／挿入はナンバー記号（hash mark）で示し、変異を掲記し、またＣＤＲに下線を引いてある。

【図２ｄ】対応する重鎖及び軽鎖遺伝子の生殖細胞系のアミノ酸配列との、単離された抗ＣＤ４４モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインの予想アミノ酸配列の配列アラ

インメントである。クローンと生殖細胞系配列間の同一残基はダッシュ記号で示し、欠失／挿入はナンバー記号（hash mark）で示し、変異を掲記し、またＣＤＲに下線を引いてある。

【図３】ＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質へのＨＡの結合をブロックする、抗ＣＤ４４１Ａ９.Ａ６.Ｂ９抗体を説明するグラフである。

【図４Ａ】フローサイトメトリーソーティング（ＦＡＣＳ）により分析して、細胞への抗ＣＤ４４抗体の結合を示すグラフである。　ＦＡＣＳで分析して、ヒト全血Ｔ細胞への、抗ＣＤ４４　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４抗体の結合を説明するグラフである。

【図４Ｂ】フローサイトメトリーソーティング（ＦＡＣＳ）により分析して、細胞への抗ＣＤ４４抗体の結合を示すグラフである。　ＦＡＣＳで分析して、カイニクイザル全血Ｔ細胞への、抗ＣＤ４４　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４抗体の結合を説明するグラフである。

【図４Ｃ】フローサイトメトリーソーティング（ＦＡＣＳ）により分析して、細胞への抗ＣＤ４４抗体の結合を示すグラフである。　ＦＡＣＳで分析して、ヒト及びｃｙｎｏＣＤ４４で形質導入した３００－１９細胞への、抗ＣＤ４４抗体の結合を説明するグラフである。

【図５】ＥＬＩＳＡ分析で測定して、ヒト及びｃｙｎｏＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質を用いる、抗ＣＤ４４　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９抗体の結合試験を説明するグラフである。

【図６】ＥＬＩＳＡを用いて定量して、リポ多糖類（ＬＰＳ）及びＨＡにより刺激した、ヒト全単球からのＩＬ－１βの放出をブロックする抗ＣＤ４４　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４抗体を説明するグラフである。

【図７】ＦＡＣＳで測定して、ＣＤ３+末梢Ｔ細胞上のＣＤ４４受容体の表面発現を減少させる、抗ＣＤ４４　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４抗体を示すグラフである。

【図８】Ａは抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９による、ヒト末梢白血球（リンパ球）上のＣＤ４４受容体の表面発現の減少を示すグラフである。Ｂは抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９による、ヒト末梢白血球（単球）上のＣＤ４４受容体の表面発現の減少を示すグラフである。Ｃは抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９による、ヒト末梢好中球（ＰＭＮ）上のＣＤ４４受容体の表面発現の減少を示すグラフである。

【図９】Ａ及びＢは、ＦＡＣＳを用いて定量して、カニクイザルへ投与した抗ＣＤ４４　１Ａ９.Ａ６.Ｂ６抗体の単回投与インビボ試験を説明するグラフを示す。

【図１０】ＡはＦＡＣＳを用いて定量して、ヒト末梢Ｔ細胞を用いる抗ＣＤ４４抗体ＭＥＭ８５との直接競合で、抗ＣＤ４４　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９の結合を説明するグラフである。ＢはＦＡＣＳを用いて定量して、実施例１に記載のヒトＣＤ４４でトランフェクトした３００－１９細胞を用いる、抗ＣＤ４４抗体ＭＥＭ８５との直接競合で抗ＣＤ４４　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９の結合を説明するグラフである。

【図１１ａ】ＳＥ－ＨＰＬＣで測定して、５℃で生成した本発明の凝集体（高分子量種（ＨＭＭＳ））を説明するグラフである。

【図１１ｂ】ＳＥ－ＨＰＬＣで測定して、２５℃で生成した本発明の凝集体（高分子量種（ＨＭＭＳ））を示すグラフである。

【図１１ｃ】ＳＥ－ＨＰＬＣで測定した、４０℃で生成した本発明の凝集体（高分子量種（ＨＭＭＳ））を説明するグラフである。

【図１２ａ】ｉＣＥで測定して、５℃で生成した総酸種を示すグラフである。

【図１２ｂ】ｉＣＥで測定して、２５℃で生成した総酸種を示すグラフである。

【図１２ｃ】ｉＣＥで測定して、４０℃で生成した総酸種を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

定義

本明細書及び特許請求の範囲を通して、用語「含む」（“comprise”）、又は「含む」

（“comprises”）若しくは「含んでいる」（“comprising”）などの変形は、当然ながら記載された整数又は整数群の包含を含意するが、他のいかなる整数又は整数のグループを除外するものではない。

【００２２】

本明細書に他に定義されていない限り、本発明との関連で使用される科学及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。更に、文脈上他の必要がない限り、単数の用語は複数を含み、複数の用語は単数を含むものとする。一般的に、細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学及びタンパク質及び核酸化学及びハイブリダイゼーションに関連して、本明細書で使用される命名法は、当該分野で一般に使用されているものである。

【００２３】

基本的な抗体構造単位は、四量体を含むことが知られている。各四量体はポリペプチド鎖の２つの相同対から構成され、各対は１つの「軽い」（約２５ｋＤａ）及び「重い」鎖（約５０～７０ｋＤａ）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識に関与する約１００から１２０又はそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主としてエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、カッパ及びラムダ軽鎖と分類される。重鎖はミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、又はイプシロンと分類され、そして抗体イソタイプをそれぞれＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、及びＩｇＥと定義する。軽鎖及び重鎖の中で、可変及び定常領域は、約１２又はそれ以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって連結され、重鎖は、また、約３又はそれ以上のアミノ酸の「Ｄ」領域を含む。一般的には、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989) を参照されたい。各重鎖／軽鎖対（V_H及びV_L）の可変領域は、それぞれ抗体結合部位を形成する。このように、例えば、インタクトＩｇＧ抗体は２つの結合部位を有する。二機能性及び二重特異性抗体を除いて、２つの結合部位は同じである。

【００２４】

重鎖及び軽鎖の可変領域は、３つの超可変領域によって連結された比較的保存性のフレームワーク領域（ＦＲ）の同じ一般構造を示し、また相補性決定領域又はＣＤＲとも呼ばれる。用語「可変の」は、可変ドメインの特定の部分が抗体の間で配列が広範に異なり、そしてその特定の抗原に対する各々特定の抗体の結合及び特異性に使用されるという事実をいう。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメイン全体に均等に分布されず、より高保存ＦＲによって分けられるＣＤＲに集中する。各対の２つの鎖由来のＣＤＲはＦＲによってアライン（ａｌｉｇｎｅｄ）され、特異的エピトープに結合することが可能である。Ｎ末端からＣ末端まで、軽鎖及び重鎖のいずれも、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３Ｆ及びＲ４ドメインを含む。各ドメインのアミノ酸の割り当ては、免疫学的関連タンパク質のＫａｂａｔ配列（National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)）、又は Chothia & Lesk (1987), J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al. (1989), Nature 342: 878-883の定義に従っている。本明細書で使用される、数によって言及される抗体は、同じ数のハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体と同じである。例えば、モノクローナル抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９は、ハイブリドーマ１Ａ９.Ａ６.Ｂ９から得られるものと同じ抗体であるか、又はそのサブクローンである。本明細書で使用されるＦｄフラグメントは、V_H及びC_H1ドメインから成る抗体フラグメントを意味する；ＦｖフラグメントはＦｖの単アームのV_H及びC_H1ドメインから成り；そしてｄＡｂフラグメント(Ward et al., (1989), Nature 341: 544-546）はV_Hドメインから成る。

【００２５】

幾つかの実施態様では、抗体は、V_L及びV_Hドメインが単一タンパク質鎖としてそれらを作ることができる合成リンカーを介する、一価の分子を形成するように組み合わされた、単一鎖抗体（ｓｃＦｖ）である（Bird et al., (1988), Science 242: 423-426, Huston et al., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883）。幾つかの実施態様で

は、抗体は、二重特異性抗体、即ち、そこではV_H及びV_Lドメインは単一ポリペプチド鎖上に発現するが、同じ鎖上で２ドメイン間で対形成するには短すぎるためにリンカーを用い、それにより別の鎖の相補ドメインと強制的にペアを組ませ、そして２つの抗原結合部位を作出する二価抗体である（例えば、Holliger P. et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, Poljak R. Et al., (1994), Structure 2: 1121-1123を参照）。１つの実施態様では、本発明の抗体の１つ又はそれ以上のＣＤＲは、ＣＤ４４に特異的に結合するイムノアドヘシンとなるように、共有結合か又は非共有結合で分子に組み込むこともできる。そのような実施態様では、ＣＤＲは大きなポリペプチド鎖の一部として組み込まれ、別のポリペプチド鎖と共有結合し、又は非共有結合的に組み込まれると考えられる。

【００２６】

１つ又はそれ以上の結合部位を有する抗体の実施態様では、結合部位はお互いに全く同一であっても、又は異なっていてもよい。

【００２７】

本明細書で使用される「アナログ」又は「ポリペプチドアナログ」の用語は、特定の参照アミノ酸配列と実質的な同一性を有し、また実質的に参照アミノ酸配列と同じ機能又は活性を有するセグメントを含むポリペプチドを指す。一般的に、ポリペプチドアナログは、参照配列に関して保存的アミノ酸置換（又は挿入又は欠失）を含む。アナログは少なくとも２０又は２５のアミノ酸長であり、又は少なくとも５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０又は２００のアミノ酸長又はそれ以上の長さであり、そしてしばしば完全長ポリペプチドと同じ長さであってもよい。本発明の幾つかの実施態様は、生殖細胞系アミノ酸配列由来の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７の置換を有する、ポリペプチドフラグメント又はポリペプチドアナログ抗体を含む。抗体又は免疫グロブリン分子のフラグメント又はアナログは、当業者により本明細書の教示に従って容易に調製することができる。

【００２８】

１つの実施態様では、ＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分へのアミノ酸置換は、（１）タンパク質分解に対する感受性を低下させ、（２）酸化に対する感受性を低下させ、（３）タンパク質複合体を形成する結合親和性を変え、（４）そのようなアナログの他の物理化学的又は機能特性を付与し又は改変するものであるが、なおＣＤ４４への特異的結合を保持する。アナログ類は通常起こるペプチド配列への種々の置換を含むことができる。例えば、単一又は多重アミノ酸置換、好ましくは保存的アミノ酸置換は、通常起こる配列において、例えば分子間接触を形成するドメイン外のポリペプチドの部分で行われ得る。アミノ酸置換は、またポリペプチドの活性を改善し得る分子間接触を形成するドメインにおいても行われ得る。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造特性を実質的に変えないものとなる；例えば、置換アミノ酸は、親配列に起こる免疫グロブリン結合ドメインを作製する逆平行βシートを変化させず、又は親配列を特徴付ける他のタイプの二次構造を破壊しないものとなる。一般に、グリシン及びプロリンは逆平行βシートに使用されない。業界で認識されているポリペプチド二次及び三次構造の例は、以下の文献に記載されている（Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)、「タンパク質、構造及び分子原理（Proteins, Structures and Molecular Principles）」、C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)「タンパク質構造概論（Introduction to Protein Structure ）」、Thornton et al., (1991) Nature 354:105）。

【００２９】

本明細書で使用される、「抗体」の用語は免疫グロブリンと同義語であり、また当然のことながら、業界で周知である。特に、抗体の用語は抗体を製造する如何なる特定の方法によっても限定されない。例えば、抗体の用語は、とりわけ、組換え抗体、モノクローナル抗体、及びポリクローナル抗体を含む。

【００３０】

本明細書に使用される、抗体の「抗原結合部分」（又は簡単に「抗体部分」又は「部分

」）の用語は、抗原（例えば、ＣＤ４４）に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ又はそれ以上のフラグメントを指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体のフラグメントによって行なえることが示されている。抗体の「抗原結合部分」なる用語に包含される結合フラグメントの例は、(ｉ)V_L、V_H、C_L及びC_H1ドメインから成る一価フラグメント；(ｉｉ)ヒンジ領域でジスルフィド架橋で結合した２Ｆａｂフラグメントを含む二価フラグメント、Ｆ（ａｂ′）$_2$フラグメント：（ｉｉｉ）V_H及びC_H1ドメインから成るＦｄフラグメント；（ｉｖ）抗体の単一アームのV_L及びV_Hドメインから成るＦｖフラグメント；（ｖ）V_Hドメインから成るｄＡｂフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341: 544 546）；そして（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）、を含む。更に、Ｆｖフラグメント、V_L及びV_Hの２ドメインは別々の遺伝子によりコードされるが、それらは、組換法を用いて、V_L及びV_H領域が一価分子（単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として公知である）を形成するように組み合わせて、単一タンパク質鎖としてそれらを作製し得る合成リンカーにより連結され得る；例えば、以下の文献を参照されたい（Bird et al., (1988) Science 242: 423 426, Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 5883）。そのような単鎖抗体は、また、抗体の「抗原結合部分」なる用語に包含されるものとする。二重特異性抗体などの他の型の単鎖抗体も包含される。二重特異性抗体は二価であり、V_H及びV_L領域が単一ポリペプチド鎖に発現する二重特異性抗体であるが、同一鎖の２ドメイン間で対にすることを可能にするには短すぎるためにリンカーを用い、それによりドメインを別の鎖の相補性領域とペアを組むように強制し、そして２つの抗原部位を作出する(例えば、以下の文献を参照されたい（Holliger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 6448, Poljak R. J. et al., (1994) Structure 2: 1121-1123)）。

【００３１】

なお更には、抗体又はその抗原結合部位は、１つ又はそれ以上のタンパク質又はペプチドを有する抗体又は抗体部分の共有結合性又は非共有結合性会合により形成される、大きな免疫接着分子の１部であってもよい。そのような免疫接着分子の例は、四量体のｓｃＦｖ分子(Kipriyanov et al., (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101）を作るストレプトアビジンコア領域の使用、並びにシステイン残基マーカーペプチド及び二価のビオチン化ｓｃＦｖ分子（Kipriyanov et al., (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058）を作るＣ末端ポリヒスチジンタグの使用を含む。他の例は、１つの抗体由来の１つ又はそれ以上のＣＤＲが、ＣＤ４４などの関係する抗原に特異的に結合してイムノアドヘシンにするために、共有結合性か又は非共有結合性に分子に組み込まれる場合を含む。そのような実施態様では、ＣＤＲは大きなポリペプチド鎖の一部として組み込まれても、別のポリペプチド鎖に共有結合されても、又は非共有結合性に組み込まれてもよい。Ｆａｂ及びＦ（ａｂ′）$_2$フラグメントなどの抗体部分は、全抗体のそれぞれパパイン又はペプシン消化などの従来技術を用いて、全抗体から調製し得る。その上、抗体、抗体部分及び免疫接着分子は、本明細書に記載の標準的な組換えＤＮＡ法を用いて得ることができる。

【００３２】

特に他の指示のない限り、「ＣＤ４４」の用語はヒトＣＤ４４を指す。ＣＤ４４は、多重構造の細胞外マトリックス受容体、並びに細胞－細胞及び細胞－マトリックス活性を調節する膜貫通糖タンパク質の古典的ファミリーの１メンバーである。ヒトＣＤ４４のクローニング及び配列は、例えば、Arrofo, A. (1990) Cell, 16. (Accession No. NM_001001391)に報告され、また配列番号１に示される。ＣＤ４４の用語は、標準的な組換え発現法で調製することができ、又は市販購入可能な、組換えヒトＣＤ４４及びＣＤ４４の組換えキメラ型を含むものとする(例えば、 R&D Systems、カタログ番号８６１－ＰＣ－１００)。特に、ＣＤ４４は、２０エキソンを含む単一６０ｋｂ遺伝子によりコードされる、８０～９０ｋＤａのグリコール化Ｉ型膜貫通タンパク質である。２０エキソンのうち１０は（標準エキソン１ｓから１０ｓまで）、ＣＤ４４陽性細胞に発現し、そして「標準ＣＤ４４」又は「ＣＤ４４ｓ」をコードする。他の１０エキソン（変異エキソン１ｖから１０ｖまで）はオルタナティブスプライシングにかけられ、そしてＣＤ４４の細胞外ドメインに挿

入されるペプチド配列をコードする。「ＣＤ４４の細胞外ドメイン」なる用語は、３ジスルフィド結合により安定化されるＮ末端球状領域を含み、また線形構造により細胞膜から隔てられ、そしてほぼ２４７の残基長であって、配列番号３に示される(Gadhoum Z. et al., (2004) Leukemia & Lymphoma 45(8): 1501-1510）。このトリージスルフィド結合ラダーは、ＣＤ４４の細胞外ドメイン内にあるヒアルロン酸（ＨＡ、ヒアルロン酸塩、ヒアルロナン）結合ドメイン「ＨＡ結合ドメイン」を示す球状領域を含み、またほぼ１００残基長の「連結モジュール」を含む（ＣＤ４４の細胞外ドメインの３２～１２３残基で、配列番号５に示される）。「ＨＡ結合領域」は更に、少なくともＬｙｓ３８、Ａｒｇ４１、Ｔｙｒ４２、Ａｒｇ７８、Ｔｙｒ７９、Ａｓｎ１００、Ａｓｎ１０１、Ａｒｇ１５０、Ａｒｇ１５４及びＡｒｇ１６２アミノ酸残基を含むことで特徴付けられる（Teriete P. et al., (2004) Molecular Cell, 13, 483-496）。

【００３３】

本明細書で使用される「キメラ抗体」の用語は、異なった種由来の抗体を含む、２つ又はそれ以上の異なる抗体由来の領域を含む抗体を意味する。例えば、キメラ抗体の１つ又はそれ以上のＣＤＲは、ヒトＣＤ４４抗体から由来することもあり得る。１つの例では、ヒト抗体由来のＣＤＲは、マウス又はラットなどの非ヒト抗体由来のＣＤＲと組み合わせることが可能である。別の例では、全てのＣＤＲはヒトＣＤ４４抗体から導くことができる。別の例では、１つ以上のヒトＣＤ４４抗体由来のＣＤＲはキメラ抗体と組み合わせることが可能である。例えば、キメラ抗体は、第１ヒトＣＤ４４抗体の軽鎖由来のＣＤＲ１、第２ヒトＣＤ４４抗体の軽鎖由来のＣＤＲ２、及び第３ヒトＣＤ４４抗体の軽鎖由来のＣＤＲ３を含んでもよく、また重鎖由来のＣＤＲは、１つ又はそれ以上の他のＣＤ４４抗体から導くこともできる。更に、フレームワーク領域は、１つ又はそれ以上のＣＤＲが採られ又は１つ又はそれ以上の異なるヒト抗体由来のＣＤ４４抗体の１つから導くことができる。更に、「キメラ抗体」の用語は、組合せがヒト及び非ヒト抗体にかかわる上記の組合せのいずれをも含むものとする。

【００３４】

抗体について本明細書に使用される「競合する」の用語は、第１抗体、又はその抗原結合部分は、第２抗体、又はその抗原結合部分との結合を競合し、その場合、第１抗体のその同種エピトープとの結合は、第２抗体の不在下での第１抗体の結合に比べて、第２抗体の存在下で検出可能に減少する。第２抗体のそのエピトープへの結合も第１抗体の存在下で検出可能に減少する場合、その代わりとなるものはあり得るが、そうする必要はない。即ち、第１抗体は、第１抗体のそれぞれのエピトープへの結合を阻害するその第２抗体なしに、第２抗体のそのエピトープへの結合を阻害することができる。しかしながら、各抗体が、同程度に、高度又は低度であるにせよ、その同種エピトープ又はリガンドと他の抗体の結合を検出可能に阻害する場合に、抗体はそれらの各エピトープの結合に対して互いに「交差競合する」という。競合及び交差競合抗体の両方が本発明では包含される。そのような競合及び交差競合が起こる（例えば、立体障害、立体配座変化、又は共通エピトープ若しくはその部分への結合）メカニズムに無関係に、当業者には当然ながら、本明細書に示される教示に基づいて、そのような競合及び／又は交差競合抗体も包含され、本明細書に開示の方法に有用であり得る。

【００３５】

本明細書で用いられるように、「保存的アミノ酸置換」の用語は、アミノ酸残基が類似の化学的特性(例えば、電荷又は疎水性)を有する側鎖Ｒ基をもつ別のアミノ酸残基により置換されるものの１つである。一般的に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変えない。２つ又はそれ以上のアミノ酸配列が保存置換により相互に異なる場合には、百分率配列相同性は、置換の保存性を修正するように上方調整することができる。この調整をする手段は当業者でよく知られている。Pearson, (1994) Methods Mol. Biol. 243: 307-31。類似の化学的特性を有する側鎖を持つアミノ酸グループの例は、１）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン；２）脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリン及びトレオニン；３）アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミ

ン；４）芳香族側鎖；フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン；５）塩基性側鎖：リジン、アルギニン、及びヒスチジン；６）酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸；及び７）含硫側鎖：システイン及びメチオニン。保存的アミノ酸置換基は、例えば、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン、グルタミン酸塩－アスパラギン酸塩、及びアスパラギン－グルタミンであってよい。

【００３６】

保存的置換は、また、Gonnet et al., (1992) Science 256: 1443-45に開示されている、ＰＡＭ２５０対数尤度マトリックスにおいて正の値を有するいずれかの変化である。「適度に保存的な」置換は、ＰＡＭ２５０対数尤度マトリックスにおいて負ではない値を有するいずれかの変化である。

【００３７】

「接触」とは、本発明の抗体又はその抗原結合部分及び標的ＣＤ４４、又はそのエピトープを、抗体がＣＤ４４の生物活性に影響を与えるように合わせることを意味する。そのような「接触」は「インビトロ」、例えば、試験管内で、ペトリ皿内等で達成することができる。試験管内では、接触は、抗体又はその抗原結合部分及びＣＤ４４又はそのエピトープのみにかかわり、又はそれは全細胞にかかわり得る。細胞は、また、細胞培養皿中で維持され増殖もし、またその環境中で抗体又はその抗原結合部分と接触する。このような文脈において、特定の抗体又はその抗原結合部分のＣＤ４４関連疾患への影響力、即ち、抗体のIC_{50}は、より複雑な生命体によるインビボでの抗体の使用前に測定することができる。生物体外の細胞では、抗体又はその抗原結合部分とＣＤ４４を接触させる複数の方法が存在し、そして当業者によく知られている。

【００３８】

本明細書で使用される「ＥＬＩＳＡ」の用語は、酵素免疫測定法を指す。この分析法は当業者によく知られている。この分析法の例は、Vaughan, T.J. et al., (1996) Nat. Biotech. 14: 309-314、並びに本出願の実施例５、６、７及び１１に見出すことが可能である。

【００３９】

「エピトープ」なる用語は、免疫グロブリン若しくはＴ細胞受容体に特異的に結合し、又はその他に分子と相互作用することができるいずれかのタンパク質決定因子を含む。エピトープ決定因子は、一般にアミノ酸又は炭水化物又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面グルーピングから成り、そしてまた、一般に特異的３次元構造特性、並びに特異的電荷特性を有する。エピトープは、「線状」又は「立体配座的」であり得る。線状エピトープでは、タンパク質及び相互作用する分子(抗体など)との間の相互作用の全ての点が、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って線状に生じる。立体配座的エピトープでは、相互作用の点は互いに離れたタンパク質上のアミノ酸残基にわたって生じる。一方、抗原上の所望のエピトープがいったん決まると、そのエピトープに対する抗体は、例えば、本発明に記載の技術を用いて産生することができる。発見の過程において、抗体の産生と特徴付けは、所望のエピトープに関する情報を明らかにすることもできる。この情報から、次いで同じエピトープに結合する抗体を競合的にスクリーニングすることが可能である。これを達成するアプローチは、互いに競合的に結合する抗体を見出すための交差競合検討を行なうことであり、即ち、抗体は抗原への結合を競合する。それらの交差競合に基づいて抗体を「結合」するためのハイスループット方法は、ＰＣＴ国際公開第０３／４８７３１号に記載されている。

【００４０】

本明細書で使用される「発現制御配列」なる用語は、それらが連結されるコード配列の発現及びプロセシングをなし遂げるのに必要なポリヌクレオチド配列を意味する。発現制御配列は、適切な翻訳開始、終結、プロモーター及びエンハンサー配列；スプライシング及びポリアデニル化シグナルなどの効率的ＲＮＡプロセシングシグナル；細胞質ｍＲＮＡを安定化する配列；翻訳効率化を高める配列（即ち、Kozakコンセンサス配列）；タンパ

ク質安定性を高める配列；及び所望により、タンパク質分泌を促進する配列を含む。そのような制御配列の性質は、宿主生物によって異なる；原核生物では、そのような制御配列は、一般的にプロモーター、リボソーム結合部位、及び転写終結配列を含む；真核生物では、一般的にそのような制御配列はプロモーター及び転写終結配列を含む。「制御配列」の用語は、最小限、その存在が発現及びプロセシングに必須である全成分を含むものとし、そしてまた、その存在が有益な、例えばリーダー配列及び融合パートナー配列である、更なる成分を含むことができる。

【００４１】

本明細書に使用される、「生殖細胞系」なる用語は、親から子へ生殖細胞を経由して通過する抗体遺伝子及び遺伝子断片のヌクレオチド配列を指す。この生殖細胞系配列は、Ｂ細胞成熟の過程において組換え及び超変異事象により変化した成熟Ｂ細胞で抗体をコードするヌクレオチド配列と区別される。本発明の生殖細胞抗体は、ｇ－１Ａ９．Ａ６．Ｂ９、ｇ－２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２及びｇ－１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４と表わされる。

【００４２】

本明細書で使用される、「ヒト抗体」の用語は、可変及び定常ドメイン配列がヒト配列であるいずれかの抗体を意味する。この用語は、ヒト遺伝子由来の配列を有する抗体を包含し、例えば、可能な免疫原性を減少させ、親和性を増加させ、望ましくない折畳み等を引き起こすシステイン残基を除去するような、変化した抗体を含む。この用語は、また、ヒト細胞に特有ではないグリコシル化を与える可能性のある、非ヒト細胞において組換えで産生するそのような抗体を包含する。これらの抗体は、下記に示される様々な方法で製造することが可能である。

【００４３】

本明細書で使用される、「ヒト化抗体」の用語は、非ヒト起源の抗体を指し、この場合、ヒト以外の種の抗体配列に特徴的なアミノ酸残基が、ヒト抗体の対応位置に見出される残基で置換される。この「ヒト化」方法は、得られる抗体の人間での免疫原性を低下させると考えられる。当然のことながら、非ヒト起源の抗体はこの分野でよく知られた方法を用いてヒト化することができる。Winter et al., (1993) Immunol. Today 14: 43-46。関係する抗体は、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、及びヒンジドメイン及び／又はフレームワークドメインを対応するヒト配列で置換する、組換えＤＮＡ技術により設計することができる（ＰＣＴ国際公開第９２／０２１９０号、米国特許第５５３０１０１号、米国特許第５５８５０８９号、米国特許第５６９３７６１号、米国特許第５６９３７９２号、米国特許第５７１４３５０号及び米国特許第５７７７０８５号)。本明細書で使用される、「ヒト化抗体」の用語は、更にその意味の範囲内で、キメラヒト抗体及びＣＤＲグラフト化抗体を含む。本発明のキメラヒト抗体は、ヒト以外の種の抗体のV_H及びV_L、及びヒト抗体のC_H及びC_Lドメインを含む。本発明のＣＤＲ移植抗体は、ヒト以外の種の抗体の、それぞれV_H及びV_Lによる、ヒト抗体のV_H及びV_LのＣＤＲの置換をもたらす。

【００４４】

本明細書で使用される「単離されたポリヌクレオチド」は、ゲノム、ｃＤＮＡ若しくは合成起源のポリヌクレオチド、又はそれらの組合せを意味し、そしてその起源の故に、「単離されたポリヌクレオチド」は、（１）「単離されたポリヌクレオチド」がそれを有して天然に見出されるポリヌクレオチドの全体又は部分と関係せず、（２）それが天然では連結しないポリヌクレオチドに、機能可能に連結し、又は（３）大きな配列の一部として天然には存在しない。

【００４５】

「単離されたタンパク質」、「単離されたポリペプチド」又は「単離された抗体」の用語は、その起源又は発生源又は由来により、（１）自然状態でそれを伴う天然関連成分に関係せず；（２）同じ種由来の他のタンパク質が認められず；（３）異なる種由来の細胞により発現し；又は（４）本来は起こらない、タンパク質、ポリペプチド又は抗体である。このように、例えば、化学的に合成され又は天然起源の細胞と異なる細胞系で合成されるポリペプチドは、天然関連成分から「単離」されると思われる。タンパク質も、また、

業界でよく知られたタンパク質精製法を用いて、単離により実質的に天然関連成分がないようにすることができる。

【００４６】

単離されたタンパク質の例は、ＣＤ４４を用いて親和性精製されるＣＤ４４抗体、及びインビトロで細胞系によって合成されるＣＤ４４抗体を含む。

【００４７】

「インビトロ」は、例えば制限なく、試験管又は培養培地中などの人工環境中で行なわれる手順を指す。

【００４８】

「インビボ」は、制限なく、哺乳動物、例えばサル、ラット又はウサギなどの生物内で行なわれる操作を指す。

【００４９】

「K_D」の用語は、特定の抗体－抗体相互作用の結合親和性平衡定数を指す。抗体は、K_Dが≦１ｍＭ、好ましくは≦１００ｎＭ、及び最も好ましくは≦１０ｎＭの場合に、抗原を特異的に結合するといわれている。K_D結合親和性定数は、例えば、実施例５で論じられるようにBIACORE^{TM}システムを用いて、表面プラズモン共鳴により測定できる。

【００５０】

「k_{off}」の用語は、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度定数を指す。k_{off}解離速度定数は、例えば、実施例５で論じられるようにBIACORE^{TM}システムを用いて、表面プラズモン共鳴によって測定できる。

【００５１】

本明細書で使用される「天然産のヌクレオチド」の用語は、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含む。本明細書で使用される「修飾ヌクレオチド」の用語は、例えば、修飾又は置換糖類を有するヌクレオチドを含む。本明細書でいう「オリゴヌクレオチド結合」の用語は、例えば、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホロセレノアート、ホスホロジセレノアート、ホスホロアニロチオアート、ホスホロアニラダート、ホスホロアミダートなどのオリゴヌクレオチド結合を含む。 LaPlanche et al., (1986) Nucl. Acids Res. 14: 9081; Stec et al., (1984) J. Am. Chem. Soc. 106: 6077; Stein et al., (1988) Nucl. Acids Res. 16: 3209; Zon et al., (1991) Anti Cancer Drug Design 6: 539; Zon et al., 「オリゴヌクレオチド及び類似体：実用的方法（Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach）」, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); 米国特許第５１５１５１０号; Uhlmann and Peyman, (1990), Chemical Reviews 90: 543。オリゴヌクレオチドは、所望により、検出用の標識を含むことができる。

【００５２】

「機能可能に連結した」配列は、対象とする遺伝子に隣接する発現制御配列、及び対象とする遺伝子に対してトランスに又はそれをコントロールする距離で作用する発現制御配列の両方を含む。

【００５３】

核酸配列との関連での「パーセント配列同一性」なる用語は、最大対応のためにアラインした場合に同じになる２配列中の残基を意味する。配列同一性比較の長さは、少なくとも約９ヌクレオチド、通常は少なくとも約１８ヌクレオチド、より通常は少なくとも約２４ヌクレオチド、一般的には少なくとも約２８ヌクレオチド、より一般的には少なくとも約３２ヌクレオチド、そして好ましくは少なくとも約３６、４８又はそれ以上のヌクレオチドのストレッチを超えてもよい。ヌクレオチド配列同一性を測定するのに使用できる、業界でよく知られた異なるアルゴリズムは多数存在する。例えば、ポリヌクレオチド配列は、Wisconsin Package Version 10.0、Genetics Computer Group(GCG), Madison、Wisconsinのプログラムである、ＦＡＳＴＡ、Ｇａｐ又はBestfitを用いて比較することができる。例えばＦＡＳＴＡ２及びＦＡＳＴＡ３プログラムを含むＦＡＳＴＡは、クエリー及びサーチ配列間の最良重複の領域のアラインメント及びパーセント配列同一性を与える(Pea

rson, (1990), Methods Enzymol. 183: 63-98; Pearson, (2000), Methods Mol. Biol. 132: 185-219; Pearson, (1996), Methods Enzymol. 266: 227-258; Pearson, (1998), J. Mol. Biol. 276: 71-84）。他の特定がない限り、特定のプログラム又はアルゴリズムに対する標準パラメータが使用される。例えば、核酸配列間のパーセント配列同一性は、標準パラメータ（スコアリングマトリクスに対して６のワードサイズ及びＮＯＰＡＭ因子）によるＦＡＳＴＡを使用して、又はＧＣＧ Version 6.1で与えられるその標準パラメータによるＧａｐを用いて、測定することができる。

【００５４】

ヌクレオチド配列の基準は、他の特定がない限り、その相補体を包含する。それ故、特定の配列を有する核酸の言及は、当然のことながらその相補的配列を有するその相補ストランドを包含する。

【００５５】

アミノ酸配列との関連での「パーセント配列同一性」なる用語は、最大対応のためにアラインした場合に同じになる２配列中の残基を意味する。配列同一性比較の長さは、少なくとも約５アミノ酸、通常は少なくとも約２０アミノ酸、より通常は少なくとも約３０アミノ酸、一般的には少なくとも約５０アミノ酸、より一般的には少なくとも約１００アミノ酸、そしてなお更に一般的には約１５０、２００又はそれ以上のアミノ酸のストレッチを超えてもよい。アミノ酸配列同一性を測定するのに使用できる、業界でよく知られた異なるアルゴリズムは多数存在する。例えば、アミノ酸配列は、Wisconsin Package Version 10.0、Genetics Computer Group(GCG)、Madison、Wisconsinのプログラムである、ＦＡＳＴＡ、Ｇａｐ、又はBestfitを用いて比較することができる。

【００５６】

ポリペプチドの配列同一性は、一般的に配列解析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失及び他の修飾に割り当てられる類似性の測定を用いて、配列をマッチさせる。例えば、ＧＣＧは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドなど密接に関係するポリペプチド間、又は野生型タンパク質及びそのアナログ間の配列相同性又は配列同一性を決めるプログラムで規定された、標準パラメータを用いて使用できる「Ｇａｐ」及び「Bestfit」などのプログラムを含む。例えば、GCG Version 6.1（Wisconsin大、ＷＩ）を参照されたい。ポリペプチド配列は、また標準又は推奨パラメータを用いるＦＡＳＴＡを使用して比較できるが、GCG Version 6.1を参照されたい。ＦＡＳＴＡ（例えば、ＦＡＳＴＡ２及びＦＡＳＴＡ３）は、クエリー及びサーチ配列間の最良重複の領域のアラインメント及びパーセント配列同一性を与える（Pearson, (1990), Methods Enzymol. 183: 63-98; Pearson, (2000), Methods Mol. Biol. 132: 185-219）。本発明の配列を異なる生物由来の多数の配列を含むデータベースと比較する場合、もう１つの好適なアルゴリズムは、コンピュータプログラムのＢＬＡＳＴで、特にプログラムに付属の標準パラメータを用いる、blastp又はtblastnである。例えば、Altschul et al., (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-410; Altschul et al., (1997), Nucleic Acids Res. 25: 3389-402を参照されたい。

【００５７】

相同性で比較されるポリペプチド配列の長さは、一般には少なくとも約１６アミノ酸残基、通常は少なくとも約２０残基、より通常は少なくとも約２４残基、一般的には少なくとも約２８残基、そして好ましくは約３５残基以上である。多数の異なる生物由来の配列を含むデータベースを検索する場合、アミノ酸配列を比較することが好ましい。

【００５８】

本明細書に記載の「ポリヌクレオチド」の用語は、少なくとも１０塩基長のヌクレオチド、リボヌクレオチドか又はデオキシヌクレオチドの多量体型又はどちらかのタイプのヌクレオチドの修飾型を意味する。この用語は、一本鎖型及び二本鎖型 を含む。

【００５９】

「ポリペプチド」の用語は、天然又は人工タンパク質、タンパク質フラグメント及びタンパク質配列のポリペプチドアナログを包含する。ポリペプチドは単量体型又は多量体型

であってもよい。

【００６０】

本明細書で使用される「ポリペプチドフラグメント」の用語は、アミノ末端及び／又はカルボキシ末端欠失を有するポリペプチドを指すが、ここで、残りのアミノ酸配列は、天然型の配列の対応位置と同一である。幾つかの実施態様では、フラグメントは、少なくとも５、６、８、及び１０アミノ酸長さである。他の実施態様では、フラグメントは、少なくとも１４、少なくとも２０、少なくとも５０、又は少なくとも７０、８０、９０、１００、１５０又は２００アミノ酸長さである。

【００６１】

本明細書で使用される、「組換え宿主細胞」(又は簡単に「宿主細胞」)の用語は、組換え発現ベクターが導入される細胞を意味する。当然のことながら、「組換え宿主細胞」及び「宿主細胞」は特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫をも意味する。特定の修飾が変異か又は環境的影響に因り後続世代に生じることから、そのような子孫は実際には親細胞に一致しないこともあるが、なお本明細書に使用される「宿主細胞」なる用語の範囲内に含まれる。

【００６２】

タンパク質又はポリペプチドは、少なくとも約６０から７０％の試料が一種類のポリペプチドを示す場合、「実質的に純粋な」、「実質的に均一な」、又は「実質的に精製された」である。ポリペプチド又はタンパク質は単量体又は多量体である。実質的に純粋なポリペプチド又はタンパク質は、一般的にタンパク質試料の約５０質量％、６０質量％、７０質量％、８０質量％又は９０質量％、より通常は約９５質量％を含むことができ、そして好ましくは９９質量％の純度を越えてもよい。タンパク質の純度及び均一性は、タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動と、それに続く業界でよく知られた染色法によるゲル染色における単一ポリペプチドバンドの視覚化など、業界でよく知られた多くの手段により示すことができる。当業者には当然のことながら、精製のために業界によく知られたＨＰＬＣ又は他の手段を用いることにより、より高い分解能がもたらされ得る。

【００６３】

核酸又はそのフラグメントに関して、「実質的類似性」又は「実質的配列類似性」なる用語は、別な核酸（又はその相補鎖）を用いて、適切なヌクレオチド挿入又は欠失を含んで最適にアラインした場合、ヌクレオチド塩基の少なくとも約８５％、好ましくは少なくとも約９０％、そしてより好ましくは少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％にヌクレオチド配列同一性があることを意味し、これは上記のＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ又はＧａｐなどの配列同一性のいずれかの周知アルゴリズムにより測定される。

【００６４】

ポリペプチドに適用される「実質的類似性」又は「実質的配列類似性」なる用語は、プログラムに付属した標準ギャップ重量を用いるＧＡＰ又はＢＥＳＴＦＩＴプログラムによるなど最適にアラインした場合、２つのアミノ酸配列は、少なくとも７０％、７５％又は８０％の配列類似性、好ましくは少なくとも９０％又は９５％の配列同一性、及び更に好ましくは少なくとも９７％、９８％、９９％又は１００％の配列同一性を共有することを意味する。特定の実施態様では、同一でない残基位置は保存的アミノ酸置換により異なる。

【００６５】

本明細書で使用される、「表面プラズモン共鳴」の用語は、例えばBIACORE^{TM}システム（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden及びPiscataway, N.J.）を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化の検出による、リアルタイム生体特異性相互作用の解析を可能にする光学現象を指す。更なる説明については、Jonsson U. et al., (1993), Ann. Biol. Clin. 51: 19 26; Jonsson U. et al., (1991), Biotechniques 11: 620 627; Jonsson B. et al., (1995), J. Mol. Recognit. 8: 125 131; and Johnsson B. et al., (1991), Anal. Biochem. 198: 268 277を参照されたい。

【００６６】
「治療的有効量」は、治療している疾患の１つ又はそれ以上の症状をある程度軽減する、治療薬剤の投与される量を指す。関節リウマチの治療に関して、治療的有効量は、以下の効果の少なくとも１つを有する量を示す：関節の構造的損傷の低減；関節域の液体の蓄積の抑制（即ち、ある程度の遅延、好ましくは停止）；そして関節リウマチに伴う１つ又はそれ以上の症状のある程度の軽減（又は、好ましくは、除去）。
【００６７】
「治療する」、「治療すること」及び「治療」は、生物学的障害及び／又はその付随症状を軽減又は消失させる方法を意味する。関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、肉芽腫性疾患及び多発性硬化症などの様々な自己免疫疾患について、これらの用語は単純にいえば、自己免疫疾患に罹患した個体の推定寿命が増加すること、又は１つ又はそれ以上の疾患の症状が減少することを意味する。
【００６８】
本明細書で使用される、特定の遺伝子について「利用する」という用語は、抗体の特定部位のアミノ酸配列が、Ｂ細胞成熟時に最終的にその遺伝子から生成されたことを意味する。例えば、「ヒトV_H－３ファミリー遺伝子を利用する重鎖可変アミノ酸配列」という語句は、抗体のV_H領域がＢ細胞成熟時に遺伝子断片のＶＨ－３ファミリーから生成された状況を指す。ヒトＢ細胞では、抗体を生成する３０以上の異なる機能性重鎖可変遺伝子がある。特定の重鎖可変遺伝子の使用は、従って、抗原への結合と機能活性の組合せ特性に関し、抗体－抗原相互作用の好ましい結合モチーフを示す。当然のことながら、遺伝子利用解析は抗体構造の限られた一部の概観を与える。ヒトＢ細胞はＶ－Ｄ－Ｊ重鎖又はＶ－Ｊカッパ軽鎖転写物を確率的に生成することから、体細胞超変異、ｎ－付加、及びＣＤＲ３拡張を含み、制限なく多くの二次過程が起こる。例えば、Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156 (1997)を参照されたい。
【００６９】
本明細書で使用される、２０の通常のアミノ酸及びそれらの略語は、従来の使用法に従う。「免疫学－合成（Immnology - A Synthesis）」(2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1991)）を参照されたい。
【００７０】
本明細書で使用される、「ベクター」なる語は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる、核酸分子を意味する。幾つかの実施態様では、ベクターは１つのプラスミド、即ち追加のＤＮＡ断片がそれに連結する環状二重鎖ＤＮＡ切片である。１つの実施態様では、ベクターはウイルスベクターであり、ここで、追加のＤＮＡ断片は、ウイルスゲノムに連結され得る。１つの実施態様では、ベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自己複製できる(例えば、細菌起源の複製を有する細菌ベクター及びエピソーム性哺乳動物ベクター)。他の実施態様では、ベクター(例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター)を、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組込むことができ、それにより宿主ゲノムとともに複製される。その上、特定のベクターは、それらが機能可能に連結され得る遺伝子の発現に導くことができる。そのようなベクターは「組換え発現ベクター」(又は簡単に、「発現ベクター」とも言われる。
【００７１】
本明細書で使用される「標識」又は「標識化」の用語は、抗体への別の分子の組込みを指す。１つの実施態様では、標識は検出可能なマーカー、例えば放射性標識アミノ酸の組み込み、及び印をつけたアビジン（例えば、光学的又は比色法により検出し得る蛍光マーカー又は酵素活性を含むストレプトアビジン）により検出し得る、ビオチン部分のポリペプチドへの結合である。別の実施態様では、標識又はマーカーは治療可能な、例えば薬物複合体又は毒素である。ポリペプチド又は糖タンパク質を標識化する種々の方法は業界でよく知られており、使用可能である。ポリペプチドに対する標識の例は、以下のもの：ラジオアイソトープ又は放射性核種、蛍光標識(例えば、ＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニドリン光体)、酵素標識、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターによって認

識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、ガドリニウムキレートなどの磁性剤、百日咳毒素などの毒素、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセン（ａｎｔｈｒａｃｉｎ）ジオン、ミトキサントロン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びプロマイシン並びにそのアナログ又はホモログを含むが、これらに限定されるものではない。幾つかの実施態様では、標識は、潜在的立体障害を少なくするために種々の長さのスペーサーアームで付けられる。

【００７２】

本発明の抗ＣＤ４４抗体の重鎖のＣ末端リジンは、抗体が哺乳類細胞培養で発現する際、１つ又はそれ以上のカルボキシペプチダーゼの活性の結果として抗体が組換え産生する場合には切断し得る(Lewis D. A., et al., Anal. Chem, 66(5): 585-95 (1994), Harris R. J., J. of Chromotography A, 705: 129-134 (1995))。予想構造との多くの違いは、公知か又は新しいタイプのインビボ(翻訳後)修飾、又はメチオニン酸化、ジケトピペラジン形成、アスパラギン酸塩異性化及びアスパラギン残基の脱アミド、又はスクシンイミド形成などの、自然(非酵素的)タンパク質分解に由来する組換え産生抗体中に見出すことができる。

【００７３】

ヒト抗ＣＤ４４抗体及びその特徴付け

本発明は、ヒトＣＤ４４に結合する単離されたヒト抗体、又はその抗原結合部分を提供する。本発明の種々の態様は、そのような抗体及び抗原結合部位、及びその薬剤組成物、並びにそのような抗体及び抗原結合部位を作製するための核酸、組換え発現ベクター及び宿主細胞に関する。インビトロか又はインビボで、ヒトＣＤ４４を検出し、又はヒトＣＤ４４活性を阻害するための本発明の抗体及び抗原結合部位を使用する方法も、本発明に包含される。本発明の好ましい実施態様のヒト抗ＣＤ４４抗体は、非ヒト又は非ヒト誘導体化モノクローナル抗体（Ｍａｂ）に固有の免疫原性又はアレルギー反応を最小化し、それ故に投与した抗体の有効性及び安全性を増加させる。完全ヒト抗体の使用は、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、肉芽腫性疾患、多発性硬化症、喘息、クローン病、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、尋常性乾癬及びがんなどの、反復抗体投与を要すると考えられる慢性及び再発ヒト疾患の治療において、実質的な利点を提供する。

【００７４】

ヒトを含む幾つかの種由来のＣＤ４４アミノ酸及びヌクレオチド配列は、配列番号１及び２が公知である（例えば、Accession番号ＮＭ＿００１００１３９１を参照）。ヒトＣＤ４４、又はその免疫原性部分は当業者によく知られた方法によって製造することができ、又は小売業者から購入することができる(例えば、Ｒ＆Ｄシステムカタログ番号８６１－ＰＣ－１００)。カニクイザル由来のＣＤ４４のアミノ酸及びヌクレオチド配列は業界で周知ではなく、そして本明細書に、配列番号５、７(アミノ酸)、８及び１５３(核酸)として開示されている。

【００７５】

幾つかの実施態様では、ヒト抗ＣＤ４４抗体は、非ヒトトランスジェニック動物、例えばそのゲノムはトランスジェニック動物がヒト抗体を産生するようにヒト免疫グロブリン遺伝子を含む、げっ歯類を免疫することにより産生させる。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体及び抗原結合部分は、ＨＡ結合部位に結合する抗体又は抗原結合部位を含むが、これに限定されるものではない。

【００７６】

更なる実施態様では、本発明はその抗体又は抗原結合部位を提供し、ここで、該抗体又は抗原結合部位は、以下のもの：配列番号１７、５３，８９及び１２５のいずれか１つ、又は少なくとも１つの保存的アミノ酸置換によって配列番号１７、５３，８９及び１２５

のいずれか１つと異なる配列から、独立に選択されるＶ$_H$ＣＤＲ１；配列番号１９、５５，９１及び１２７のいずれか１つ、又は少なくとも１つの保存的アミノ酸置換によって配列番号１９、５５，９１及び１２７のいずれか１つと異なる配列から、独立に選択されるＶ$_H$ＣＤＲ２；そして配列番号２１、５７、９３及び１２９のいずれか１つ、又は少なくとも１つの保存的アミノ酸置換によって配列番号２１、５７，９３及び１２９のいずれか１つと異なる配列から、独立に選択されるＶ$_H$ＣＤＲ３、から選択される少なくとも１つのＣＤＲを含む。例えば、上記のＶ$_H$ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列は、１、２、３、４又は５の保存的アミノ酸置換により、それぞれの列挙された配列番号と独立に異なってもよい。

【００７７】

別の実施態様では、本発明は、抗体又はその抗原結合部分を提供することができ、ここで、該抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２３、５９，９５及び１３１のいずれか１つ、又は少なくとも１つの保存的アミノ酸置換によって配列番号２３、５９，９５及び１３１のいずれか１つと異なる配列から、独立に選択されるＶ$_L$ＣＤＲ１；配列番号２５、６１，９７及び１３３のいずれか１つ、又は少なくとも１つの保存的アミノ酸置換によって配列番号２５、６１，９７及び１３３のいずれか１つと異なる配列から、独立に選択されるＶ$_L$ＣＤＲ２；そして配列番号２７、６３，９９及び１３７のいずれか１つ、又は少なくとも１つの保存的アミノ酸置換によって配列番号２７、６３，９９及び１３５のいずれか１つと異なる配列から、独立に選択されるＶ$_L$ＣＤＲ３、から選択される少なくとも１つのＣＤＲを含む。例えば、上記のＶ$_L$ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列は、１、２、３、４又は５の保存的アミノ酸置換により、それぞれの列挙された配列番号と独立に異なってもよい。

【００７８】

本発明のなお更なる実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は：配列番号１７に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号１９に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、配列番号２１に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３、配列番号２３に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号２５に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、及び配列番号２７に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３を含む。

【００７９】

本発明のなお更なる実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は：配列番号５３に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号５５に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、そして配列番号５７に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３、配列番号５９に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号６１に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、及び配列番号６３に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３を含む。

【００８０】

本発明のなお更なる実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は：配列番号８９に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号９１に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、そして配列番号９３に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３、配列番号９５に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号９７に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、及び配列番号９９に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３を含む。

【００８１】

本発明のなお更なる実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は：配列番号１２５に示されるＶ$_H$ＣＤＲ１、配列番号１２７に示されるＶ$_H$ＣＤＲ２、そして配列番号１２９に示されるＶ$_H$ＣＤＲ３、配列番号１３１に示されるＶ$_L$ＣＤＲ１、配列番号１３３に示されるＶ$_L$ＣＤＲ２、及び配列番号１３５に示されるＶ$_L$ＣＤＲ３を含む。

【００８２】

更なる実施態様では、上記のＶ$_H$及びＶ$_L$ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は、少なくとも１つの保存的アミノ酸配列置換により、上に列挙した特異的配列番号と各々独立に異なってもよい。例えば、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３配列は、１、２、３、４、又は５の保存的アミノ酸置換により、列挙したそれぞれ特異的な配列番号と各々独立に異なってもよい。

【００８３】

本発明は、更に抗体又はその抗原結合部分を提供し、ここで、該抗体又は抗原結合部分

は、１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４及び１０Ｃ８．２．３抗体のいずれか１つに見出されるV_H及びV_LＣＤＲ１、V_H及びV_LＣＤＲ２、及びV_H及びV_LＣＤＲ３を含む。

【００８４】

更なる実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１１、４７、８３及び１１９のいずれかであり、又は少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有することにより配列番号１１、４７、８３及び１１９のうちのいずれか１つと異なるV_Hドメインを含む。例えば、V_Hドメインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０の保存的アミノ酸置換により、配列番号１１、４７、８３及び１１９のいずれかと異なることができる。更なる実施態様において、これらの保存的アミノ酸置換のいずれかは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び／又はＣＤＲ３領域で起こり得る。

【００８５】

本発明の更なる態様は、アミノ酸配列において配列番号１１、４７、８３及び１１９のうちのいずれか１つに、少なくとも９０％、好ましくは９５％、そしてより好ましくは９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である、V_Hドメインを含む抗体又はその抗原結合部分である。

【００８６】

本発明の更なる態様では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１５、５１、８７及び１２３のいずれか、又は少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有することにより配列番号１５、５１、８７及び１２３のうちのいずれかと異なるV_Lドメインを含む。例えば、V_Lドメインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０の保存的アミノ酸置換により、配列番号１５、５１、８７及び１２３のいずれかと異なることができる。更なる実施態様において、これらの保存的アミノ酸置換のいずれかは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び／又はＣＤＲ３領域で起こり得る。

【００８７】

本発明の更なる態様は、アミノ酸配列において配列番号１５、５１、８７及び１２３のうちのいずれか１つに、少なくとも９０％、好ましくは９５％、そしてより好ましくは９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である、V_Lドメインを含む抗体又はその抗原結合部分である。

【００８８】

本発明の別の態様では、抗体又はその抗原結合部分は、ａ）配列番号１１に示されるV_Hドメイン、及び配列番号１５に示されるV_Lドメインを含む抗体又はその抗原結合部分；ｂ）配列番号４７に示されるV_Hドメイン、及び配列番号５１に示されるV_Lドメイン域を含む抗体又はその抗原結合部分；ｃ）配列番号８３に示されるV_Hドメイン、及び配列番号８７に示されるV_Lドメインを含む抗体又はその抗原結合部分；及びｄ）配列番号１１９に示されるV_Hドメイン及び配列番号１２３に示されるV_Lドメインを含む抗体又はその抗原結合部分：から成る群から選択される。

【００８９】

更なる実施態様では、ａ）からｄ)までの群において上記した抗体又はその抗原結合部分のうちのいずれかに対して、V_H及び／又はV_Lドメインは、少なくとも１つの保存的アミノ酸置換により、本明細書に列挙した特異的配列番号と異なることができる。例えば、V_H及び／又はV_Lドメインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０の保存的アミノ酸置換により、列挙した配列番号と異なることができる。更なる実施態様において、これらの保存的アミノ酸置換のいずれかは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び／又はＣＤＲ３領域で起こり得る。

【００９０】

更に別の実施態様では、本発明は、ａ）アミノ酸配列において配列番号９に、少なくとも９０％、好ましくは９５％、そしてより好ましくは９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である重鎖、及びアミノ酸配列において配列番号１３に、少なくとも９０％、好ましくは９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である軽鎖を

含む抗体又はその抗原結合部分；ｂ）アミノ酸配列において配列番号４５に、少なくとも９０％同一である重鎖、及び配列番号４９に、少なくとも９５％、好ましくは９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である軽鎖を含む抗体又はその抗原結合部分；ｃ）配列番号８１に、少なくとも９５％、より好ましくは９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である重鎖、及び配列番号８５に、９５％、好ましくは９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である軽鎖を含む抗体又はその抗原結合部分；及びｄ）配列番号１１７に、少なくとも９０％同一である重鎖、及び配列番号１２１に、好ましくは９５％、そしてより好ましくは９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である軽鎖を含む抗体又はその抗原結合部分：から成る群から選択される抗体又はその抗原結合部分である。

【００９１】

別の実施態様では、本発明は、ａ）配列番号９に示される重鎖、及び配列番号１３に示される軽鎖を含む抗体又はその抗原結合部分；ｂ）配列番号４５に示される重鎖、及び配列番号４９に示される軽鎖を含む抗体又はその抗原結合部分；ｃ）配列番号８１に示される重鎖、及び配列番号８５に示される軽鎖を含む抗体又はその抗原結合部分；及びｄ）配列番号１１７に示される重鎖、及び配列番号１２１に示される軽鎖を含む抗体又はその抗原結合部分：から成る群から選択される抗体又はその抗原結合部分である。

【００９２】

幾つかの実施態様では、本発明の抗ＣＤ４４抗体の重鎖のＣ末端リジンは切断される（Lewis D. A., et al., Anal. Chem, 66(5): 585-95 (1994), Harris R. J., J. of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)）。

【００９３】

本発明の種々の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分の重鎖及び／又は軽鎖は、場合によりシグナル配列を含んでもよい。

【００９４】

本発明は、更にＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分を提供し、ここで、記載の抗体又はその抗原結合部分、又はそのＣＤＲは、下記のＡ）からＧ）に記載したような幾つかの機能特性の内の少なくとも１つを有する。

Ａ）例えば、１つの実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴で測定して、１０００ｎＭ以下のK_DでＣＤ４４に結合する。更なる実施態様では、抗体又は部分は、表面プラズモン共鳴で測定して、５００ｎＭより小さい、又は好ましくは１００ｎＭより小さい、５０ｎＭより小さい、２０ｎＭより小さい、１０ｎＭより小さい、５ｎＭより小さい、４ｎＭより小さい、３ｎＭより小さい、２ｎＭより小さい、１ｎＭより小さい、９００ｐＭより小さい、８００ｐＭより小さい、７００ｐＭより小さい、６００ｐＭより小さい、５００ｐＭより小さい、１００ｐＭより小さいK_DでＣＤ４４に結合する。通常は、K_D値に下限はない。しかしながら、実用的には、下限は約１ｐＭと推定し得る。

Ｂ）別の態様では、抗体又はその抗体結合部分は、表面プラズモン共鳴で測定して、０．０１$^{s^{-1}}$より小さいか等しいＣＤ４４に対するオフレート（K_{off}）を有する。例えば、特別の実施態様では、抗体又は部分は、ＣＤ４４に対して０．００５$^{s^{-1}}$より小さい、０．００４$^{s^{-1}}$より小さい、０．００３$^{s^{-1}}$より小さい、０．００２$^{s^{-1}}$より小さい、又は０．００１$^{s^{-1}}$より小さい、K_{off}を有する。通常は、K_{off}値に下限はない。しかしながら、実用的には、下限は１×１０$^{-7s^{-1}}$と推定し得る。

Ｃ）更なる実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は、ＦＡＣＳ又はＥＬＩＳＡ結合アッセイにより測定して、５００ｎＭ、７５μｇ／ｍｌより小さいEC_{50}でＣＤ４４に結合する。更なる実施態様では、抗体又は部分は、ＥＬＩＳＡ結合アッセイにより測定して、１００ｎＭより小さい、５０ｎＭより小さい、２０ｎＭより小さい、１０ｎＭより小さい、１ｎＭより小さい、５００ｐＭより小さい、又は１００ｐＭより小さいEC_{50}でＣＤ４４に結合する。好ましくは、　抗体又は部分は、１０ｎＭ、１．５μｇ／ｍｌより小さいEC_{50}でＣＤ４４に結合する。通常は、EC_{50}に下限はない。しかしながら、実用的に

は、下限は約１ｐＭと推定し得る。

Ｄ）更に別の実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は、ＥＬＩＳＡ結合アッセイにより測定して、５００ｎＭ、７５μｇ／ｍｌより小さいIC_{50}でＣＤ４４及びＨＡ間の相互作用を阻害する。更なる実施態様では、抗体又は部分は、ＥＬＩＳＡ結合アッセイにより測定して、１００ｎＭより小さい、５０ｎＭより小さい、２０ｎＭより小さい、１０ｎＭより小さい、５ｎＭより小さい、４ｎＭより小さい、３ｎＭより小さい、２ｎＭより小さい、１ｎＭより小さい、５００ｐＭより小さい、又は１００ｐＭより小さいIC_{50}でＣＤ４４に結合する。

Ｅ）更に別の実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は、ＦＡＣＳにより測定して、インビボの表面発現及び単球を、約１００ｎＭより小さいIC_{50}で減少させる。

Ｆ）別の実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は、ＦＡＣＳにより測定して、５０ｎＭより小さい、２０ｎＭより小さい、１０ｎＭより小さい、１ｎＭより小さい、５００ｐＭより小さい、又は１００ｐＭより小さい、約２０ｎＭより小さい、約１０ｎＭより小さい、又は約５ｎＭより小さい、IC_{50}で減少させる。好ましくは、抗体又はその抗体結合部分は、ＣＤ４４受容体の表面発現を、３０ｎＭ、４．５μｇ／ｍｌより小さいIC_{50}で、インビトロでのＣＤ４４受容体の表面発現を減少させる。通常は、EC_{50}に下限はない。しかしながら、実用的には、下限は約１ｐＭと推定できる。

Ｇ）別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分は、リンパ管内皮ヒアルロナン（hyaluronan）受容体１タンパク質（ＬＹＶＥ１）で、少なくとも１００倍のＣＤ４４に対する選択性を有する。

【００９５】

１つの実施態様では、本発明は１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４；及び１０Ｃ８．２．３；で表わされるヒト抗ＣＤ４４モノクローナル抗体（ｍＡｂ）；及びそれらを産生するハイブリドーマ細胞系を提供する。本出願の表１及び９～１２は、完全長重鎖及び軽鎖、対応の完全長推定アミノ酸配列、並びにヌクレオチド及び重鎖及び軽鎖可変領域の推定アミノ酸配列をコードする核酸の配列同定部（配列番号）を示す。

【００９６】

複数の実施態様では、抗体は、１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４；及び１０Ｃ８．２．３で表わされるＩｇＧである。本発明の抗体若しくはその抗原結合部分又は抗体ドメインの特異的アミノ酸配列は、表９、１０、１１及び１２、及び図２に記載されている。

【００９７】

実施態様改変では、ＣＤ４４抗体のV_Lは、ヒト遺伝子の生殖細胞系アミノ酸配列に対して１つ又はそれ以上のアミノ酸置換を含む。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体のV_Lは、生殖細胞系アミノ酸配列に対して１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０のアミノ酸置換を含む。１つの実施態様では、生殖細胞系由来の１つ又はそれ以上のそれらの置換は、軽鎖中のＣＤＲ領域である。１つの実施態様では、生殖細胞系に関連したアミノ酸置換は、生殖細胞系に対して、抗体１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４；及び１０Ｃ８．２．３のいずれか１つ又はそれ以上のV_Lにおける置換と同じの、１つか又はそれ以上の位置においてである。例えば、本発明の抗ＣＤ４４抗体のV_Lは、抗体１Ａ９．Ａ６．Ｂ９のV_Lに見出される生殖細胞系と比較して、１つ又はそれ以上のアミノ酸置換を含んでもよい。幾つかの実施態様では、アミノ酸変化は１つ又はそれ以上の同じ位置でなされるが、しかし基準抗体におけるものとは異なる置換を含む。

【００９８】

１つの実施態様では、生殖細胞系に関連したアミノ酸変化は、抗体１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４；及び１０Ｃ８．２．３のV_Lのいずれかと同じ１つ又はそれ以上の位置で起こるが、この変化は、基準抗体のアミノ酸に対して、そのような位置での保存的アミノ酸置換を表わす可能性がある。例えば、これらの抗体の１つの特定の位置が生殖細胞系に関連して変化して、グルタミン酸塩である場合、その位置でア

スパラギン酸塩を置換することもできる。同様に、生殖細胞系と比べてアミノ酸置換がセリンの場合、その位置でトレオニンをセリンと置き換えることができる。保存的アミノ酸置換は上記で論じられている。

【００９９】

幾つかの実施態様では、ヒト抗ＣＤ４４抗体の軽鎖は、抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９(配列番号１５)；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２(配列番号５１)；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４(配列番号８７)又は１０Ｃ８.２.３(配列番号１２３)のV_Lアミノ酸配列、又は１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０の保存的アミノ酸置換まで、及び／又は、３非保存的アミノ酸置換までの全てを有する該アミノ酸置換を含む。幾つかの実施態様では、軽鎖は、前述した抗体のいずれか１つのＣＤＲ１の始めからＣＤＲ３の終わりまでのアミノ酸配列を含む。

【０１００】

幾つかの実施態様では、軽鎖は、抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４；及び１０Ｃ８.２.３の軽鎖の、それぞれ軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３から独立に選択されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３領域、又はそれぞれ４より小さい若しくは３より小さい保存的アミノ酸置換、及び／又は総数で３又はそれより少ない非保存的アミノ酸置換を有するＣＤＲ領域を含むことができる。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体の軽鎖は、軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含み、その各々は、モノクローナル抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９(配列番号１３)；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２(配列番号４９)；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４(配列番号８５)又は１０Ｃ８.２.３(配列番号１２１)の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３領域から独立に選択される。特別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体の軽鎖は、１Ａ９.Ａ６.Ｂ９(配列番号１５)；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２(配列番号５１)；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４(配列番号８７)又は１０Ｃ８.２.３(配列番号１２３)から選択されるV_L領域のアミノ酸配列を含む抗体の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３領域、又はそれぞれ４より小さい若しくは３より小さい保存的アミノ酸置換、及び／又は総数で３又はそれより少ない非保存的アミノ酸置換を有する該ＣＤＲ領域を含む。

【０１０１】

本発明の抗ＣＤ４４抗体は、ヒトカッパ若しくはヒトラムダ軽鎖又はそれらに由来するアミノ酸配列を含むことができる。カッパ軽鎖を含む幾つかの実施態様では、軽鎖可変領域（V_L）は、一部ヒトＶＫ１、V_K２又はV_K３ファミリー遺伝子によってコードされる。特別の実施態様では、軽鎖は、ヒト、又はサルアミノ酸配列若しくはその組合せを利用する。

【０１０２】

重鎖に関して、１つの実施態様では、可変領域（V_H）が一部ヒト遺伝子によりコードされる。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体のV_H配列は、生殖細胞系アミノ酸配列に関連した１つ又はそれ以上のアミノ酸置換、欠失又は挿入（付加）を含む。幾つかの実施態様では、重鎖の可変領域は、生殖細胞系アミノ酸配列由来の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６又は１７の突然変異を含む。幾つかの実施態様では、突然変異は生殖細胞系アミノ酸配列に比べて、非保存的置換、欠失又は挿入である。幾つかの実施態様では、突然変異は重鎖のＣＤＲ領域にある。幾つかの実施態様では、アミノ酸変化は、抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４又は１０Ｃ８.２.３のV_Hのいずれか１つ又はそれ以上の生殖細胞系の突然変異と同じ、１つ又はそれ以上の位置で行なわれる。他の実施態様では、アミノ酸変化は１つ又はそれ以上の同じ位置であるが、しかし基準抗体におけるものとは異なる突然変異を含む。

【０１０３】

幾つかの実施態様では、重鎖は、抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９(配列番号１１)；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２(配列番号４７)；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４(配列番号８３)又は１０Ｃ８.２.３(配列番号１１９)のV_Hアミノ酸配列、又は１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０の保存的アミノ酸置換まで、及び／又は、３非保存的アミノ酸置換までの全てを有する該V_Hアミノ酸置換を含む。幾つかの実施態様では、重鎖は、前述の抗体のいずれか１つのＣＤＲ

１の始めからＣＤＲ３の終わりまでのアミノ酸配列を含む。

【０１０４】

１つの実施態様では、重鎖は、抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４又は１０Ｃ８.２.３の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３領域、又は各々８より小さい、６より小さい、４より小さい、又は３より小さい保存的アミノ酸置換、及び／又は総数で３又はそれより少ない非保存的アミノ酸置換を有する該ＣＤＲ領域を含む。幾つかの実施態様では、重鎖ＣＤＲ領域は、抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４又は１０Ｃ８.２.３の重鎖ＣＤＲ領域から独立に選択される。別の実施態様では、重鎖は、１Ａ９.Ａ６.Ｂ９(配列番号１１)；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２(配列番号４７)；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４(配列番号８３)又は１０Ｃ８.２.３(配列番号１１９)から選択される、２つ又はそれ以上のV_H領域から独立に選択されるＣＤＲ領域を含む。

【０１０５】

別の実施態様では、抗体は軽鎖及び重鎖を含む。更なる実施態様では、軽鎖ＣＤＲ及び重鎖ＣＤＲは、同じ抗体に由来する。

【０１０６】

行われるアミノ酸置換の１つのタイプは、抗体中の化学的に反応性の高い１つ又はそれ以上のシステインを、限定しないが、アラニン又はセリンなどの別の残基に変えることである。１つの実施態様では、非カノニカルシステインの置換がある。置換はＣＤＲに又は可変ドメインのフレームワーク領域に又は抗体の定常ドメインでなされる。幾つかの実施態様では、システインがカノニカルである。

【０１０７】

行われるアミノ酸置換の別のタイプは、抗体中の任意の潜在的タンパク質分解部位を変えることである。そのような部位は、ＣＤＲに又は可変ドメインのフレームワーク領域に又は抗体の定常ドメインに生じ得る。システイン残基の置換及びタンパク質分解部位の除去は、抗体産物のいずれかの異種性のリスクを低減し、その結果同種性を増加させる可能性がある。アミノ酸置換の別のタイプは、残基の１つ又は両方を変えることにより潜在的な脱アミド部位を形成する、アスパラギン－グリシン対を除去することである。

【０１０８】

本発明の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体の重鎖と軽鎖は、場合によりシグナル配列を含むことができる。

【０１０９】

１つの態様では、本発明は４つの好ましい阻害性ヒト抗ＣＤ４４モノクローナル抗体、及びそれらを産生するハイブリドーマ細胞系を提供する。表１に、重鎖及び軽鎖の完全長及び可変領域含有部分をコードする核酸の配列同定部（配列番号）、及び対応又は推定アミノ酸配列をリストアップする。

【０１１０】

【表１】

表1

ヒト抗CD４４ 抗体								
モノクローナル抗体	配列同定部(配列番号)							
	可変ドメインを含む部分				完全長			
	重鎖		軽鎖		重鎖		軽鎖	
	タンパク質	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質	DNA
1A9.A6.B9	11	12	15	16	9	10	13	14
2D1.A3.D12	47	48	51	52	45	46	49	50
14G9.B8.B4	83	84	87	88	81	82	85	86
10C8.2.3	119	120	123	124	117	118	121	122

【０１１１】

幾つかの実施態様では、本発明は、モノクローナル抗体１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４又は１０Ｃ８．２．３の、重鎖及び軽鎖バリアントを提供する。本発明の実施例３で詳述されるように、多くの重鎖及び軽鎖バリアント変異が、生殖細胞系ＣＤＲ領域のそれと一致させるために作製された。例えば、本発明の１つの実施態様では、ｇ－１Ａ９．Ａ６．Ｂ９、ｇ－２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２、ｇ－１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４、及びｇ－１０Ｃ８．２．３は、それぞれ１Ａ９．Ａ６．Ｂ９、２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２、１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４、及び１０Ｃ８．２．３の生殖細胞系列化バージョンである。変異して生殖細胞系列化バージョンに達した特異的アミノ酸は、生殖細胞系列化対非生殖細胞系列化抗体の配列を比較することにより当業者に明らかである。例えば、本発明は、残基２８でのトレオニンがイソロイシンに変換される、抗体２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２の重鎖における１つのアミノ酸置換を提供する。第２点突然変異は、抗体２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２の軽鎖においてであり、そして残基３８でグルタミンはヒスチジンで置換される。

【０１１２】

当然のことながら、遺伝子利用解析は、抗体構造の限られた概観を提供するだけである。ヒトＢ細胞は確率的にＶ－Ｄ－Ｊ重鎖又はＶ－Ｊカッパ軽鎖転写物を生成することから、限定されないが、体細胞超変異、ｎ－付加、及びＣＤＲ３拡張を含む多くの二次過程が起こる。例えば、Mendez et al., (1997) Nature Genetics 15: 146-156及び米国特許出願第２００３－００７０１８５号を参照されたい。従って、本発明の抗体構造を更に検討するために、抗体の予想アミノ酸配列が、クローンより得られたｃＤＮＡから生成された。加えて、Ｎ末端アミノ酸配列が、タンパク質配列決定を介して得られた。下表２は、４つの抗ＣＤ４４ハイブリドーマ由来抗体の生殖細胞系遺伝子断片及びイソタイプを説明する。

【０１１３】

【表２】

表２

クローン	重鎖			軽鎖		イソタイプ
	V_H	D	J_H	V_L	J_K	
1A9.A6.B9	3-33	D4-17	JH6b	L6	JK4	IgG2
2D1.A3.D12	1-03	nd	JH6b	L19	JK1	IgG1
14G9.B8.B4	1-03	D3-10	JH5b	A27	JK4	IgG1
10C8.2.3	3-21	D6-19	JH6b	A27	JK4	IgG4

nd ＝ 未測定

【０１１４】
代わりの実施態様では、本発明は、ヒトＣＤ４４に特異的に結合し、また１）V_HＤ４－１７及びV_LＬ６；２）V_HＤ３－１０及びV_LＡ２７；及び３）V_HＤ６－１９及びV_LＡ２７から成る群から選択される、V_H及びV_L遺伝子を利用する抗体又はその抗原結合部分に関する。

【０１１５】
別の実施態様は、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ′）$_2$フラグメント、Ｆｖフラグメント、単鎖Ｆｖフラグメント、単鎖V_Hフラグメント、単鎖V_Lフラグメント、ヒト化抗体、キメラ抗体又は二重特異性抗体である、上記の抗体又は抗原結合部分のいずれかを提供する。

【０１１６】
更なる実施態様では、本明細書に記載の抗体又はその部分のいずれか、及び少なくとも１つの更なる分子実体を含む誘導化された抗体又は抗原結合部分が供給される。例えば、少なくとも１つの更なる分子的実体は、別の抗体（例えば、二重特異性抗体又は二重特異抗体）、検出試薬、標識、細胞毒性薬、薬剤、及び／又は抗体又は抗原結合部分と別の分子（ストレプトアビジンコア領域又はポリヒスチジンタグ）及び／又は抗体又は抗原結合部分に結合若しくは融合(融合タンパク質)した担体タンパク質（例えば、血液タンパク質アルブミン又はトランスフェリン）との結合を媒介し得るタンパク質又はペプチドであってもよい。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分が誘導化される有用な検出試薬は、蛍光化合物；特に、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、５－ジメチルアミン－１－ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリン、ランタニドリン光体を含む。抗体は、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどの、検出に有用な酵素で標識することができる。更なる実施態様では、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、ビオチンで、又は二次レポーター（例えば、ロイシンジッパ対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）により認識される所定のポリペプチドエピトープで標識することもできる。本発明の尚更なる実施態様では、抗体又はその抗原結合部分のいずれも、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、メチル又はエチル基、又はカルボキシル基などの化学基で誘導化することもできる。

【０１１７】
幾つかの実施態様では、本明細書に開示されるＣＤ４４抗体又は抗原結合部分は、固体支持体又は粒子に結合される。そのような粒子はインビボ又はインビトロで診断用に使用される。

【０１１８】
抗ＣＤ４４抗体のクラス及びサブクラス
ＣＤ４４抗体のクラス（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、又はＩｇＤ）及びサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４）は、業界でよく知

られたいずれの方法によっても決定することができる。一般的に、抗体のクラス及びサブクラスは、抗体の特定のクラス及びサブクラスに特異的な抗体を用いて決定することができる。そのような抗体は市販されている。クラス及びサブクラスは、ＥＬＩＳＡ、又はウェスタンブロット法並びに他の技術で決定することができる。あるいは、クラス及びサブクラスは、抗体類の重鎖及び／又は軽鎖の定常ドメインの全部又は一部を配列解析し、それらのアミノ酸配列を様々なクラス及びサブクラスの免疫グロブリンの公知のアミノ酸配列と比較し、そして抗体のクラス及びサブクラスを調べることにより決定し得る。本発明のＣＤ４４抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、又はＩｇＤ分子であり得る。例えば、ＣＤ４４抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４であるＩｇＧであり得る。

【０１１９】

本発明の１つの側面は、ＣＤ４４抗体のクラス又はサブクラスを別のクラス又はサブクラスに変換する方法を提供する。幾つかの実施態様では、C_L又はC_Hをコードする配列を含まないV_L又はV_Hをコードする核酸が、業界でよく知られた方法を用いて単離される。次いで、核酸分子は、所望の免疫グロブリンクラス又はサブクラスからC_L又はC_Hをコードする核酸配列に機能可能に連結される。これは、上記のC_L又はC_H鎖を含むベクター又は核酸分子を用いて達成することができる。例えば、元々ＩｇＭであったＣＤ４４抗体は、ＩｇＧのクラスにスイッチされ得る。更に、クラススイッチは、１つのＩｇＧサブクラスを別なものに、例えば、ＩｇＧ１からＩｇＧ２へ変換するのに使用可能である。所望のイソタイプを含む本発明の抗体を生産する方法は、ＣＤ４４抗体の重鎖をコードする核酸及びＣＤ４４抗体の軽鎖をコードする核酸を単離し、V_H領域をコードする配列を単離し、V_H配列を所望のイソタイプの重鎖定常ドメインをコードする配列にライゲートし、細胞内に軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子構成体を発現させ、そして所望のイソタイプを有するＣＤ４４抗体を採取する工程を含む。

【０１２０】

種及び分子選択性

本発明の別の側面では、抗ＣＤ４４抗体は、種及び分子選択性の両方を示す。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体はヒト及び霊長類のＣＤ４４に結合する。好適には抗ＣＤ４４は、ヒト及びカニクイザルのＣＤ４４に結合する。明細書の教示に従って、業界でよく知られた方法を用いて抗ＣＤ４４抗体に対する種特異性を決定することができる。例えば、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ、免疫沈降法又はＲＩＡを用いて、種特異性を明らかにすることができる（例えば、実施例５を参照されたい)。

【０１２１】

別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体１タンパク質（ＬＹＶＥ－１）の少なくとも１００倍を超えてＣＤ４４選択性を有する（実施例１１を参照されたい)。明細書の教示に従って、業界でよく知られた方法を用いて、ＣＤ４４に対する抗ＣＤ４４抗体の選択性を決定することができる。例えば、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ、免疫沈降法又はＲＩＡを用いて、選択性を明らかにすることができる。

【０１２２】

ＣＤ４４に対する抗ＣＤ４４抗体の結合親和性

１つの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、哺乳類ＣＤ４４、好ましくはヒトに対して高親和性で結合する。

【０１２３】

１つの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、ＨＡ結合ドメイン内で結合する。

【０１２４】

別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、配列番号３（細胞外ドメインＩｇＧ融合）に又は配列番号１５４（サル細胞外ＩｇＧ融合）に示されるアミノ酸配列から成るポリペプチドに高親和性で結合し、そして好適にはＨＡ結合ドメインのアミノ酸配列から成るポリペプチドに高親和性で結合する。

【０１２５】
別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体はＣＤ４４に、又はより好ましくはＨＡ結合ドメインに、５００ｎＭ以下のK_Dで結合する。尚他の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体はＣＤ４４に、又はより好ましくはＣＤ４４のＨＡ結合ドメインに、2×10^{-8}Ｍ、2×10^{-9}Ｍ、又は5×10^{-10}Ｍ以下のK_Dで結合する。更により好ましい実施態様では、ＣＤ４４にＨＡ結合ドメイン中で、2.5×10^{-12}Ｍ以下のK_Dで結合する。幾つかの実施態様では、抗体はＣＤ４４に、抗体１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４；又は１０Ｃ８．２．３と実質的に同じK_Dで結合する。
【０１２６】
幾つかの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、低い解離速度定数（k_{off}）を有する。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、ＣＤ４４に、又はより好ましくはＣＤ４４のＨＡ結合ドメインに、1.0×10^{-3}ｓ－１より低いk_{off}又は5.0×10^{-4}ｓ－１より低いk_{off}で結合する。尚他の実施態様では、k_{off}は、１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４；及び１０Ｃ８．２．３から選択される抗体を含み、本明細書に記載の抗体と実質的に同じである。幾つかの実施態様では、抗体は、１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４；及び１０Ｃ８．２．３から選択される抗体由来の、重鎖のＣＤＲ領域、又は軽鎖のＣＤＲ領域を含む抗体と実質的に同じk_{off}でＣＤ４４に結合する。幾つかの実施態様では、抗体は、ＣＤ４４に、又はより好ましくはＣＤ４４のＨＡ結合ドメインに、配列番号９、４５、８１及び１１７に見出されるV_H領域のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン、又は配列番号１３、４９、８５又は１２１に見出されるV_L領域のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体と、実質的に同じk_{off}で結合する。尚別の実施態様では、抗体は、ＣＤ４４に、又はより好ましくはＣＤ４４のＨＡ結合ドメインに、配列番号１５、４９、８５又は１２１に見出されるV_L領域のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインのＣＤＲ領域、又は配列番号９、４５、８１及び１１７に見出されるV_H領域のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインのＣＤＲ領域を含む抗体と、実質的に同じk_{off}で結合する。
【０１２７】
ＣＤ４４に対する抗ＣＤ４４抗体の結合親和性及び解離速度は、業界でよく知られた方法により決定することができる。結合親和性は、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）、BIACORE^{TM}などの表面プラズモン共鳴により測定することができる。解離速度は、表面プラズモン共鳴により測定できる。好ましくは、結合親和性及び解離速度は、表面プラズモン共鳴により測定される。より好ましくは、結合親和性及び解離速度は、BIACORE^{TM}を用いて測定される。抗体が実質的に抗ＣＤ４４抗体と同じK_Dを有するかについて、業界でよく知られた方法を用いて測定することができる。実施例５は、抗ＣＤ４４モノクローナル抗体の親和定数を測定する方法を提供する。
【０１２８】
抗ＣＤ４４抗体で認識されるＣＤ４４エピトープの同定
本発明は、ＣＤ４４に結合し、そして：（ａ）１Ａ９．Ａ６．Ｂ９；２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２；１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４；及び１０Ｃ８．２．３から選択される抗体；（ｂ）配列番号９、４５、８１及び１１７に見出される可変ドメインのアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインを含む抗体；（ｃ）配列番号１３、４９、８５又は１２１に見出される可変ドメインのアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体；又は（ｄ）（ｂ）に記載の重鎖可変ドメイン及び（ｃ）に記載の軽鎖可変ドメインの両方を含む抗体、と同じエピトープと競合又は交差競合及び／又は結合する、ヒト抗ＣＤ４４モノクローナル抗体を提供する。
【０１２９】
抗体が、同じエピトープに結合するか、抗ＣＤ４４抗体との結合と交差競合するかについて、業界でよく知られた方法を用いて明らかにすることができる。１つの実施態様では、本発明の抗ＣＤ４４抗体を飽和状態下にＣＤ４４に結合することができ、その結果、試験抗体のＣＤ４４への結合能を測定することができる。試験抗体が抗ＣＤ４４抗体と同時にＣＤ４４に結合できるならば、その結果、試験抗体は抗ＣＤ４４抗体と異なるエピトー

プに結合する。しかしながら、試験抗体が同時にＣＤ４４に結合できなければ、その結果、試験抗体は同じエピトープ、重複エピトープ、又はヒト抗ＣＤ４４抗体により結合したエピトープに直近のエピトープに結合する。この実験は、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、BIACORE^{TM}、又はフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）を用いて実施することができる。

【０１３０】

抗ＣＤ４４抗体が別の抗ＣＤ４４抗体と交差競合するかどうかを試験するために、２つの指示書に記載の競合法を使用することができる。即ち、基準抗体が試験抗体をブロックするか、またその逆を決定する。１つの実施態様では、実験はＥＬＩＳＡを用いて実施される。更に以下でK_Dの決定法を論じる。

【０１３１】

抗ＣＤ４４抗体によるＣＤ４４活性の阻害

別の実施態様では、本発明は、ＣＤ４４媒介シグナル伝達を阻害する抗ＣＤ４４抗体を提供する。他の実施態様では、本発明は、ＣＤ４４を介してリンパ球及び単球に対する共刺激シグナル伝達を阻害する抗ＣＤ４４抗体を提供する。尚別の実施態様では、本発明は、サイトカイン産生、そして特にＴＮＦ－α、ＩＬ－６及びＩＬ－１βなどのサイトカイン産生をブロックする抗ＣＤ４４抗体を提供する。更なる実施態様では、本発明は、ＣＤ４４受容体へのＨＡの結合を阻害する抗ＣＤ４４抗体を提供する。１つの実施態様では、ＣＤ４４受容体はヒトのものである。尚別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体はヒト抗体である。IC_{50}は、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、又は他の方法によるリガンド結合アッセイ、及びＦＡＣＳ分析又はＣＤ４４を発現する細胞などの細胞に基づく分析で測定することができる。１つの実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は、ＥＬＩＳＡ分析で測定して、わずか５μｇ／ｍｌ、好ましくはわずか１μｇ／ｍｌ、より好ましくは０．５μｇ／ｍｌ以上、尚一層好ましくはわずか０．２０μｇ／ｍｌのIC_{50}で、ＨＡとＣＤ４４間のリガンド結合を阻害する。実施例４は、ＨＡに結合するＣＤ４４のモノクローナル抗体により阻害を測定する方法を提供する。

【０１３２】

別の実施態様では、本発明は、ＨＡに対するＣＤ４４の結合を阻害する抗ＣＤ４４抗体を提供する。１つの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、ＨＡで誘導された：（ｉ）白血球動員；（ｉｉ）細胞－マトリックス相互作用、及び例えば、白血球及び内皮細胞などの細胞間直接相互作用；（ｉｉｉ）白血球細胞機能の調節；（ｉｖ）ＨＡの代謝；及び／又は（ｖ）マトリックスの集合、有機化（ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ）及びリモデリングに対するＣＤ４４の寄与を阻害する。抗ＣＤ４４抗体がＨＡの存在下にＣＤ４４の活性化を防止し、阻害し、又は低減するかについては、リポ多糖類（ＬＰＳ）及びＨＡにより誘発された白血球からの炎症性サイトカイン放出を測定することにより決定できる。ＣＤ４４活性化及び／又はＣＤ４４に対するＨＡ結合の検出法は、実施例４、５、６及び７に記載されている。１つの実施態様では、サイトカイン分析を用いて、ＣＤ４４活性化のレベルを測定できる。幾つかの実施態様では、ＨＡ競合結合アッセイを用いて測定したIC_{50}は、５μｇ／ｍｌ以下、好ましくは１μｇ／ｍｌ以下、より好ましくは０．５μｇ／ｍｌ以下、尚一層好ましくは０．２０μｇ／ｍｌ以下である。

【０１３３】

抗ＣＤ４４抗体による表面細胞発現の減少

本発明の別の態様では、抗体は、抗体とインキュベーション後細胞表面ＣＤ４４発現のダウンレギュレーションを引き起こす。１つの実施態様では、インキュベーションは、短時間(例えば、４時間)又は長時間(例えば、２４時間)が可能である。特に、本発明は、循環リンパ球、そして好ましくは、ＣＤ３＋Ｔリンパ球上にＣＤ４４発現のダウンレギュレーションを誘導する抗ＣＤ４４抗体を提供する。細胞表面ＣＤ４４発現のダウンレギュレーションは、ＦＡＣＳを用いて測定することができる。本発明の格別な実施態様では、抗体は、ＦＡＣＳで測定して、細胞表面ＣＤ４４発現の好適には６％減少、好適には１０％減少、又はより好適には２０％ダウンレギュレーション、又は更に好適には細胞表面ＣＤ４４発現の少なくとも５０％減少をもたらす。実施例８は、２種：ヒト及びカニクイザル

の白血球及びＴ細胞の細胞表面ＣＤ４４発現のダウンレギュレーションを測定する、ＦＡＣＳ分析の１タイプを例証する。

【０１３４】

抗体の生産方法

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、従来のモノクローナル抗体法、例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション法を含み、様々な技術で生産することができる。体細胞ハイブリダイゼーション法が好ましいが、原理的には、モノクローナル抗体を生産する他の技術、例えば、Ｂリンパ球のウイルス又は発がん性形質転換も使用可能である。

【０１３５】

ハイブリドーマを作製する好ましい動物系はマウス系である。マウスでのハイブリドーマ生産は非常に良く確立された手順である。融合用に免疫された脾臓細胞の分離のための免疫感作プロトコールと技術は、業界で公知である。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)及び融合手順もまた公知である。

【０１３６】

本発明のキメラ又はヒト化抗体は、上記のように作製したマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて作製することができる。重鎖及び軽鎖免疫グロブリンをコードするＤＮＡは、関心あるマウスハイブリドーマから得られ、そして標準的な分子生物学的技術を用いて非マウス（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含むように操作される。例えば、キメラ抗体を作出するためには、業界で公知の方法(米国特許第４８１６５６７号)を用いて、マウスの可変領域をヒト定常領域に結合することができる。ヒト化抗体を作出するためには、マウスＣＤＲ領域を業界に公知の方法（米国特許第５２２５５３９号、米国特許第５５３０１０１号、米国特許第５５８５０８９号、米国特許第５６９３７６２号及び米国特許第６１８０３７０号）を用いて、ヒトのフレームワークに挿入することができる。

【０１３７】

好ましい実施態様では、本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体である。ＣＤ４４に対するそのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系よりむしろヒト免疫系の一部を持つトランスジェニック又は染色体導入マウス（ｔｒａｎｓｃｈｒｏｍｏｓｏｍｉｃ ｍｉｃｅ）を用いて生成することができる。これらのトランスジェニック又は染色体導入マウスは、それぞれＨｕＭＡｂマウス(登録商標)及びＫＭマウス（登録商標）として本明細書に記載のマウスを含み、また「ヒトＩｇマウス」と総称して本明細書に記載されている。

【０１３８】

ＨｕＭＡｂマウス(登録商標)（Medarex、Inc.社）は、未再配列ヒト重鎖（μ及びγ）及びκ軽鎖免疫グロブリン配列を、内因性μ及びκ鎖遺伝子座を不活化する標的変異と一緒にコードする、ヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含む(例えば、 Lonberg, et al. (1994), Nature 368: 856-859を参照されたい)。その結果、マウスは、マウスのＩｇＭ又はκの発現低下を示し、そして免疫付与に応じて、導入されたヒト重鎖と軽鎖のトランス遺伝子は、高親和性ヒトＩｇＧκモノクローナルを生成するように、クラススイッチ及び体細胞変異を受ける（Lonberg, N. et al. (1994), 同上; reviewed in Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101, Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546）。ＨｕＭＡｂマウス(登録商標)の調製及び使用、及びそのようなマウスにより担持されたゲノム修飾は、更に、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. et al. (1993), International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724; Choi et al. (1993), Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. et al. (1993), EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994), J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor, L. et al. (1994), International Immunology 6: 579-591; and Fishwild, D. et al. (1996), Nature Biotechnology 14: 845-851に記載されている。更に、米国特許第５５４５８０６号、米国特許第５５６９８２５号、米国特許第５６２５１２６号、 米国特許

第５６３３４２５号、米国特許第５７８９６５０号、米国特許第５８７７３６７号、米国特許第５６６１０１６号、米国特許第５８１４３１８号、米国特許第５８７４２９９号、及び米国特許第５７７０４２９号、米国特許第５５４５８０７号、ＰＣＴ国際公開第９２／０３９１８号、同国際公開第９３／１２２２７号、同国際公開第９４／２５５８５号、同国際公開第９７／１３８５２号、同国際公開第９８／２４８８４号及び同国際公開第９９／４５９６２号、及び国際公開第０１／１４４２４号を参照されたい。

【０１３９】

別の実施態様では、本発明のヒト抗体は、ヒト重鎖トランス遺伝子及びヒト軽鎖トランス染色体を持つマウスなどの、トランス遺伝子及びトランス染色体にヒト免疫グロブリン配列を持つマウスを用いて産生させることができる。「ＫＭマウス™」として本明細書に記載のそのようなマウスは、ＰＣＴ国際公開第０２／４３４７８号に詳細に記載されている。

【０１４０】

なお更に、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスジェニック動物系は業界で入手可能であり、そして本発明の抗ＣＤ４４抗体を産生させるのに使用可能である。例えば、Xenomouse™（Abgenix、Inc.）として記載されている代替トランスジェニック系が使用でき；そのようなマウスは、例えば、米国特許第５９３９５９８号、米国特許第６０７５１８１号、米国特許第６１１４５９８号、米国特許第６１５０５８４号、及び米国特許第６１６２９６３号に記載されている。

【０１４１】

その上、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替のトランスクロモソミック動物系は業界で入手可能であり、そして本発明の抗ＣＤ４４抗体を産生させるのに使用可能である。例えば、「ＴＣマウス」として記載されているヒト重鎖染色体導入及びヒト軽鎖染色体導入の両方を持つマウスが使用でき；そのようなマウスは、例えば、Tomizuka et al. (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727に記載されている。更に、ヒト重鎖及び軽鎖染色体導入を持つ雌ウシは、当該技術で記載されており(Kuroiwa et al. (2002), Nature Biotechnology 20: 889-894)、そして本発明の抗ＣＤ４４抗体を産生させるのに使用可能である。

【０１４２】

本発明のヒトモノクローナル抗体も、ヒト抗体応答が免疫付与の際に発生し得るようにヒト免疫細胞を再構成している、ＳＣＩＤマウスを用いて調製することができる。そのようなマウスは、例えば、米国特許第５４７６９９６号及び米国特許第号５６９８７６７号に記載されている。

【０１４３】

ヒトＩｇマウスの免疫感作

動物のＣＤ４４抗原による免疫後、抗体及び／又は抗体産生細胞が動物から得られ得る。幾つかの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体含有血清が、動物の出血又は犠牲により動物から得られる。血清は動物から得られたまま使用してもよく、またその血清から免疫グロブリン画分を得たり、又は抗ＣＤ４４抗体を精製することができる。

【０１４４】

幾つかの実施態様では、抗体産生不死化細胞系は、免疫動物から単離した細胞から作製することができる。免疫後、動物を犠牲にし、そしてリンパ節及び／又は脾臓Ｂ細胞を業界で公知の任意の手段で不死化する。細胞の不死化方法には、腫瘍遺伝子によるそれらのトランスフェクション、腫瘍ウイルスへのそれらの感染、不死化細胞を選択する条件下でのそれらの培養、発がん性又は変異原性化合物へのそれらの曝露、不死化細胞、例えば骨髄腫細胞とそれらの融合、及び腫瘍抑制遺伝子の不活性化が含まれるが、これらに限定されない。例えば、上記のHarlow and Laneを参照されたい。骨髄腫細胞との融合を使用する場合、骨髄腫細胞は、好ましくは免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない(非分泌細胞系)。不死化細胞は、ＣＤ４４、その一部分、又はＣＤ４４を発現する細胞を用いてスクリーニングされる。１つの好ましい実施態様では、ＣＤ４４部分は：（ｉ）ＣＤ４４の

ＨＡ結合部位を含み；（ｉｉ）配列番号１及び／又は配列番号２で示した完全又は切り詰められたアミノ酸配列；（ｉｉｉ）又はその組み合わせを含む。１つの実施態様では、初期スクリーニングが、酵素結合免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）又はラジオイムノアッセイを用いて行なわれる。ＥＬＩＳＡスクリーニングの１例は、ＰＣＴ国際公開００/３７５０４号に与えられている。

【０１４５】

抗ＣＤ４４抗体産生細胞、例えばハイブリドーマは、選択され、クローニングされ、そして更にロバスト成長、抗体高生産を含む望ましい特性及び更に下記で論じる望ましい抗体特性を得るためにスクリーニングされる。ハイブリドーマは、インビボの同系動物、免疫系を欠く動物において、例えばヌードマウスにおいて、又はインビトロの細胞培養において、増殖させることができる。ハイブリドーマを選択し、クローニングし、そして増殖させる方法は当業者によく知られている。

【０１４６】

１つの実施態様では、免疫動物はヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する非ヒト動物であり、そして脾臓Ｂ細胞は非ヒト動物と同じ種由来の骨髄腫細胞系に融合される。より好ましい実施態様では、免疫動物はKirin TCマウス™のマウスであり、また骨髄腫細胞系は非分泌マウス骨髄腫である。更になお好ましい実施態様では、骨髄腫細胞系は、Ｓｐ２／０－Ａｇ１４（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ＡＴＣＣ）ＣＲＬ－１５８１）であり、そしてマウスハイブリドーマ細胞系は、１３７６.３.２ｄ１.Ａ３.Ｄ１２.（ＡＴＣＣ　Ｎｏ.ＰＴＡ－６９２８）、１３７６.３.１Ａ９.Ａ６.Ｂ９（ＡＴＣＣ　Ｎｏ.ＰＴＡ－６９２９）又は１３７６.２.１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４.（ＡＴＣＣ　Ｎｏ.ＰＴＡ－６９２７）である。例えば、実施例１を参照されたい。

【０１４７】

従って、１つの実施態様では、本発明は、（ａ）本明細書に記載の非ヒトトランスジェニック動物をＣＤ４４、ＣＤ４４の一部分又はＣＤ４４を発現する細胞若しくは組織で免疫すること；（ｂ）トランスジェニック動物にＣＤ４４に対する免疫応答の組み込みを可能にすること；（ｃ）トランスジェニック動物から抗体産生細胞を単離すること；（ｄ）抗体産生細胞を不死化すること；（ｅ）不死化抗体産生細胞の個々のモノクローナル集団を作出すること；及び（ｆ）ＣＤ４４に対する抗体を同定する不死化抗体産生細胞をスクリーニングすること：を含む、ＣＤ４４に対するヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を産生する細胞系を生産する方法を提供する。１つの実施態様では、工程（ｆ）は、ＣＤ４４のＨＡ結合部位に向けられた、そして場合により、ＣＤ４４のＨＡ結合部位の外で結合しない、抗体を同定する不死化抗体産生細胞をスクリーニングすることを含む。

【０１４８】

ＣＤ４４のＨＡ結合部位に向けられた抗体を同定する、不死化抗体産生細胞をスクリーニングすることは、細胞により産生する抗体がＣＤ４４のＨＡ結合部位のアミノ酸配列を含むペプチドに結合するか否かを試験することによって達成することができる。

【０１４９】

別の側面では、本発明は、ヒト抗ＣＤ４４抗体を産生するハイブリドーマを提供する。１つの実施態様では、ハイブリドーマにより産生するヒト抗ＣＤ４４抗体は、ＣＤ４４のアンタゴニストである。尚別の実施態様では、ハイブリドーマにより産生されるヒト抗ＣＤ４４抗体は、（ｉ）ＣＤ４４のＨＡ結合部位に結合し；（ｉｉ）ＨＡ結合部位の外では結合せず；（ｉｉｉ）ＩＭ７結合部位には結合しないか；又は（ｉｖ）その組み合わせに結合しない。Mikecz et al., (1999), Arthritis Rheumatism 42: 659, 668, Zheng (1995), J. Cell Biol. 130: 485-495, Peach et al., (1993), J. Cell Biol. 122: 257-264及び米国特許第６００１３５６号。１つの実施態様では、ハイブリドーマは上記のようにマウスのハイブリドーマである。他の実施態様では、ハイブリドーマは他の動物で産生される。

【０１５０】

本発明の１つの実施態様では、抗体産生細胞は、単離され、宿主細胞、例えば骨髄腫細

胞中で発現される。尚別の実施態様では、トランスジェニック動物はＣＤ４４で免疫され、初代細胞（例えば、脾臓又は末梢血液細胞）は免疫トランスジェニック動物から単離され、そして所望の抗原に特異的な抗体を産生する個々の細胞が同定される。各個別の細胞由来のポリアデニル化ｍＲＮＡが単離され、そして逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）が、可変領域配列にアニールするセンスプライマー、例えばヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子のＦＲ１領域の大部分又は全部を認識する縮重プライマー、及び定常及び連結領域配列にアニールするアンチセンスプライマーを用いて行なわれる。次いで、重鎖及び軽鎖可変ドメインのｃＤＮＡがクローニングされ、重鎖及びκ又はλ定常ドメインなどのそれぞれの免疫グロブリン定常領域を持つキメラ抗体として、いずれかの好適な宿主細胞、例えば骨髄腫細胞で発現させる。Babcook, J.S. et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-48を参照されたい。次いで、抗ＣＤ４４抗体は、本明細書に記載のように同定され単離される。

【０１５１】

抗体を生産する組換え法

本発明の抗体、又は抗体結合部分は、宿主細胞での免疫グロブリン軽鎖及び重鎖遺伝子の組換え発現により作製することができる。例えば、抗体を組換え技術で発現させるために、軽鎖及び重鎖が宿主細胞に発現するように、抗体の免疫グロブリン軽鎖及び重鎖をコードするＤＮＡフラグメントを持つ、１つ又はそれ以上の組換え発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクトし、そして好ましくは宿主細胞を培養した培地においてそれを分泌させ、その培地から抗体を回収することができる。標準的な組換えＤＮＡ法は、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子を得るために、これらの遺伝子を組換え発現ベクターに組み込むために、そしてベクターを、Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)「分子クローニング；実験室マニュアル、第二版（Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition）」、Ausubel, F. M. et al. (eds.) , Greene Publishing Associates, (1989),「分子生物学における最近のプロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）」及び米国特許第４８１６３９７号に記載のものなどの宿主細胞に導入するために使用される。

【０１５２】

変異及び修飾

本発明のＣＤ４４抗体を発現させるため、先ずV_H及びV_L領域をコードするＤＮＡフラグメントを、上記のいずれかの方法を用いて得ることができる。また、種々の修飾、例えば突然変異、欠失及び／又は付加を、当業者によく知られた標準的な方法を用いてＤＮＡ配列に導入することができる。例えば、突然変異誘発は、ＰＣＲ介在性突然変異誘発などの標準的な方法を用いて行なわれ、この場合、変異ヌクレオチドは、ＰＣＲ産物が所望の突然変異又は部位特異的突然変異誘発を含むように、ＰＣＲプライマーに組み込まれる。

【０１５３】

行なわれる可能性のある置換の１つのタイプは、例えば限定されないが、アラニン又はセリンなどの別の残基に対して化学的に反応性の高い、抗体内の１つ又はそれ以上のシステインを変えることである。例えば、非カノニカルシステインの置換があり得る。この置換は、可変ドメインのＣＤＲ若しくはフレームワーク領域内、又は抗体の定常ドメイン内でさせることができる。幾つかの実施態様では、システインはカノニカルである。

【０１５４】

抗体は、例えば重鎖及び／又は軽鎖の可変ドメインにおいて、例えば抗体の結合特性を変えるために修飾することもできる。例えば、突然変異は、ＣＤ４４に対する抗体のK_Dを増加させ又は減少させるために、k_{off}を増加させ若しくは減少させるために、又は抗体の結合特性を変えるために、１つ又はそれ以上のＣＤＲ領域において行なわせることができる。部位特異的突然変異誘発の技術は、業界でよく知られている。例えば、上記のSambrook et al. 及び Ausubel et al.,を参照されたい。

【０１５５】

突然変異の修飾は、ＣＤ４４の半減期を増加させるために、フレームワーク領域又は定

常ドメインにて行なうことができる。例えば、ＰＣＴ国際公開第００／０９５６０号を参照されたい。フレームワーク領域又は定常ドメインの突然変異も、抗体の変異原性を変えるため、別の分子に対する共有結合又は非共有結合の部位を与えるため、又は相補体結合（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　ｆｉｘａｔｉｏｎ）、ＦｃＲ結合及び抗体依存性媒介細胞傷害（ＡＤＣＣ）などの特性を変えるために行うことができる。本発明によれば、単一抗体は、可変ドメイン又は定常ドメインのＣＤＲ又はフレームワーク領域のいずれか１つに突然変異を有してもよい。

【０１５６】

「生殖細胞系化（ｇｅｒｍｌｉｎｉｎｇ）」として知られる方法において、V_H及びV_L配列における特定のアミノ酸は、生殖細胞系のV_H及びV_L配列に元々見出されるものにマッチさせるように突然変異させ得る。特に、V_H及びV_L配列におけるフレームワーク領域のアミノ酸配列は、抗体を投与する場合に、免疫原性のリスクを下げるために、生殖細胞系配列を一致させるように突然変異させ得る。ヒトV_H及びV_L遺伝子の生殖細胞系ＤＮＡ配列は業界で公知である。例えば、「Vbase」ヒト生殖細胞系配列データベースを参照されたい。また、Kabat, E. A., et al. (1991), Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242「免疫学関連のタンパク質の配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）」; Tomlinson et al., (1992), J. Mol. Biol. 227: 776-798; Cox et al., (1994), Eur. J. Immunol. 24: 827-836を参照されたい。

【０１５７】

実施できる別なタイプのアミノ酸置換は、抗体の潜在的タンパク質分解部位を除去することである。そのような部位は、可変ドメインのＣＤＲ若しくはフレームワーク領域又は抗体の定常ドメインである。システイン残基の置換及びタンパク質分解部位の除去は抗体産物において異種性のリスクを低下でき、その結果、その同種性を増加させる。別なタイプのアミノ酸置換は、潜在的な脱アミド化部位を形成するアスパラギン－グリシン対を、残基の１つ又は両方を変えることにより除去することである。別の実施態様では、本発明のＣＤ４４抗体の重鎖のＣ末端リジンが切断し得る。本発明の種々の実施態様では、ＣＤ４４抗体の重鎖及び軽鎖は、場合によりシグナル配列を含んでもよい。

【０１５８】

本発明のV_H及びV_LセグメントをコードするＤＮＡフラグメントが得られると、これらのＤＮＡフラグメントは更に標準的な組換えＤＮＡ法により操作され、例えば、可変領域遺伝子を、完全長抗体鎖遺伝子に、Ｆａｂフラグメント遺伝子に、又はｓｃＦｖ遺伝子に変換することができる。これらの操作において、V_L－又はV_Hコード化ＤＮＡフラグメントは、抗体定常領域又はフレキシブルリンカーなど別のタンパク質をコードする別のＤＮＡフラグメントに機能可能に連結される。この関連で使用される「機能可能に連結した」の用語は、２つのＤＮＡフラグメントが、２つのＤＮＡフラグメントによりコードされるアミノ酸配列が、フレームに残るように連結されることを意味するものとする。

【０１５９】

V_H領域をコードする単離されたＤＮＡは、V_Hコード化ＤＮＡを重鎖定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３）をコードする別のＤＮＡ分子に操作可能に連結することにより、完全長重鎖遺伝子に変換し得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、業界で公知であり（例えば、Kabat, E. A., et al. (1991), Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、「免疫学関連のタンパク質の配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）」を参照されたい)、そしてこれらの領域を包含するＤＮＡフラグメントは標準的なＰＣＲ増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ定常領域であるが、最も好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ２定常領域である。ＩｇＧ１定常領域配列は、Ｇｍ（１）、Ｇｍ（２）、Ｇｍ（３）、及びＧｍ（１７）など、異なる個体間に生じることが知られる種々のアレル又はアロタイプのいずれかであり得る。これらのアロタイプは、ＩｇＧ１定常領域において天然アミノ酸置換を呈する。Ｆａｂフラグ

メント重鎖遺伝子では、V_Hコード化ＤＮＡは、重鎖ＣＨ１定常領域だけをコードする別のＤＮＡ分子に機能可能に連結することができる。ＣＨ１重鎖定常領域は、いずれの重鎖遺伝子に由来してもよい。

【０１６０】

V_L領域をコードする単離されたＤＮＡは、V_Lコード化ＤＮＡを軽鎖定常領域、C_Lをコードする別のＤＮＡ分子に機能可能に連結して、完全長軽鎖遺伝子（並びにＦａｂ軽鎖遺伝子）に変換し得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、業界で公知であり(例えば、Kabat, E. A., et al. (1991), Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242「免疫学関連のタンパク質の配列（Sequences of Proteins of Immunological Interest）」を参照されたい)、そしてこの領域を包含するＤＮＡフラグメントは、標準的なＰＣＲ増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパ又はラムダ定常領域であり得る。カッパ定常領域は、Ｉｎｖ（１）、Ｉｎｖ（２）、及びＩｎｖ（３）などの異なる個体に生じることが知られる種々のアレルのいずれかであり得る。ラムダ定常領域は３つのラムダ遺伝子のうちいずれの由来であってもよい。

【０１６１】

ｓｃＦｖ遺伝子を作出するために、V_H－及びV_L－コード化ＤＮＡフラグメントは、フレキシブルリンカーをコードする、例えばV_H及びV_L配列が、フレキシブルリンカーで連結されるV_L及びV_H領域で、連続した単鎖タンパク質として発現し得るようにアミノ酸配列（Gly_4－Ｓｅｒ）$_3$をコードする、別のフラグメントに機能可能に連結される（例えば、Bird et al., (1988), Science 242: 423 426, Huston et al., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883, McCafferty et al., (1990), Nature 348: 552-554を参照されたい）。単鎖抗体は、単一V_H及びV_Lのみが使用される場合は一価であり、２つのV_H及びV_Lが使用される場合は二価であり、又は２つ以上のV_H及びV_Lが使用される場合は多価であり得る。ＣＤ４４及び別の分子に特異的に結合する二重特異性抗体及び多価抗体が生成され得る。

【０１６２】

別の実施態様では、別のポリペプチドに連結される本発明のＣＤ４４抗体の全部又は一部を含む融合抗体、又はイムノアドヘシンを作製することができる。別の実施態様では、ＣＤ４４抗体の可変ドメインだけがポリペプチドに連結される。別の実施態様では、ＣＤ４４抗体のV_Hドメインは第１ポリペプチドに連結されるが、一方でＣＤ４４抗体のV_Lドメインは、V_H及びV_Lドメインが抗原結合部位を形成するために互いに相互作用できるような様式で、第１ポリペプチドと結合する第２ポリペプチドに連結される。別の好ましい実施態様では、V_Hドメインは、V_H及びV_Lドメインが互いに相互作用できるように、リンカーによりV_Lドメインから単離される。V_H－リンカー－V_L抗体は、次いで関係するポリペプチドに連結される。加えて、２つ（又はそれ以上の）単鎖抗体が互いに連結された融合抗体が作出できる。これは、単一ポリペプチド鎖に二価又は多価の抗体を作出したい場合、又は二重特異性抗体を作出したい場合に有用である。

【０１６３】

他の実施態様では、他の修飾抗体が核酸分子をコードするＣＤ４４抗体を用いて作製し得る。例えば、「カッパ抗体」（Ill et al., (1997), Protein Eng. 10: 949-57）、「ミニ抗体」（Martin et al., (1994), EMBO J. 13: 5303-9）、「二重特異性抗体」（Holliger P. et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 6448）、又は「ジヤヌシン」（Traunecker et al., (1991), EMBO J. 10: 3655-3659及び Traunecker et al., (1992) Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51-52）は、明細書の教示に従って標準的な分子生物学的技術を用いて作製することができる。

【０１６４】

本発明の二重特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ハイブリドーマの融合又はＦａｂ’フラグメントの結合を含む様々な方法によって生産することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, (1990), Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321及びKostelny et al., (1992), J. Immunol. 148: 1547-1553を参照されたい。加えて、二重特異性抗体は、「二

重特異性抗体」又は「ジヤヌシン」として形成することができる。幾つかの実施態様では、二重特異性抗体はＣＤ４４の２つの異なるエピトープに結合する。幾つかの実施態様では、上記の修飾抗体は、本明細書において与えられるヒトＣＤ４４から、１つ又はそれ以上の可変ドメイン又はＣＤＲ領域を用いて調製される。

【０１６５】

ベクター及び宿主細胞

本発明の抗体及び抗原結合部分を発現させるために、本明細書に記載のように得られる部分又は完全長軽鎖及び重鎖をコードするＤＮＡが、遺伝子が転写及び翻訳調節配列に機能可能に連結されるように発現ベクターに挿入される。これに関連して、「機能可能に連結」の用語は、ベクター内の転写及び翻訳調節配列が抗体遺伝子の転写及び翻訳を調節するそれらの意図した機能の役割を果たすように、ベクターにライゲートされることを意味するものとする。発現ベクター及び発現調節配列は、使用する発現宿主細胞に適合するように選択される。発現ベクターとしては、例えばプラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルスなどの植物ウイルス、コスミド、ＹＡＣ、ＥＢＶ由来エピソームを含む。抗体遺伝子は、ベクター内の転写及び翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳を調節するそれらの意図した機能の役割を果たすように、ベクターにライゲートされる。発現ベクター及び発現調節配列は、使用する発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入することができる。好ましい実施態様では、両遺伝子は同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は標準方法により発現ベクターに挿入される（例えば、抗体遺伝子フラグメント及びベクターでの相補的制限部位のライゲーション、又は制限部位が存在しない場合の平滑末端ライゲーション）。

【０１６６】

好都合なベクターは、V_H又はV_L配列のいずれかが上記のように容易に挿入されて発現できるように操作された適切な制限部位を有する、機能的に完全なヒトC_H又はC_L免疫グロブリン配列をコードするものである。そのようなベクターでは、挿入Ｊ領域のスプライスドナー部位とヒトＣ領域に先立つスプライスアクセプター部位間で、スプライシングが通常生じ、そしてまた、ヒトC_Hエキソン内に起こるスプライス領域でも生じる。ポリアデニル化及び転写終結は、コーディング領域の自然の染色体部位下流で起こる。組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進する、シグナルペプチドをコードすることもできる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドがインフレームで免疫グロブリン鎖のアミノ末端に連結されるように、ベクターにクローニングされる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド又は異種のシグナルペプチド（即ち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であってもよい。

【０１６７】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞の抗体鎖遺伝子の発現を調節する調節配列を有する。当業者には当然のことながら、調節配列の選択を含む発現ベクターのデザインは、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子に依存する可能性がある。哺乳類宿主細胞発現のための好ましい調節配列としては、レトロウイルスＬＴＲ、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）（ＣＭＶプロモーター／エンハンサーなど）、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）（ＳＶ４０プロモーター又はエンハンサーなど）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ））、ポリオーマ及び自然免疫グロブリンなどの強力哺乳類プロモーター並びにアクチンプロモーターなどの、哺乳類細胞において高レベルのタンパク質発現を導くウイルスエレメントを含む。ウイルス調節エレメント、及びその配列の更なる記載については、例えば米国特許第５１６８０６２号、米国特許第４５１０２４５号及び米国特許第４９６８６１５号を参照されたい。プロモーター及びベクターの記述を含み、植物における抗体発現方法、並びに植物の形質転換は、業界で公知である。例えば、米国特許第６５１７５２９号を参照されたい。細菌細胞又は真菌細胞、例えば、酵母細胞におけるポリペプチドの発現方法も、業界では周知である。

【０１６８】
抗体鎖遺伝子及び調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞（例えば、複製の起源）におけるベクターの複製及び選択マーカー遺伝子を調節する配列などの更なる配列を有してもよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第４３９９２１６号、米国特許第４６３４６６５号及び米国特許第５１７９０１７号を参照）。例えば、一般的に選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞で、Ｇ４１８、ハイグロマイシン又はメトトレキサートなどの薬物に対する抵抗性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子（メトトレキサート選択／増幅によりｄｈｆｒ宿主細胞で用いる）、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（Ｇ４１８選択用）、及びグルタミン酸シンターゼ遺伝子を含む。

【０１６９】
ＣＤ４４抗体をコードする核酸分子及びこれらの核酸分子を含むベクターは、適切な哺乳類、植物、細菌又は酵母宿主細胞のトランスフェクションに使用することができる。形質転換は、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する、いずれの公知の方法によっても行うことができる。異種ポリヌクレオチドの哺乳類細胞への導入方法は業界でよく知られており、またデキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリポソームへのカプセル化、及び核へのＤＮＡの直接マイクロインジェクションを含む。加えて、核酸分子は、ウイルスベクターにより哺乳類細胞に導入してもよい。細胞の形質転換方法は業界でよく知られている。例えば、米国特許第４３９９２１６号、米国特許第４９１２０４０号、米国特許第４７４０４６１号及び米国特許第４９５９４５５号を参照されたい。植物細胞の形質転換方法は業界でよく知られており、例えば、アグロバクテリウム媒介形質転換、バイオリスティック形質転換、直接注入、エレクトロポレーション及びウイルス形質転換を含む。細菌及び酵母細胞の形質転換方法も業界でよく知られている。

【０１７０】
発現用宿主として利用できる哺乳類細胞は業界で周知であり、そしてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ＡＴＣＣ）から入手できる多くの不死化細胞系を含む。これらには、例えばチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＮＳＯ細胞、ＳＰ２細胞、ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞、ＮＩＨ－３Ｔ３細胞、ＨｅＬａ細胞、子ハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞がん細胞（例えば、Ｈｅｐ　Ｇ２）、Ａ５４９細胞、及び多数の他の細胞系が含まれる。特に好ましい細胞系は、どの細胞系が高い発現レベルを有するかを決定することにより選択される。使用される他の細胞としては、Ｓｆ９又はＳｆ２１細胞などの昆虫細胞系がある。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入する場合、宿主細胞に抗体を発現するのに十分な一定期間宿主細胞を培養することにより、又はより好ましくは宿主細胞が増殖する培地への抗体の分泌により、抗体が生産される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて培地から回収できる。植物宿主細胞は、例えばタバコ、Arabidopsis属、アオウキクサ、トウモロコシ、小麦、ジャガイモなどを含む。細菌宿主細胞は、大腸菌及びストレプトミセス属を含む。酵母宿主細胞は、シゾサッカロミセス・ポンベ、サッカロミセス・セレビジエ及びピチア・パストリスを含む。

【０１７１】
更に、生産細胞系からの本発明の抗体の発現は、多くの公知技術を用いて促進される。例えば、グルタミンシンターゼ（ＧＳ系）及びＤＨＦＲ遺伝子発現系は、特定の条件下に発現を促進する一般的なアプローチである。高発現細胞クローンは、限定希釈クローニング及びMicrodrop法などの従来技術を用いて同定することができる。ＧＳ系は、欧州特許第０２１６８４６号、欧州特許第０２５６０５５号、欧州特許第０３２３９９７号及び欧州特許第０３３８８４１号で論じられている。

【０１７２】

異なる細胞系に又はトランスジェニック動物に発現する抗体は、互いに異なるグリコシル化を有するようである。しかしながら、本明細書で与えられる核酸分子によってコードされ、又は本明細書で与えられるアミノ酸を含む、抗体は、全て抗体のグリコシル化とは無関係に本発明の一部である。

【０１７３】

ファージ・ディスプレイ・ライブラリー

本発明は、ファージ上のヒト抗体のライブラリーを合成し、ＣＤ４４又はその一部でライブラリーをスクリーニングし、ＣＤ４４に結合するファージを単離し、そしてファージから抗体を取得する工程を含む、抗ＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分を生産する方法を提供する。例証として、ファージディスプレイ法で使用するための、抗体ライブラリーを作成する１つの方法は、免疫応答を誘導するために、ＣＤ４４又はその抗原部分を有するヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒト動物を免疫し、免疫動物から抗体産生細胞を抽出し、抽出細胞から本発明の抗体の重鎖及び軽鎖をコードするＲＮＡを単離し、ｃＤＮＡを産生するＲＮＡを逆転写し、プライマーを用いてｃＤＮＡを増幅し、そして抗体がファージに発現するようにファージ・ディスプレイ・ベクターにｃＤＮＡを挿入する工程を含む。本発明の組換え抗ＣＤ４４抗体は、このような方法で得ることができる。

【０１７４】

本発明の組換え抗ＣＤ４４抗体は、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより単離できる。好ましくは、このライブラリーは、ｓｃＦｖファージ・ディスプレイ・ライブラリーであり、Ｂ細胞より単離されたｍＲＮＡから調製したヒトV_L及びV_HｃＤＮＡを用いて生成される。そのようなライブラリーを作成しスクリーニングする方法は、業界で公知である。ファージ・ディスプレイ・ライブラリーを生成させるキットは、市販されている（例えば、Pharmacia組換えファージ抗体システム、カタログ番号２７－９４００－０１；及びStratagene SurfZAP(登録商標)ファージ・ディスプレイ・キット、カタログ番号２４０６１２）。また、抗体ディスプレイライブラリーを生成させスクリーニングするのに使用することができる他の方法及び試薬もある（例えば、米国特許第５２２３４０９号、ＰＣＴ国際公開第９２／１８６１９号、同国際公開第９１／１７２７１号、同国際公開第９２／２０７９１号、同国際公開第９２／１５６７９号、同国際公開第９３／０１２８８号、同国際公開第９２／０１０４７号、及び同国際公開第９２／０９６９０号； Fuchs et al., (1991), Bio/Technology 9: 1370 1372; Hay et al., (1992), Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81 85; Huse et al., (1989), Science 246: 1275 1281; McCafferty et al., (1990), Nature 348: 552 554; Griffiths et al., (1993), EMBO J. 12:725 734; Hawkins et al., (1992), J. Mol. Biol. 226: 889 896; Clackson et al., (1991), Nature 352: 624 628; Gram et al., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576 3580; Garrad et al., (1991), Bio/Technology 9: 1373 1377; Hoogenboom et al., (1991), Nuc. Acid Res. 19: 4133 4137; and Barbas et al., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978 7982を参照されたい）。

【０１７５】

所望の特性を有するヒト抗ＣＤ４４抗体を単離させ生産する１つの実施態様では、最初に本明細書に記載のヒト抗ＣＤ４４抗体を、ＰＣＴ国際公開第９３／０６２１３号に記載のエピトープインプリンティング法を用いて、ＣＤ４４に対して類似の結合活性を有するヒト重鎖及び軽鎖配列を選択するために使用する。本方法で使用される抗体ライブラリーは、好ましくはＰＣＴ国際公開第９２／０１０４７号、McCafferty et al., Nature 348: 552 554 (1990); and Griffiths et al., EMBO J. 12: 725 734 (1993)に記載のように調製され、スクリーニングされたｓｃＦｖライブラリーである。このｓｃＦｖ抗体ライブラリーは、抗原としてヒトＣＣＲ２を用いて好適にスクリーニングされる。

【０１７６】

一旦、最初のヒトV_L及びV_Hドメインが選択されれば、「ミックス及びマッチ」実験が行なわれ、ここでは最初に選択されたV_L及びV_Hセグメントの異なる対が、好ましいV_L／V_H対組合せを選択するＣＤ４４結合についてスクリーニングされる。加えて、抗体の

質を更に改善するために、好ましいV_L／V_H対のV_L及びV_Hセグメントが、ランダムに、好ましくはV_H及び／又はV_LのＣＤＲ３領域内で、自然免疫応答の間の抗体の親和性成熟に関与するインビボ体細胞突然変異プロセスに類似の方法で変異される。このインビトロ親和性成熟は、それぞれV_HＣＤＲ３又はV_LのＣＤＲ３に相補性のＰＣＲプライマーを用いて、V_H及びV_Lドメインを増幅することにより達成し得るが、このプライマーは、得られるＰＣＲ産物がランダム変異をV_H及び／又はV_LのＣＤＲ３領域へ導入するV_H及びV_Lセグメントをコードするように、特定の位置で４つのヌクレオチド塩基のランダム混合物で「スパイク」されている。これらのランダム変異V_H及びV_Lセグメントが、ＣＤ４４への結合のためにスクリーニングされる。

【０１７７】

組換え免疫グロブリン・ディスプレイ・ライブラリーからの本発明の抗ＣＤ４４抗体のスクリーニング及び単離の後、選択された抗体をコードする核酸は、ディスプレイパッケージから(例えば、ファージゲノムから)回収され、そして標準的な組換えＤＮＡ法により他の発現ベクターへサブクローニングされる。所望により、核酸は、下記のように、本発明の他の抗体型を作出するために更に操作できる。組合せライブラリーのスクリーニングにより単離された組換えヒト抗体を発現させるために、抗体をコードするＤＮＡは、上記のように、組換え発現ベクター中にクローニングされ、そして哺乳類宿主細胞へ導入される。

【０１７８】

脱免疫化抗体

本発明の別の態様では、抗体又はその抗原結合部分は、例えば、ＰＣＴ国際公開第９８／５２９７６号及び同国際公開第００／３４３１７号に記載の方法を用いて、それらの免疫原性を低減するために、脱免疫化することができる。

【０１７９】

誘導化及び標識抗体

本発明の抗ＣＤ４４抗体又は抗原結合部分は、別の分子（例えば、別のペプチド又はタンパク質）に誘導化し又は連結し得る。一般的に、ＣＤ４４結合が誘導化又は標識化により悪影響を受けないように、抗体又はその抗原結合部分は誘導化される。従って、本発明の抗体又は抗原結合部分は、本明細書に記載のヒトＣＤ４４抗体のインタクトの及び修飾型の両方を含むものとする。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分は、別の分子（例えば、二重特異性抗体又は二重特異抗体）、検出試薬、標識、細胞毒性剤、薬剤、抗体又は抗原結合部分と、別の分子（ストレプトアビジンコア領域又はポリヒスチジンタグなど）との結合を媒介できるタンパク質又はペプチド及び／又は輸送タンパク質（例えば、血液タンパク質、アルブミン又はトランスフェリン）などの、１つ又はそれ以上の他の分子的実体に機能的に連結（化学的結合、遺伝子融合、非共有結合などにより）し得る。

【０１８０】

誘導化抗体の１つのタイプは、２つ又はそれ以上の抗体（同じタイプ又は異なるタイプ、例えば、二重特異性抗体を作出するため）を架橋結合することにより生産される。好適な架橋剤は、適切なスペーサーで隔てられた２つの際立って反応性の高い基（例えば、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）を有する、ヘテロ二官能性又はホモ二官能性（例えば、ジスクシンイミジルスベラート）のものを含む。そのようなリンカーは、Pierce Chemical Company, Rockford, ILから市販されている。

【０１８１】

誘導化抗体の別のタイプは標識抗体である。本発明の抗体又は抗原結合部分が誘導化され得る有用な検出試薬は、例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、５－ジメチルアミン－１－ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリン、ランタニドリン光体を含む、蛍光化合物を含む。抗体は、また、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなど検出に有用な酵素で標識し得る。抗体を検出酵素で標識する場合、抗体は、酵素が使用して識別できる反応生成物を生産する追加の試薬を加え

ることにより検出される。例えば、試薬のセイヨウワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素及びジアミノベンジジンの添加は、検出可能な着色反応生成物を生成させる。抗体は、またビオチンで標識可能であり、そしてアビジン又はストレプトアビジン結合の間接測定を介して検出される。抗体は、また、二次レポーター（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）で認識される所定のポリペプチドエピトープで標識可能である。幾つかの実施態様では、標識は、潜在的な立体障害を小さくするために、種々の長さのスペーサーアームによって結合される。ＣＤ４４抗体は、また、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、メチル基若しくはエチル基、又はカルボキシル基などの化学基により誘導化し得る。これらの基は、抗体の生物学的特性を改善する、例えば血清半減期を増加させるのに有用である。

【０１８２】

薬剤組成物及び投与

本発明は、また、異常細胞浸潤の治療に有効な本明細書に記載のＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分、及び薬学的に許容される担体の有効量を含む、ヒトを含む哺乳類における異常細胞浸潤の治療のための薬剤組成物を提供する。好ましい組成物は、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、肉芽種性疾患、多発性硬化症、喘息、クローン病、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、尋常性乾癬及びがんなどの、１つ又はそれ以上の様々な炎症性及び自己免疫疾患を有する患者に、治療上の利益を提供する。

【０１８３】

本発明の抗体又は抗原結合部分は、例えばＰＣＴ国際公開第２００６／０９６４８８号及びその引用文献に記載の、対象（ｓｕｂｊｅｃｔ）への投与に適する薬剤組成物に組み込むことができる。通常は、薬剤組成物は、本発明の抗体又は抗原結合部分、並びにタンパク質安定性、溶解性及び生物活性を維持するのに適する、薬学的に許容される担体を含む。本明細書に使用される、「薬学的に許容される担体」は、ありとあらゆる溶剤、分散媒体、被覆剤、抗細菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤、及び生理的適合性のその他のものを意味する。薬学的に許容される担体の幾つかの例は、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセリン、エタノールなど、並びにその組合せである。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、又は塩化ナトリウムを含むのが好ましい。薬学的に許容される物質の更なる例は、湿潤剤、又は湿潤剤又は乳化剤などの微量の補助物質、保存剤、アミノ酸を含む緩衝剤、及びキレート剤、例えばＥＤＴＡ、ＤＴＰＡ、ＤＦＭ及びその混合物であり、それらは抗体の貯蔵期限又は有効性を増強する。１つの実施態様では、薬剤組成物は、ＩｇＧ、好ましくはIgG_1又はIgG_2、モノクローナル抗体及び薬学的に許容されるキレート剤を含む。抗体の代表的なモル濃度は、約０.０００６ミリモルから約１.３５ミリモルまでの範囲であり、キレート剤のモル濃度は、約０.００３ミリモルから約５０ミリモルまでの範囲であり、そしてキレート剤に対する抗体のモル比は、約０.０００００１から約２０００までの範囲である。

【０１８４】

本発明の組成物は、様々な形態、例えば液剤(例えば、注射用及び注入用液剤)、分散剤又は懸濁剤、錠剤、丸剤、散剤、リポソーム及び坐剤などの、液体、半固体及び固体の投与形態であってもよい。好ましい形態は意図した投与方法及び治療適応によって決まる。典型的な好ましい組成物は、ヒトの受動免疫に使用されるものと類似の組成物のような、注射用及び注入用液剤の形態である。好ましい投与方法は非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい実施態様において、抗体は静脈内注入又は静脈内注射によって投与される。別の好ましい実施態様では、筋肉内又は皮下注射によって投与される。注射用製剤は単位投与形態、例えば保存剤の添加有り又は無しで、アンプル又は反復投与容器中に存在し得る。組成物は、懸濁剤、液剤、又は油性又は水性ビヒクル中の乳剤のような形態をとり、また懸濁化剤、安定剤及び／又は分散剤などの製剤化物質を含んでもよい。あるいは、活性成分は、使用前に、例えば、滅菌パイロジェンフリー水のような適切な賦形剤で構成される、粉末形態であってよい。

【０１８５】
治療用組成物は、典型的には、製造及び貯蔵の条件下で、無菌でかつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、又は高い薬物濃度に適した他の規定の構造として製剤化することができる。無菌の注射用液剤は、適切な溶媒中上に列挙した１つの又は組み合わせた成分と共に、必要量のＣＤ４４抗体を組込み、必要ならば続いて濾過滅菌することにより調製することができる。一般的に、分散剤は、基本分散媒及び上に列挙したものの内の必要な他の成分を含有する無菌のビヒクルに、活性化合物を組込むことにより調製される。無菌の注射用液剤の調製用の無菌の散剤の場合では、好ましい調製方法は、活性成分プラス任意の所望の追加成分の粉末を、あらかじめ滅菌濾過したそれらの溶液から与える、減圧乾燥及び凍結乾燥である。溶液の適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用により、分散剤の場合には所要の粒径の維持により、また界面活性剤の使用により維持し得る。注射用組成物の持続した吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸及びゼラチンを入れることにより、もたらすことができる。

【０１８６】
本発明の抗体又は抗原結合部分は、業界で公知の様々な方法によって投与することができるが、多くの治療適用にとって、好ましい投与経路／投与方法は、皮下、筋肉内、又は静脈内注入である。当業者には当然のことながら、投与経路／投与方法は、所望する結果によって変わる可能性がある。

【０１８７】
特定の実施態様では、本発明の抗体組成物は、インプラント、経皮パッチ、及びマイクロカプセルデリバリーシステムを含む制御放出製剤などの、抗体を急速な放出から保護する担体を用いて調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性高分子が使用できる。そのような製剤の多数の調製方法は、一般的に当業者に公知である。例えば、J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978の「持続及び制御放出ドラッグデリバリーシステム（Sustained and Controlled Release Drug Delivery System）」を参照されたい。

【０１８８】
追加の活性化合物も、また、組成物に組込むことができる。特定の実施態様では、本発明の阻害性ＣＤ４４抗体が、１つ又はそれ以上の追加の治療薬と共に共製剤化（ｃｏ－ｆｏｒｍｕｌａｔｅｄ）及び／又は共投与（ｃｏ－ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｅｄ）される。これらの薬剤は、他の標的に結合する抗体、抗がん剤、抗血管新生薬、情報伝達阻害剤、抗増殖剤、化学療法剤、又はＣＤ４４を阻害するペプチドアナログを含むが、これらに限定されない。そのような併用療法は、阻害性ＣＤ４４抗体並びに共投与薬剤をより低い用量でしか必要とせず、このようにして、種々の単剤療法に伴う毒性又は合併症の可能性を回避し得る。

【０１８９】
本化合物は、限定されないが、シクロスポリン、ゾレドロン酸、エファリズマブ、アレファセプト、エトドラク、ロルノキシカム、ＯＭ－８９、バルデコキシブ、トシリズマブ、アバタセプト、メロキシカム、エタネルセプト、ナンブメトン（nambumetone）、リメキソロン、１５３Ｓｍ－ＥＤＴＭＰ、プロソルバ、イミダゾールサリチラート、オプレルベキン、ヒアルロン酸、ナプロキセン、ピロキシカム、ジアセレイン、ルメリコキシブ、ロフェコキシブタクロリムス、アセクロフェナク、アクタリット、テノキシカム、ロシグリタゾン、デフラザコート、アダリムマブ、レフルノミド、リセドロン酸ナトリウム、ミソプロストール及びジクロフェナク、ＳＫ－１３０６Ｘ、インフリキシマブ、アナキンラ、セレコキシブ、ジクロフェナク、エトリコキシブ及びフェルビナク、ロイマコン（reumacon）、ゴリムマブ、デノスマブ、オファツムマブ、１０ｒＴ１抗体、ペルビプロフェン、リコフェロン、テムシロリムス、エクリズマブ、イグラチモド、酢酸メチルプレドニゾロン、イブプロフェン、トリアムシノロンアセトニド、ナブメトン、オキサプロジン、オ

キシコドンｈｃｌ、フェンタニル、スリンダク、ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロネート、インドメタシン、グルコサミン、オロパタジン、オメプラゾール、アザチオプリン、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、シクロスポリン及びプレドニゾンを含む、他の抗炎症剤又はＤＭＡＲＤＳに加えて、共療法（co-therapy）（前治療、後治療又は同時治療）において、部分的に又は完全に使用され得る。他の抗炎症剤としては、４８０１５６Ｓ、ＡＡ８６１、ＡＤ１５９０、ＡＦＰ８０２、ＡＦＰ８６０、ＡＩ７７Ｂ、ＡＰ５０４、ＡＵ８００１、ＢＰＰＣ、ＢＷ５４０Ｃ、ＣＨＩＮＯＩＮ１２７、ＣＮ１００、ＥＢ３８２、ＥＬ５０８、Ｆ１０４４、ＦＫ－５０６、ＧＶ３６５８、ＩＴＦ１８２、ＫＣＮＴＥＩ６０９０、ＫＭＥ４、ＬＡ２８５１、ＭＲ７１４、ＭＲ８９７、ＭＹ３０９、ＯＮ０３１４４、ＰＲ８２３、ＰＶ１０２、ＰＶ１０８、Ｒ８３０、ＲＳ２１３１、ＳＣＲ１５２、ＳＨ４４０、ＳＩＲ１３３、ＳＰＡＳ５１０、ＳＱ２７２３９、ＳＴ２８１、ＳＹ６００１、ＴＡ６０、ＴＡＩ－９０１（４－ベンゾイル－１－インダンカルボン酸）、ＴＶＸ２７０６、Ｕ６０２５７ＵＲ２３０１０及びＷＹ４１７７０、ＣＰ－４８１７１５、ＡＢＮ－９１２、ＭＬＮ－３８９７、ＨｕＭａｘ－ＩＬ－１５、ＲＡ－１、パクリタキセル、Ｏｒｇ－３７６６３、Ｏｒｇ－３９１４１、ＡＥＤ－９０５６、ＡＭＧ－１０８、フォントリズマブ、ペグスネルセプト、プラルナカサン、アピリモド、ＧＷ－２７４１５０、ＡＴ－００１、６８１３２３（ＧＳＫ）Ｋ－８３２、Ｒ－１５０３、オクレリズマブ、ＤＥ－０９６、Ｃｐｎ１０、ＴＨＣ＋ＣＢＤ（GWpharma）、８５６５５３（ＧＳＫ）、ＲｅＮ－１８６９、免疫グロブリン、ｍｍ－０９３、アメルバント、ＳＣＩＯ－４６９、ＡＢＴ－８７４、LenkoVAX、ＬＹ－２１２７３９９、ＴＲＵ－０１５、ＫＣ－７０６、アモキサピネット及びジピリダモール、ＴＡＫ－７１５、ＰＧ７６０５６４、ＶＸ－７０２、プレドニゾロン及びジピリダモール、ＰＭＸ－５３、ベリムマブ、プリナベレル、ＣＦ－１０１、ｔｇＡＡＶ－ＴＮＦＲ：Ｆｃ、Ｒ－７８８、プレドニゾロン及びＳＳＲＩ、ＣＰ－６９０５５０及びＰＭＩ－００１などの、会社コード番号で表わされる薬剤が挙げられる。

【０１９０】

別の実施態様では、更なる治療薬として生物剤が含まれる。更なる実施態様では、１つ又はそれ以上の生物剤は、腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）アンタゴニスト、インターロイキン－１アルファ（ＩＬ－１α）アンタゴニスト、ＣＤ２８アンタゴニスト及びＣＤ２０アンタゴニストから選択される。なお更なる実施態様では、エタネルセプト（ENBREL™）、アダリムマブ（HUMIRA™）、インフリキシマブ（REMICADE™）、アナキンラ（KINERET™）、アバタセプト（ORENCIA™）、リツキシマブ（RITUXAN™）及びセルトリズマブペゴール（certolizumab pegol）（CIMZIA™）から成る群から選択される。

【０１９１】

関節リウマチ治療に、式（Ｉ）の化合物及びそれらの塩及び溶媒和物との併用で使用され得る他の薬学的に活性な薬剤の例としては：アムトルメチングアシル、ミゾリビン及びリメキソロンなどの免疫抑制剤；エタネルセプト、インフリキシマブ、ジアセレインなどの抗ＴＮＦアルファ剤；レフルノミドなどのチロシンキナーゼ阻害剤；スブレウム（subreum）などのカリクレインアンタゴニスト；オプレルベキンなどのインターロイキン１１アゴニスト；インターフェロンベータ１アゴニスト；ＮＲＤ－１０１（Aventis）などのヒアルロン酸アゴニスト；アナキンラなどのインターロイキン１受容体アンタゴニスト；アミプリロース塩酸塩などのＣＤ８アンタゴニスト；ロイマコン（reumacon）などのベータアミロイド前駆タンパク質アンタゴニスト；シペマスタットなどのマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤及びメトトレキサート、スルファサラジン、シクロスポリンＡ、ヒドロキシクロロキン、アウラノフィン、アウロチオグルコース、金チオリンゴ酸ナトリウム及ペニシラミンなど他の疾患修飾抗リウマチ薬（DMARD）が挙げられる。

【０１９２】

本発明の組成物は、本発明の抗体又は抗原結合部分の「治療的有効量」又は「予防的有効量」を含むこともできる。「治療的有効量」は、所望の治療結果を達成するための、用量での及び必要な期間の有効量を示す。抗体又は抗原結合部分の治療的有効量は、病状、

年齢、性別、及び個体の体重、及び個体の所望の反応を誘導する抗体又は抗原結合部分の能力などの因子により変動し得る。治療的有効量は、また、抗体又は抗原結合部分のいずれの毒性又は有害作用も、治療的に有益な効果を上回らないような量である。「予防的有効量」は、所望の予防結果を達成するための、用量での及び必要な期間の有効量を示す。一般的には、予防用量は、疾患に先立って又はその初期に対象に使用されることから、予防的有効量は、治療的有効量よりも小さくてもよい。

【０１９３】

用法・用量は、最適所望反応（例えば、治療又は予防反応）を与えるために調整し得る。例えば、単回ボーラス投与が可能であり、時間をかけた数回分割用量投与が可能であり、そして治療状況の緊急性により適応があれば、用量は比例的に減少又は増加できる。投与の容易性及び用量の均一性のために、投与単位形態の非経口組成物を製剤化することは特に有益である。本明細書で使用される投与単位形態は、治療しようとする哺乳類の対象に対して単位投与として適した、物理的に不連続な単位を指す；各単位は、所望の薬剤担体と共に所望の治療効果をもたらすように計算された所定量の活性化合物を含む。本発明の投与単位形態の規格は、（ａ）ＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分の類を見ない特徴及び達成すべき格別な治療又は予防効果、及びｂ）個体の感受性の治療にそのような抗体を調合する技術に固有の限界、により決定され、そしてそれらに直接依存している。

【０１９４】

本発明の抗体又は抗体部分の治療的又は予防的有効量に対する、典型的で且つ非限定的な範囲は、０．０２５から５０ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは０．１から５０ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは０．１～２５、０．１から１０、又は０．１から３ｍｇ／ｋｇである。１つの実施態様では、本発明の抗体又は抗体部分は、約５．０から約６．５の範囲のｐＨを有し、そして約１ｍｇ／ｍｌから約２００ｍｇ／ｍｌの抗体、例えば、約１ミリモルから約１００ミリモルのヒスチジン、酢酸塩又はコハク酸塩緩衝液、約０．０１ｍｇ／ｍｌから約１０ｍｇ／ｍｌのポリソルベート８０、約１００ミリモルから約４００ミリモルのトレハロース、そして約０．０１ミリモルから約１．０ミリモルのＥＤＴＡ二ナトリウム・水和物である。本発明の組成物は、場合により薬学的に許容される抗酸化剤及び／又はキレート剤を含んでもよい。好適な抗酸化剤は、メチオニン、チオ硫酸ナトリウム、カタラーゼ、及び白金を含むが、これに限定されない。例えば、組成物は、メチオニンを１ｍＭから約１００ｍＭまで、特に約２７ｍＭの濃度で含んでもよい。用量は軽減すべき状態のタイプ及び重症度に応じて変動する可能性があることに留意すべきである。更に当然のことながら、いずれの特定の対象に対しても、特定の用法・用量は、個体の必要性、及び組成物を投与する人又は投与を管理監督する人の専門的判断に従って、時間をかけて調整すべきであり、そして本明細書に記載の用量範囲は典型的なものであり、特許請求された組成物の範囲又は実施を制限することを意図するものではない。

【０１９５】

本発明の別の側面は、本発明のＣＤ４４抗体又は抗原結合部分を含むキット、又はそのような抗体又は抗原結合部分を含む組成物を提供する。キットは、抗体又は組成物に加えて、診断又は治療薬剤を含む。キットは、また、診断又は治療方法で用いる説明書も含む。好ましい実施態様では、キットは、抗体又はそれを含む組成物及び下記の方法に用いることができる診断用薬を含む。別の好ましい実施態様では、キットは、抗体又はそれを含む組成物及び下記の方法に用いることができる１つ又はそれ以上の治療薬を含む。

【０１９６】

診断用使用法

別の側面では、本発明は、インビボ及びインビトロ診断法を提供する。抗ＣＤ４４抗体は、インビボ又はインビトロでの生体試料におけるＣＤ４４を検出するために使用することができる。１つの実施態様では、本発明は、診断が必要な対象におけるＣＤ４４発現細胞の存在又は位置を診断する方法を提供し、その方法は対象に抗体を注射する工程を含み、抗体が結合する場所を特定することで、対象のＣＤ４４の発現を明らかにし、対象における発現を正常な参照対象又は基準と比較し、そして細胞の存在と位置を診断する。抗Ｃ

Ｄ４４抗体は、また組織中の単球及びＴ細胞などの炎症及び／又は免疫細胞の浸潤のマーカーとして使用してもよい。

【０１９７】

抗ＣＤ４４抗体は、制限なく、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、フローサイトメトリー、組織の組織化学、ウェスタンブロット法又は免疫沈降を含む、従来の免疫測定に使用できる。本発明の抗ＣＤ４４抗体は、ヒト由来のＣＤ４４を検出するのに使用できる。別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、カニクイザル又はアカゲザル由来のＣＤ４４を検出するのに使用することができる。

【０１９８】

本発明は、本発明の抗ＣＤ４４抗体と生体試料との接触及び結合抗体の検出を含む、生体試料中のＣＤ４４を検出する方法を提供する。１つの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、検出可能な標識で直接標識される。別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体(一次抗体)は標識されず、抗ＣＤ４４抗体に結合できる二次抗体又は他の分子が標識される。当業者によく知られているように、特定の種及び二次抗体のクラスを特異的に結合できる二次抗体が選ばれる。例えば、抗ＣＤ４４抗体がヒトＩｇＧの場合は、二次抗体が抗ヒトＩｇＧであってよい。抗体に結合できる他の分子は、これらに限定されないが、プロテインＡ及びプロテインＧを含み、両方とも例えば、Pierce Chemical Companyから市販されている。

【０１９９】

他の実施態様では、ＣＤ４４は生体試料であり、検出物質で標識したＣＤ４４標準及び非標識抗ＣＤ４４抗体を用いて、競合免疫アッセイにより分析し得る。本分析では、生体試料、標識ＣＤ４４標準及び抗ＣＤ４４抗体を組み合わせて、非標識抗体に結合した標識ＣＤ４４標準の量を測定する。生体試料中のＣＤ４４の量は、抗ＣＤ４４抗体に結合した標識ＣＤ４４標準の量に反比例する。

【０２００】

多くの目的のための適用において、開示されている免疫測定法を使用することができる。例えば、抗ＣＤ４４抗体は、培養細胞においてＣＤ４４を検出するのに使用することができる。１つの実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は、種々の化合物で処理した、細胞表面のＣＤ４４の量を測定するのに使用することができる。本方法は、ＣＤ４４タンパク質レベルを調節する化合物を同定するのに使用することができる。本方法によれば、細胞の１つの試料は、別の試料が未処理で残っている間に、経時的に試験物質で処理される。全ＣＤ４４発現を測定しようとする場合には、細胞を溶解し、全ＣＤ４４発現は上記の免疫分析の１つを使用して測定される。処理対非処理細胞中の全ＣＤ４４発現は、試験化合物の効果を測定するために比較される。

【０２０１】

全ＣＤ４４発現を測定する好ましい免疫測定法は、フローサイトメトリー又は免疫組織化学である。細胞表面のＣＤ４４発現を測定する場合、細胞は溶解されず、ＣＤ４４の細胞表面レベルが上記免疫測定法の１つを用いて測定される。ＣＤ４４の細胞表面レベルを測定する好ましい免疫測定法は、ビオチン又は^{125}Ｉなどの検出レベルの細胞表面タンパク質を標識し、抗ＣＤ４４抗体でＣＤ４４を免疫沈降させ、次いで標識ＣＤ４４を検出する工程を含む。

【０２０２】

ＣＤ４４の局在性、例えば細胞表面レベルを測定する別の好ましい免疫測定法は、免疫組織化学を用いることによる。ＣＤ４４の細胞表面レベルを検出する好ましい免疫測定法は、フルオレセイン又はフィコエリトリンなどの適切な蛍光プローブにより標識した抗ＣＤ４４抗体の結合、及びフローサイトメトリーを用いる一次抗体の検出を含む。別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は非標識であり、また抗ＣＤ４４抗体に結合できる二次抗体又は他の分子は標識される。ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット法、組織化学、内在性膜タンパク質の細胞表面標識及び免疫沈降は、業界でよく知られている（例えば、上記のHarlow and Laneを参照されたい）。加えて、免疫測定法は、ＣＤ４４の活性化か又は阻害かを多数の化合物で試験するために、ハイ・スループット・

スクリーニングでスケールアップすることができる。

【０２０３】

本発明の抗ＣＤ４４抗体は、組織又は組織由来の細胞中のＣＤ４４レベルを測定するのに使用することができる。幾つかの実施態様では、組織は病変組織である。幾つかの実施態様では、組織は組織生検である。その方法の幾つかの実施態様では、組織又はその生検は患者から切除される。次いで組織又は生検は免疫測定法で使用され、例えば全ＣＤ４４発現、ＣＤ４４の細胞表面レベル又はＣＤ４４の局在性を、上記の方法により決定する。そのような方法は、組織が高レベルのＣＤ４４を発現するかどうかを明らかにするために使用でき、組織が抗ＣＤ４４抗体による治療の標的であることを示すことができる。

【０２０４】

本発明の抗体は、また、インビボでＣＤ４４を発現する組織及び器官を同定するのに使用することができる。幾つかの実施態様では、ＣＤ４４発現細胞を同定するのに抗ＣＤ４４抗体が使用される。本発明のヒト抗ＣＤ４４抗体を用いる１つのメリットは、それらが、非ヒト起源の抗体又はヒト化若しくはキメラ抗体と違って、投与時に抗体への実質的免疫応答を引き出すことなく、インビボで安全に使用することができることである。

【０２０５】

この方法は、検出可能な標識抗ＣＤ４４抗体又はそれらを含む組成物を、そのような診断試験を必要とする患者に投与し、そしてＣＤ４４発現組織の位置を決める画像解析に患者をかける工程を含む。画像解析は、医療業界でよく知られており、そして限定されないが、Ｘ－線解析、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）又はコンピュータートモグラフィー（ＣＴ）を含む。抗体は、インビボイメージングに適するいずれかの薬剤、例えばＸ－線解析に使用することができるバリウムなどの造影剤、又はＭＲＩ又はＣＴに使用することができるガドリニウムキレートなどの磁気造影剤で標識することができる。他の標識剤は、限定しないが、^{99}Ｔｃなどのラジオアイソトープを含む。別の実施態様では、抗ＣＤ４４抗体は非標識であり、そして検出可能な、抗ＣＤ４４抗体を結合できる他の分子の二次抗体を投与することによりイメージングされる。

【０２０６】

１つの実施態様では、検出可能な標識抗ＣＤ４４抗体は蛍光プローブを含む。

【０２０７】

なお更なる実施態様では、本発明の抗ＣＤ４４抗体は、また、細胞のＣＤ４４の細胞表面発現の減少を明らかにするために使用してもよい。好ましい実施態様では、細胞はリンパ球及び単球である。

【０２０８】

治療的使用法

別の実施態様では、本発明は、ＣＤ４４抗体を、それを必要とする患者に投与することによるＣＤ４４活性を阻害する方法を提供する。本明細書に記載の抗体又はその抗原結合部分のいずれも、治療的に使用可能である。１つの実施態様では、ＣＤ４４抗体はキメラ又はヒト化抗体である。好ましい実施態様では、ＣＤ４４はヒト由来であり、また患者は人間の患者である。あるいは、患者は哺乳類、例えばＣＤ４４抗体が交差反応するＣＤ４４を発現するサルであってもよい。抗体は、ヒトの疾患の動物モデルとしてＣＤ４４を発現する、非ヒト哺乳類に投与してもよい。そのような動物モデルは、本発明の抗体の治療効果を評価するのに有用と考えられる。

【０２０９】

別の実施態様では、ＣＤ４４抗体又はその抗体部分は、不適切に高レベルのＣＤ４４を発現する患者に投与することができる。抗体は単回投与でもよいが、最適薬効には、好ましくは反復投与される。抗体は、毎日３回から６か月以上に１回の投与でよい。投与は、１日３回、１日２回、２日毎に１回、３日毎に１回、週１回、２週毎に１回、月１回、２か月毎に１回、３か月毎に１回及び６か月毎に１回、のようにスケジュールに従って行うことができる。抗体は、またミニポンプにより連続的に投与可能である。抗体は、粘膜、口腔、鼻腔内、吸入、静脈内、皮下、筋肉内、非経口、又は腫瘍内経路を経由して投与で

きる。抗体は、１回、少なくとも２回、又は少なくとも状態が治療され、軽減し又は治癒される期間投与してもよい。抗体は、一般的に、状態が存在している間中投与される。抗体は、一般的に、上に記載の薬剤組成物の一部として投与される。抗体の用量は、一般的に、０．１から１００ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは０．５から５０ｍｇ／ｋｇ、そして更に好ましくは１から１０ｍｇ／ｋｇの範囲である。抗体の血清中濃度は、業界で公知のいずれの方法で測定してもよい。

【０２１０】

本発明は、ヒトを含む哺乳類における異常細胞浸潤の治療方法を提供し、また、本明細書に記載の、異常細胞浸潤の治療に有効なＣＤ４４抗体又はその抗原結合部分の治療的有効量を、該哺乳類に投与することを含む。

【０２１１】

遺伝子療法

本発明の抗体及び抗体部分をコードする核酸分子は、それを必要とする患者に対して遺伝子治療を介して投与することができる。本療法は、インビボか又はエキソビボで行われる。好ましい実施態様では、重鎖及び軽鎖の両方をコードする核酸分子が患者に投与される。より好ましい実施態様では、核酸分子は、Ｂ細胞が抗体を産生するように特異化されることから、その染色体に安定的に組込まれるように投与される。好ましい実施態様では、前駆Ｂ細胞は、エキソビボでトランフェクト又は感染され、そしてそれを必要とする患者に再移植される。別の実施態様では、前駆Ｂ細胞又は他の細胞は、関係する細胞型に感染することが知られているウイルスを用いてインビボで感染される。遺伝子療法に使用される典型的なベクターは、リポソーム、プラスミド、及びウイルスベクターを含む。例としてのウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスである。インビボか又はエキソビボでの感染後、抗体発現レベルは、治療した患者から採取し、そして業界公知の又は本明細書で議論したいずれかの免疫測定法を用いることにより、モニタリングすることができる。

【０２１２】

好ましい実施態様では、遺伝子治療法は、ＣＤ４４抗体の重鎖又はその抗原結合部分をコードする分離核酸分子を投与し、また核酸分子を発現させる工程を含む。別の実施態様では、遺伝子治療法は、ＣＤ４４抗体の軽鎖又はその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子を投与し、また核酸分子を発現する工程を含む。より好ましい方法では、遺伝子療法は、重鎖又はその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子、及び本発明のＣＤ４４抗体の軽鎖又はその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子を投与し、並びに核酸分子を発現する工程を含む。遺伝子療法は、また、併用療法と関連して本出願で論じられたいずれかの薬剤などの、別の治療薬を投与する工程を含む。

【０２１３】

本発明が更によく理解できるように、以下の実施例を説明する。これらの実施例は、説明目的のためだけのものであり、如何なる形であれ本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきではない。

【実施例】

【０２１４】

以下の実施例及び薬剤において、「ＢＳＡ」はウシ血清アルブミンを意味し；「ＥＤＴＡ」はエチレンジアミン四酢酸を意味し；「ＤＮＳＯ」はジメチルスルホキシドを意味し；「ＭＯＰＳ」は３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸を意味し；「ＭＥＳ」は２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸を意味し；「ＰＢＳ」はリン酸緩衝生理食塩水を意味し；「ｄＰＢＳ」はダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水を意味し；「ＨＥＭＡ」は２－ヒドロキシ－エチルメタクリレートを意味し；「ＤＭＥＭ」はダルベッコ改変イーグル培地を意味し；「ＦＢＳ」は胎児ウシ血清を意味し；「ＮＥＡＡ」は非必須アミノ酸を意味し；「ＨＥＰＥＳ」はＮ－２－ヒドロキシエチルピペラジン－Ｎ′－２－エタンスルホン酸を意味し；「ＤＭＦ」はジメチルホルムアミドを意味する。

【０２１５】

〔実施例１〕

抗ＣＤ４４抗体を産生するハイブリドーマの生成

本発明に従う好ましい抗体は、以下のように作製され、選択され、そしてアッセイされた：

【０２１６】

免疫化及びハイブリドーマ生成：

精製組換えヒトＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号１）、ヒトＣＤ４４を発現するようにトランスフェクトされたマウスプレＢ細胞系３００－１９(Reth, M. G. et al, Nature 312 29: 418-42, 1984; Alt, F. et al., Cell 27: 381-390, 1981)、及びヒトＣＤ４４を自然発現するヒト単球性白血病細胞系、ＴＨＰ－１（ＡＴＣＣ、カタログ番号ＴＩＢ－２１２）が、免疫原として用いられた。

【０２１７】

ヒトＣＤ４４に対する完全ヒトモノクローナル抗体を、ヒトＩｇトランスジェニックマウス株ＨＣｏ７及びＨＣｏ１２、並びにヒトトランス染色体／トランスジェニック株、ＫＭ（Mederex, Inc.社)を用いて調製した。これらの株は、全てヒトから単離された抗体と区別できない完全ヒト抗体を発現する。これらのマウス株では、内因性マウスカッパ軽鎖遺伝子は、Chen et al. (1993), EMBO J. 12: 811-820に記載のようにホモ接合的に破壊されており、また内因性マウス重鎖遺伝子は、ＰＣＴ国際公開第０１／０９１８７号の実施例１に記載のように、ホモ接合的に破壊されている。これらのマウス株のそれぞれは、Fishwild et al. (1996), Nature Biotechnology 14: 845-851に記載のヒトカッパ軽鎖トランス遺伝子、ＫＣｏ５を有している。ＫＣｏ７株は、米国特許第５５４５８０６号、米国特許第５６２５８２５号、米国特許第５５４５８０７号に記載のＫＣｏ７ヒト重鎖トランス遺伝子を有している。ＫＣｏ１２株は、ＰＣＴ国際公開第０１／０９１８７号の実施例２に記載のように、ＫＣｏ１２ヒト重鎖トランス遺伝子を有している。ＫＭ株は、Ishida et al., (2002), Cloning and Stem Cells, 4: 91-102に記載のヒトミニ染色体を有している。

【０２１８】

ＣＤ４４に対する完全ヒトモノクローナル抗体を生成するために、Ｈｃｏ７、ＨＣｏ１２及びＫＭ株のＨｕＭａｂマウスを、ＴＨＰ－１細胞、精製組換えＣＤ４４－Ｆｃ又はヒトＣＤ４４を発現する３００－１９トランスフェクタントで免疫した。ＨｕＭａｂマウスに対する一般的免疫化スキームは、Lonberg, N. et al (1994), Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996), Nature Biotechnology 14: 845-851 及びＰＣＴ国際公開第９８／２４８８４号に記載されている。マウスは抗原の最初の融合時に６～１６週齢であった。ＣＤ４４－Ｆｃ抗原（５～２０μｇ）の精製組換え試料、ＴＨＰ－１細胞の試料、又はトランスフェクト３００－１９細胞（1×10^{7}細胞）を用いて、ＨｕＭａｂマウスを腹腔内（ＩＰ）、皮下（Ｓｃ）又は経足蹠（ｆｐ）の注射で免疫した。

【０２１９】

トランスジェニックマウスを、Ｒｉｂｉアジュバントにおける抗原で、１～４週間隔で腹腔内及び皮下に免疫した。免疫応答を眼窩後方出血により採血してモニターした。血清をＦＡＣＳでスクリーニングし（下記のように）、そして抗ＣＤ４４ヒト免疫グロブリンの十分なタイターを有するマウスを融合に使用した。静脈内に抗原で追加免疫した２、３日後にマウスを犠牲にし、脾臓及び／又はリンパ節を取り出した。典型的には、各抗原に対して１０～２０の融合を行なった。総数で８１のＨＣｏ７、ＨＣｏ１２及びＫＭマウスが免疫された。数十のマウスが各抗原に対して免疫された。

【０２２０】

抗ＣＤ４４抗体を産生するＨｕＭａｂマウスの選択：

ＣＤ４４に結合した抗体を産生するＨｕＭａｂマウスを選択するために、完全長ヒトＣＤ４４を発現する細胞系に結合し、そしてＣＤ４４を発現しない対照細胞系には結合しない免疫マウスの血清を、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）によりスクリーニングした：簡潔に云えば、ＣＤ４４発現３００－１９細胞を１：２０で希釈した免疫マウスの血清で

インキュベートした。細胞を洗浄し、そして特異的抗体結合をＦＩＴＣ標識ヒトＩｇＧＡｂで検出した。フローサイトメトリー分析を、ＦＡＣＳフローサイトメトリー装置（Becton Dickinson, San Jose, CA）で行なった。抗ＣＤ４４抗体の最大タイターを示したマウスが融合に使用された。融合は下記のように行なわれ、そしてハイブリドーマ上清の抗ＣＤ活性を、ＦＡＣＳにより試験した。

【０２２１】

ＣＤ４４に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成：

ＨｕＭａｂマウスから単離されたマウス脾細胞及び／又はリンパ節リンパ球を、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又は電気融合（Ｅ融合、Cyto Pulse（登録商標）technology、Cyto Pulse（登録商標）Sciences、Inc., Glen Burnie, MD）を用いて、マウス骨髄腫細胞系、ＳＰ２／０（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－１５８１、Vendor, City, State）に、標準又はメーカー推奨プロトコールを使用して融合した。簡潔に云えば、免疫マウス由来の脾臓及び／又はリンパ節リンパ球の単細胞懸濁液を、１／３及び等しい数のＳＰ２／０非分泌マウス骨髄腫細胞間で、それぞれ５０％ＰＥＧ（Sigma, St.Louis, MO）又はＥ融合を用いて融合した。細胞をおよそ1×10^{5}脾細胞／ウェル（ＰＥＧ）又は2×10^{4}脾細胞／ウェル（Ｅ融合）で、平底マイクロプレートにおいて平板培養し、そして１０％ウシ胎仔血清を含有する選択培地、１０％Ｐ３８８Ｄ１（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－ＴＩＢ－６３）馴化培地、高グルコース、Ｌ－グルタミン及びピルビン酸ナトリウムを有するＤＭＥＭ（Mediatech, Herndon, VA、カタログ番号ＣＲＬ　１００１３）中３～５％（ＩＧＥＮ）、５ｍＭのＨＥＰＥＳ、０．０５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、５０ｍｇ／ｍｌのゲンタマイシン及び１×ＨＡＴ（Sigma、カタログ番号ＣＲＬ－Ｐ－７１８５）で、１０～１４日間インキュベートした。１～２週間後、ＨＡＴがＨＴで置換された培地中で、細胞を培養した。細胞平板培養のおよそ１０～１４日後、個々のウェルからの上清を、先ずそれらがヒトガンマ、カッパ抗体を含んでいるかについてスクリーニングした。ヒトガンマ、カッパ抗体の陽性を示す上清を、次いでＦＡＣＳ（上記）によりヒト抗ＣＤ４４モノクローナル抗体ＩｇＧをスクリーニングした。ハイブリドーマを分泌する抗体を２４ウェルプレートに移し、再度スクリーニングし、そしてヒト抗ＣＤ４４モノクローナル抗体ＩｇＧの陽性が確認された場合、限界希釈法により少なくとも２回サブクローニングした。次いで安定なサブクローンを、更なる特性化用に組織培養培地中に少量の抗体を生成させるために、インビトロで培養した。

【０２２２】

ハイブリドーマを、２００５年８月にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ＡＴＣＣ）、10801 University Blvd., Manassas、VA20110－2209、とのブダペスト条約に基づいて、及び３７Ｃ.Ｆ.Ｒ.§§１.８０１～１.８０９下の寄託条件に基づいて寄託した。加えて、ｍＡｂ１０Ｃ８.２.３に対応するｃＤＮＡを含むベクターを、ＡＴＴＣ指定ＰＴＡ－７６５８及び７６５９の下で同じ条件に基づいて、２００６年６月１５日にＡＴＣＣに寄託した。寄託物へのパブリック・アクセスの全ての制限は、本出願に関する特許の付与時点で確定的に解除され、そして生存試料が受託者により分配できない場合、寄託は置き換えられる。

【０２２３】

ハイブリドーマは、以下の受託番号が割り当てられている：

【表３】

表3

抗体	マウスハイブリドーマ細胞系指定	ＡＴＣＣ指定	細胞株指定
1A9.A6.B9	1376.3.1A9.A6.B9	ATCC No.PTA-6927	LN 15922
2D1.A3.D12	1376.3.2d1.A3.D12	ATCC No.PTA-6929	LN 15920
14G9.B8.B4	1376.2.14G9.B8.B4	ATCC No.PTA-6928	LN 15921

【０２２４】

〔実施例２〕

安定な細胞系及びＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質を生成させるヒト及びカニクイザルのＣＤ４４ｃＤＮＡのクローニング

ヒトＣＤ４４ｃＤＮＡクローニング：

ヒトＣＤ４４（配列番号１）を、ヒト脾臓ｃＤＮＡ（Clontech Labs.Inc., Mountain View, CA、カタログ番号６３９３１２）から以下のプライマー：5'-atggacaagttttggtggcacgcagcctgg-3'（配列番号１５５)及び5'-ttacaccccaatcttcatgtccaca-3'（配列番号１５６)によりクローニングした。ＰＣＲ産物を、Ｘｈｏｌ及びＸｂａｌ制限部位を付加するために、以下のプライマー: 5'-gactcgaggccaccatggacaagttttggtggc-3'（配列番号１５７)及び5'- gatctagatcactattacaccccaatcttcatgtcc-3'（配列番号１５８)を用いて再増幅した。この２番目のＰＣＲ産物を、ｐＭＩＧ哺乳類発現ベクター内にライゲートし、そしてＣＤ４４配列は、両スタンドで検証した。Hawley et al., (1994), Gene Thera. 1: 136-138。

【０２２５】

カイニクイザルＣＤ４４ｃＤＮＡクローニング：

カイニクイザルＣＤ４４遺伝子を、以下のプライマー：5'-atggacaagttttggtgg-3'（配列番号１５９)及び5'-gttacaccccaatcttcatgtcca-3'（配列番号１６０）により、ｃｙｎｏＰＢＭＣｃＤＮＡからＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ産物を、ＰＣＲ２.1ＴＯＰＯベクター（Invitrogen, City, Carlsbad, CA、カタログ番号Ｋ４５１０－２０）にライゲートした。１９クローンを配列決定し、またｃｙｎｏＣＤ４４配列は、クローンの全てのコンセンサス配列により決定した。２つのクローン、５－２（配列番号１５３）及び５－８（配列番号８）の核酸配列を示す。配列を検証したカニクイザルＣＤ４４（配列番号８）を、哺乳類発現ベクターｐＭＩＧ内にサブクローニングした。Hawley et al., (1994)。

【０２２６】

３００－１９ヒト及びカニクイザルＣＤ４４　３００－１９過剰発現細胞系：

ｐＭＩＧ－ヒトＣＤ４４及びｐＭＩＧ－ｃｙｎｏＣＤ４４の両方を、FUGENE 6トランスフェクション試薬（Hoffman-La Roche Inc.、Nutley、カタログ番号１１８１５０９１００１）で、２９３Ｔ／１７細胞（ＡＴＣＣ　Ｎｏ.ＣＲＬ－１１２６３）内にトランスフェクトし、ヒトＣＤ４４及びｃｙｎｏＣＤ４４レトロウイルスを生成させた。両レトロウイルスを、その後３００－１９細胞へ形質導入してヒトＣＤ４４及びｃｙｎｏＣＤ４４発現細胞系を生成させた。

【０２２７】

ヒトＣＤ４４－ＩｇＧ１融合タンパク質のクローニング：

ヒトＣＤ４４の細胞外ドメインを、ヒトＩｇＧ１融合タンパク質(配列番号３)として発現させた。ＣＤ４４の成熟細胞外ドメインをコードするｃＤＮＡを、ヒト白血球ｃＤＮＡ（Clontech Labs. Inc.）からＰＣＲ増幅し（Klentaq ＰＣＲキット、Clontech Labs Inc., Mountain View, CA、カタログ番号６３９１０８）、これをＣＤ５リーダー配列及びヒトＩｇＧ１タグを含む哺乳類発現ベクター－ＰＣＤＭａｍｐ内にサブクローニングした。

以下のＰＣＲプライマーを、ＣＤ４４標準型（G.R. Screaton, et al., (1992), PNAS 89 : 12160-12164,）（ＣＤ４４＋Ｃ: AGTGAGACTAGTCAGATCGATTTGAATATAACCTGCCGCTTTG）（配列番号１６１），（ＣＤ４４－Ｄ: ATCACTGAGATCTTCTGGAATTTGGGGTGTCCTTATAG）（配列番号１６２)の公開されている配列にデザインした。完全ＣＤ４４ＩｇＧ１ｃＤＮＡを、配列決定し、そして両鎖で検証した。

【０２２８】

カニクイザルＣＤ４４－ＩｇＧ１タンパク質クローニング：

カニクイザルＣＤ４４の細胞外ドメインを、ヒトＩｇＧ１Ｆｃ融合タンパク質(配列番号５)として発現させた。ｃｙｎｏＣＤ４４の成熟細胞外ドメインをコードするｃＤＮＡを、ｐＭＩＧ－ｃｙｎｏＣＤ４４ベクターからＰＣＲ増幅し、そしてＣＤ５リーダー配列、ヒトＩｇＧ１タグ、およびＸｈｏｌおよびＨｐａｌ制限部位を含む自社内の哺乳類発現ベクターｐＬＮｐへサブクローニングした。ＰＣＲプライマーを、Ｘｈｏｌ及びＥｃｏＲＶ制限部位を有するＣＤ４４細胞外ドメインとアラインするためにデザインした。プライマー配列は以下のとおりである：5'-atcggcgatccagatcgatttgaatataacc-3'（配列番号１６３)、 5'-ctgtgcctcgagccattctggaatttggggtgtcc-3'（配列番号１６４)。完全ｃｙｎｏＣＤ４４細胞外ＩｇＧ１ｃＤＮＡを、配列決定し、両鎖において検証した。

【０２２９】

上のクローニング全てにわたるＰＣＲ条件として、白金Ｔａｑポリメラーゼ（Invitrogen、カタログ番号１１３０４－０１１）を使用し、標準的ＰＣＲプロトコール：９５℃で３分；２５×(５５℃で３０秒、７８℃で１分)；７２℃で７分、を使用した。

【０２３０】

ヒトＣＤ４４及びｃｙｎｏＣＤ４４発現の細胞外ドメイン及び精製：

ヒトＣＤ４４ＩｇＧ１（配列番号３）及びｃｙｎｏＣＤ４４ＩｇＧ１（配列番号５）を、製造業者プロトコールに従って、フリースタイル２９３発現システム（Invitrogen、カタログ番号Ｋ９０００－０１）を用いて発現させた。

【０２３１】

融合タンパク質は、プロテインＡアガロースビーズ（Pierce, Rockford, IL、カタログ番号１５９１８－０１４）で精製した。培養培地を採取後、プロテアーゼ阻害錠（Hoffman-La Roche Inc., Nutley、カタログ番号１６９７４９８、１錠／５０ｍｌ媒体）、トリス緩衝液（ｐＨ８．０、最終濃度：１０ｍＭ）及びナトリウムアジド（最終濃度：０．０２％）を加え、そして０．２２μｍのフィルターで濾過した。プロテインＡビーズの５０％スラリー（１ｍｌ）を各媒体（１００ｍｌ）に加えた。媒体／スラリー混合物を４℃で少なくとも２時間回転させた。１０００×ｇで１０分間の高速回転によりペレットアガロースを得た。上清を注意深く除去し、そのアガロースペレットを洗浄緩衝液（０．１Ｍトリス ＨＣｌ、ｐＨ：７．５、０．１ＭのＮａＣｌ）（２～３容）に再懸濁して、カラムにかけた。カラムを２０通液量の洗浄緩衝液で洗浄し、５通液量の溶離緩衝液（ImmunoPure IgG 溶離緩衝液、Pierce、カタログ番号２１００４）で、１Ｍトリス、ｐＨ：８の１／２カラム容積を収容するチューブに溶離した。緩衝液を、メーカープロトコールに従い、Amicon濃縮器１００００ＭＷカットオフ（Millipore, Billerica, MA）を用いてＰＢＳ内に交換した。

【０２３２】

〔実施例３〕

本発明に従って調製した抗ＣＤ４４抗体の配列決定

本発明に従って生産した抗体の構造を解析するために、ＣＤ４４モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ由来の重鎖及び軽鎖をコードする核酸をクローニングした。クローニング及び配列決定は以下のように達成された：

【０２３３】

ポリ（Ａ）＋ｍＲＮＡを、RNeasyミニキット（Qiagen, San Diego, CA）を用いてシレート化し（silated）、ｃＤＮＡを、オリゴ（ｄＴ）プライミングを使用し、Advantage RT－for－PCRキット（BD Biosciences, Frnaklin Lakes, NJ）を用いて、ｍＲＮＡから合

成した。クローン１Ａ９.Ａ６.Ｂ９、２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２、及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４に対するオリゴ（ｄＴ）プライム化（primed）ｃＤＮＡは、それぞれ表４、５及び６に記載の縮重プライマーを用いて増幅した。増幅は、繰り返して高性能ポリメラーゼ（Roche）及びPTC－200DNA Engine（MJ Reseach）を用いて以下のように達成した：２′@９５℃；２５×（２０″@９５℃、３０″@５２℃、２′@７２℃）；１０′@７２℃。ＰＣＲアンプリコンを、ｐＣＲ２.１ＴＯＰＯ（Invitrogen, Carlsbad, CA、カタログ番号Ｋ４５００－０１）内にクローニングし、そしてＴＯＰ１０化学的コンピテント細胞（Invitrogen）内に標準プロトコールを使用して形質転換した。クローンを、Grills 16th BDTv3.1/dGTP chemistry（Applied Biosystems Inc.）及び3730×Ｉ ＤＮＡアナライザー（Applied Biosystems,Inc., Foster, CA）を用いて検証して証明決定した。全配列は、「V BASE配列ダイレクトリー」に対するアラインメントにより解析した（Tomlinson, et al, (1992), J. Mol. Biol., 227, 776－798; Hum, (1995) Mol. Genet., 3, 853－860; EMBO J., 14, 4628－4638)。

【０２３４】

【表４】

表４：１Ａ９.Ａ６.Ｂ９に対する縮重プライマー（5′から3′）

VH3c_5UTR_F	ATTYRGTGATCAGSACTGAACASAG（配列番号165）
G_3UTR_R	TACGTGCCAAGCATCCTCGC（配列番号166）
VK3_5UTR_F	ATCAATGCCTGKGTCAGAGCYYTG（配列番号167）
K_3UTR_R	AGGCTGGAACTGAGGAGCAGGTG（配列番号168）

【０２３５】

【表５】

表５：２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２に対する縮重プライマー（5′から3′）

VH1a_5UTR_F	CCCTGAGAGCATCAYMYARMAACC（配列番号169）
G_3UTR_R	TACGTGCCAAGCATCCTCGC（配列番号170）
VK1a_5UTR_F	GSARTCAGWCYCWVYCAGGACACAGC（配列番号171）
K_3UTR_R	AGGCTGGAACTGAGGAGCAGGTG（配列番号172）

【０２３６】

【表６】

表６：１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４に対する縮重プライマー（5′から3′）

VH1a_5UTR_F	CCCTGAGAGCATCAYMYARMAACC（SEQ ID NO:173）
G_3UTR_R	TACGTGCCAAGCATCCTCGC（SEQ ID NO:174）
VK3_5UTR_F	ATCAATGCCTGKGTCAGAGCYYTG（SEQ ID NO:175）
K_3UTR_R	AGGCTGGAACTGAGGAGCAGGTG（SEQ ID NO:176）

【０２３７】

遺伝子利用（Gene Utilization）：

表７は、本発明抗体の選択されたハイブリドーマクローンで証明された遺伝子利用を示す。

【表７】

表７

クローン	重鎖			軽鎖		イソタイプ
	V_H	D	J_H	V_L	J_K	
1A9.A6.B9	3-33	D4-17	JH6b	L6	JK4	IgG2
2D1.A3.D12	1-03	nd	JH6b	L19	JK1	IgG1
14G9.B8.B4	1-03	D3-10	JH5b	A27	JK4	IgG1
10C8.2.3	3-21	D6-19	JH6b	A27	JK4	IgG4

ｎｄ＝分析せず

【０２３８】

配列及び突然変異解析：

当業者には当然のことながら、遺伝子利用解析は抗体構造の限定された概観のみを提供する。ＫＭ動物のＢ細胞はＶ－Ｄ－Ｊ重鎖及びＶ－Ｊカッパ軽鎖転写物を確率的に生成することから、限定されないが、体細胞超変異、欠失、Ｎ－付加、及びＣＤ３拡張を含み、多くの二次過程が生じる。例えば、Mendez et al., (1997), Nature Genetics 15: 146-156 及びＰＣＴ国際公開第９８／２４８９３号を参照されたい。従って、更に抗体構造を調べるために、本発明者らは、クローンから得られたｃＤＮＡからの抗体の予想アミノ酸配列を生成した。

【０２３９】

図２は、対応軽鎖及び重鎖遺伝子の生殖細胞系アミノ酸配列を有する、単離されたＣＤ４４モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖可変領域の、予想アミノ酸配列のアラインメントを示す。

【０２４０】

表９～１２は、大文字で表示した各抗体の可変領域を有する抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９(表９)、２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２(表１０)、１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４(表１１)、及び１０Ｃ８.２.３(表１２)の、重鎖及びカッパ軽鎖可変領域のヌクレオチド及び予想アミノ酸配列を提供する。

【０２４１】

本発明者らは、１つの突然変異抗体２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２を生成させた。抗体２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２の重鎖は突然変異し、２８位のトレオニン残基をイソロイシンに変化させた。３８位の抗体２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２の軽鎖は突然変異して、グルタミン残基をヒスチジンに変化させた。

【０２４２】

クローン２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２のV_H（１２８Ｔ）及びＶＫ（Ｈ３８Ｑ）領域における突然変異を、Stratagenの高速交換部位特異的突然変異誘発キットを用いて、表８に示すプライマーで製造業者説明書に従って行なった。突然変異は自動配列決定法により確認され、そして突然変異誘発挿入物を、発現ベクターへサブクローニングした。抗ＣＤ４４抗体２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２の突然変異誘発は、以下のように行なわれた：

【０２４３】

【表８】

表８：２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２に対する変異プライマー（５′から３′）

2D1_VH_I28T	AAGGCTTCTGGATACAcCTTCACTAGCTATGCT（配列番号177）
2D1_VH_I28T_R	AGCATAGCTAGTGAAGgTGTATCCAGAAGCCTT（配列番号178）
2D1_VL_H38Q	TTAGCCTGGTATCAGCAgAAACCAGGGAAAGCC（配列番号179）
2D1_VL_H38Q_R	GGCTTTCCCTGGTTTcTGCTGATACCAGGCTAA（配列番号180）

【０２４４】

【表９】

表９：抗体１Ａ９．Ａ６．Ｂ９のＤＮＡ及びタンパク質配列

記述:	配列:
ハイブリドーマ細胞由来の重鎖のＤＮＡ配列（大文字の可変ドメイン）	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAA TTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC GAGGAGAAGTGACTACAGGGGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG GTCACCGTCTCCTCAgcctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcgccctgct ccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccc cgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttc ccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccct ccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacac caaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttgtgtcgagtgcccaccgtgcccagca ccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctca tgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccc cgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag ccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttgtgc accaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctccc agcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtg tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcc tggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc ggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttcttcctc tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgct ccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcc gggtaaa （配列番号１０）
ハイブリドーマ細胞由来の重鎖の（翻訳による）誘導タンパク質配列（大文字の可変ドメイン）	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNK FYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSDYRGYYGMDVWGQGTT VTVSSastkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtf pavlqssglyslssvvtvpssnfgtqtytcnvdhkpsntkvdktverkccvecppcpa ppvagpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktk preeqfnstfrvvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepqv ytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppmldsdgsffl yskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk（配列番号９）

【０２４５】

【表１０】

表９（続き）

ハイブリドーマ細胞由来の軽鎖のＤＮＡ配列（大文字の可変ドメイン）	1A9.A6.B9の完全長軽鎖配列 － ヌクレオチド配列 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCA CCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTATCAACTACTTAGCCTGGTACCAACAGAA ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCTCTGGCATC CCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCC TAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTCGCAACTGGCCGCTCAC TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACgaactgtggctgcaccatctgtcttc atcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgc tgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca atcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc ctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcct gcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggaga gtgt （配列番号１４）
ハイブリドーマ細胞由来の軽鎖の（翻訳による）誘導タンパク質配列（大文字の可変ドメイン）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVINYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRASGI PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRRNWPLTFGGGTKVEIKrtvaapsvf ifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstys lsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec （配列番号１３）

【０２４６】

【表１１】

表１０：抗体２Ｄ１．Ａ３．Ｄ１２のＤＮＡ及びタンパク質配列

記述:	配列:
ハイブリドーマ細胞由来の重鎖のＤＮＡ配列（大文字の可変ドメイン）	CAGGTCCAACTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTT TCCTGCAAGGCTTCTGGATACATCTTCACTAGCTATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGGCC CCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGGTGGATCAACGCTGCCATTGGTAGCACAAAATAT TCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACGGG TGGGAGGACTACTACTACCACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCAgcctccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacc tctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacg gtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacag tcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacc cagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagtt gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctg gggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgg acccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcag tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat ggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacc atctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgg gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcct cccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagc aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac tacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa （配列番号４６）
ハイブリドーマ細胞由来の重鎖の（翻訳による）誘導タンパク質配列（大文字の可変ドメイン）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAAIGSTKY SQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGWEDYYYHGMDVWGQGTTVTV SSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlq ssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapell ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeq ynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsr deltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdks rwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk （配列番号４５）

【０２４７】

【表１２】

表１０（続き）

ハイブリドーマ細胞由来の軽鎖のＤＮＡ配列（大文字の可変ドメイン）	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC ACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGTAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCATAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAATTTCCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA ATCAAACgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaa tctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag tggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagc aaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacac aaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaac aggggagagtgt （配列番号５０）
ハイブリドーマ細胞由来の軽鎖の（翻訳による）誘導タンパク質配列（大文字の可変ドメイン）	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANNFPWTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlk sgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekh kvyacevthqglsspvtksfnrgec （配列番号４９）

【０２４８】

【表１３】

表１１：抗体１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４のＤＮＡ及びタンパク質配列

記述:	配列:
ハイブリドーマ細胞由来の重鎖のＤＮＡ配列（大文字の可変ドメイン）	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT TTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAACTATGCTATGCATTGGGTGCGCCAGG CCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACTGGCAATGGTAACACAAAA TATTCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGC CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGT TTTACTCTGGTTCGGGGAGTCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAgcc tccaccaagggcccatcggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctggggg cacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgt ggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctca ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagac ctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagc ccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggg ggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac ccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttca actggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcag tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa tggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaa ccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcc cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcc cagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca cgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggac aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca caaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa（配列番号８２）
ハイブリドーマ細胞由来の重鎖の（翻訳による）誘導タンパク質配列（大文字の可変ドメイン）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINTGNGNTK YSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSGSGSPWGQGTLVTVSSa stkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqss glyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellg gpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeq ynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlpps rdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvd ksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk （配列番号８１）

【０２４９】

【表１４】

表１１（続き）

ハイブリドーマ細胞由来の１４Ｇ９．Ｂ８．Ｂ４軽鎖のＤＮＡ配列（大文字の可変ドメイン）	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGA AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATC CCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT GGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTT TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACgaactgtggctgcaccatctgtcttcatc ttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaa taacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgg gtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagc agcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagt cacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt （配列番号８６）
ハイブリドーマ細胞由来の軽鎖の（翻訳による）誘導タンパク質配列（大文字の可変ドメイン）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKrtvaapsvfi fppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstysls stltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec （配列番号８５）

【０２５０】

【表１５】

表１２：抗体１０Ｃ８．２．３のＤＮＡ及びタンパク質配列

記述:	配列:
ハイブリドーマ細胞由来の重鎖のＤＮＡ配列（大文字の可変ドメイン）	GAGGTGCAGCTGATGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTACTGTTAGAAGTAGTTACATATACTACGCAGAC TCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTCCTCGCTATAGCAG TGCCTGGTACCTCCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC GTCTCCTCAgcttccaccaagggcccatccgtcttcccccctggcgccctgctccaggagcac ctccgagagcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacgg tgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcc tcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagac ctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcca aatatggtcccccatgcccatcatgcccagcacctgagttcctgggggggaccatcagtcttc ctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgt ggtggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtgg aggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtc agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctc caacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgag agccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctct acagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtg atgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa （配列番号１１８）
ハイブリドーマ細胞由来の重鎖の（翻訳による）誘導タンパク質配列（大文字の可変ドメイン）	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSITVRSSYIYYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLAIAVPGTSYYYYGMDVWGQGTTVT VSSastkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqs sglyslssvvtvpssslgtktytcnvdhkpsntkvdkrveskygppcpscpapeflggpsvf lfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepqvytlppsqeemtknqvsl tclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysrltvdksrwqegnvfscsv mhealhnhytqkslslslgk　（配列番号１１７）

【０２５１】

【表１６】

表１２（続き）

ハイブリドーマ細胞由来の軽鎖のＤＮＡ配列（大文字の可変ドメイン）	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGA TTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACGGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCA AGGTGGAGATCAAAcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag cagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggc caaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacag agcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagac tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcac aaagagcttcaacaggggagagtgt （配列番号１２２）
ハイブリドーマ細胞由来の軽鎖の（翻訳による）誘導タンパク質配列（大文字の可変ドメイン）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSRLTFGGGTKVEIKrtvaapsvfifppsde qlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskad yekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec（配列番号１２１）

【０２５２】

抗ＣＤ４４抗体の可変ドメインは、以下の通り発現ベクターにクローニングした：

可変ドメインは、表１３、１４、及び１５に示すプライマーを用いてｐＣＲ２．１クローン化ｃＤＮＡから増幅した。増幅は、Ｐｆｘ白金ポリメラーゼ（Invitrogen）及びPTC－200 DNA Engine（MJ Research）を、以下のようにサイクルして達成した：９４℃で２分；２０×（９４℃で３０秒、５５℃で４５秒、６８℃で１分）；６８℃で数分。これらのクローンを、Grills 16th BDTv3.1/dGTP chemistry（Applied Biosystems Inc.）及び3730×l ＤＮＡアナライザー（Applied Biosystems Inc.）を用いて検証して配列決定した。

【０２５３】

【表１７】

表１３：１Ａ９．Ａ６．Ｂ９に対する可変ドメインプライマー（5′から3′）

H3_11	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG（配列番号１８１）
G1/2_VH_R	TGGAGGCTGAGGAGACGGTGAC（配列番号１８２）
K_L6	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAG（配列番号183）
JK4_R	tatattccttaattaagttattctactcacGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCT （配列番号１８４）

【０２５４】

【表１１８】

表１４：２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２に対する可変ドメインプライマー（５′から３′）

H1_03	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTG（配列番号１８５）
G1/2_VH_R	TGGAGGCTGAGGAGACGGTGAC（配列番号１８６）
K_012	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC（配列番号１８７）
JK1_R	tatattccttaattaagttattctactcacGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCT（配列番号１８８）

【０２５５】
【表１９】

表１５：１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４に対する可変ドメインプライマー（５′から３′）

H1_03	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTG（配列番号１８９）
G1/2_VH_R	TGGAGGCTGAGGAGACGGTGAC（配列番号１９０）
K_A27	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAG（配列番号１９１）
JK4_R	tatattccttaattaagttattctactcacGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCT（配列番号１９２）

【０２５６】
〔実施例４〕
ヒト抗ＣＤ４４抗体はヒアルロン酸（ＨＡ）のＣＤ４４への結合をブロックする
ヒト抗ＣＤ４４抗体について、ＨＡ（Sigma、カタログ番号Ｈ５３８８）と実施例２に記載のヒトＣＤ４４タンパク質(配列番号３)との相互作用の阻害能を評価した。
【０２５７】
結合アッセイを、９６ウェルＥＬＩＳＡ分析プレート（Immunolux HB Maxisorp ９６ウェルプレート、Nunc、カタログ番号４４２４０４）で行なった。１日目に、２.５ｍｇ／ｍｌでｐＨ９.６の５０ｍＭのNabicarb緩衝液で希釈した鶏冠ＨＡ（１００μｌ）をプレートのアッセイウェルに加え、４℃で一夜インキュベートした。ほぼ２４時間後、ＨＡ被覆プレートを、０.０５％のTween－20（Sigma、カタログ番号Ｐ１３７９）を含むＰＢＳ緩衝液（３００μｌ）を用いて４回洗浄した。次いでプレートを、各ウェルにＰＢＳ中３％ＢＳＡ（２００μｌ）を加えることによりブロックし、３７℃で２時間インキュベートした。次いでブロックプレートは、０.０５％のTween－20を含むＰＢＳで洗浄した。別々の９６ウェルのポリプロピレンプレート（Falco、カタログ番号３５１１９０）内で、抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４；及び１０Ｃ８.２.３を、１％ＢＳＡ含有ＰＢＳで種々の濃度に希釈し、そして５０μｌ容積中０.６μｇ／ｍｌの最終濃度で、ヒトＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質を混合した。混合物を室温で６０分間インキュベートし、次いで、ＨＡ被覆プレートに移して室温で１時間インキュベートした。プレートは、０.０５％Tween－20を含むＰＢＳで洗浄した。１％ＢＳＡで１：５００に希釈した（ＨＡに結合したＣＤ４４－Ｉｇを検出するため）抗ヒトＩｇＧ－ＨＲＰ（American Biosciences, Piscataway, NJ, State、カタログ番号ＮＡ９３３）を各ウェルに加えて、室温でインキュベートした。次いでプレートを再度洗浄し、ＴＭＢ（ＴＭＢマイクロウェルペルオキシダーゼ基質、ＫＰＬ、５２－００－０２）（５０μｌ）を加えて、更に約１０分間インキュベートした。次いで反応を停止液（５０μｌ）で停止させ、そしてＯＤ$_{450}$値をプレートリーダーで測定した。図３は、ＨＡとＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質間の相互作用をブロックする、ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９のグラフ表示

を示す。表１６は、抗ＣＤ４４抗体のＩＣ$_{50}$値を示す。

【０２５８】

【表２０】

表１６

抗体クローン	IC50（μg／mL）
1A9.A6.B9	0.41 ± 0.03 (n=3)
2D1.A3.D12	0.33 ± 0.01 (n=2)
14G9.B8.B4	0.43 ± 0.01 (n=3)
10C8.2.3	0.64 (n=2)
IM7	1.85 ± 0.35 (n=9)
515	0.32 (n=1)

【０２５９】

〔実施例５〕

抗ＣＤ４４モノクローナル抗体の結合定数の測定

ＣＤ４４に対する本発明の抗体の結合親和性を示す、別のインビトロ試験を行った。

【０２６０】

結合試験は、抗体ＣＤ４４Ａｂが平衡結合解析においてトランスフェクト細胞のＣＤ４４に結合し、０．９８μｇ／ｍＬ（６．８ｎＭ、図４Ａ－Ｃ、特に図４Ｃを参照）の結合定数を有することを示した。ヒトＣＤ４４タンパク質をコードするレトロウイルスベクターで形質導入された３００－１９細胞をＰＢＳで２回洗浄した。次いで、３００－１９細胞を、１×１０^{6}細胞／ｍｌの細胞密度で、ＦＡＣＳ緩衝液［ＰＢＳ（Sigma、カタログ番号Ｄ－８５３７）；０．０２％のアジド（Sigma、カタログ番号Ｓ－２０００）；５μｇ／ｍｌのサイトカラシンＢ（Sigma、カタログ番号Ｃ－６７６２）及び２％のウシ胎仔血清（Gibco, City, State、カタログ番号１６１４０－０７１）］に再懸濁した。ＣＤ４４発現３００－１９細胞（２×１０^{5}／４００μｌ）（４００μｌ）をNunc－Immunoチューブ、（ＶＷＲ、カタログ番号４４３９９０）に移し、抗ヒトＩｇＧ　ＦＩＴＣ（Jackson、カタログ番号１０９－０９５－０９８）（５μｌ）及び１Ａ９.Ａ６.Ｂ９を種々の濃度で加え、そして振盪プレート（Thermolyne、rotomix型４８２００）上、室温で連続振盪により３時間、チューブをインキュベートした。３時間後、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄した。細胞を、１％パラホルムアルデヒド（Electron Microscopy Science, Ft.Washington, PA、カタログ番号１５７１０）（２５０μｌ）に再懸濁した。Becton DickinsonのFACS Caliburを用いてチューブの読み取りを行ない、そのデータをCellQuest Pro（Becton Dickinson）を用いて解析した(図４Ｃを参照)。

【０２６１】

抗ＣＤ４４抗体は、また、末梢ＣＤ３＋Ｔ細胞に発現するヒトＣＤ４４及びｃｙｎｏＣＤ４４タンパク質に結合する（図４Ａ及び４Ｂを参照）。具体的には、ヘパリン（Becton Dickinson、カタログ番号３６６４８０）入りのvacutainerチューブで、健常人ボランティアからヒト末梢血を採取した。採取ヒト血液（１００μｌ）をNunc－Immunoチューブ（ＶＷＲ、カタログ番号４４３９９０）に加えた。抗ＣＤ４４Ａｂを各チューブに加えて、０．２μｇ／ｍｌ～２０μｇ／ｍｌの最終濃度を得た。その後、抗ＣＤ３－ＰｅｒＣＰ（BD Pharmingen、カタログ番号３４７３４４）（１０μｌ）及び抗ＣＤ１４－ＡＰＣ（BD Pharmingen、カタログ番号５５５３９９）（１０μｌ）を各チューブに加えた。氷上で３０分間インキュベートして、１２００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、そして上清を除いた。ＦＡＣＳ洗浄緩衝液（PBS－Sigma、Ｄ８５３７；０．０２％アジド、Sigma、カタログ番

号Ｓ２００２及び２％ウシ胎仔血清、Gibco、カタログ番号１６１４０－０７１）（１００μｌ）、並びに二次ＦＩＴＣ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧＦＣ特異抗体（Jackson、カタログ番号１０９－０９５－０９８）（５０μｌ／ウェル）を１：１００倍希釈で加えた。暗所にて４℃で２５分間インキュベートした。２５分のインキュベーション後、ＦＡＣＳ溶解溶液（BD Pharmingen、水に１：１０で希釈）（２ｍｌ）を加え、ボルテックスして、室温で１０分間再度インキュベートした。１０分のインキュベーション後、１２００ｒｐｍで１０分間遠心分離して上清を除き、細胞をＦＡＣＳ洗浄緩衝液で洗浄し、続いて遠心分離して上清を除去した。次いで細胞を、１％パラホルムアルデヒド（Electron Microscopy Science、Ft.Washington, PA、カタログ番号１５７１０）（２５０ｍｌ）で固定し、そしてBecton DickinsonのFACS Caliburを用いて読み取り、更にそのデータをCellQuest Pro（Becton Dickinson）を用いて解析した。

【０２６２】

ＥＬＩＳＡ結合試験：

ＥＬＩＳＡ結合試験は、１Ａ９.Ａ６.Ｂ９が、９６ウェルプレート上に被覆したヒト及びｃｙｎｏＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質に結合することを示した（図５を参照）。分析の始めに、ＰＢＳ中１μｇ／ｍｌのＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質（５０μｌ）を、９６ウェルプレート（Immuno Maxisorpプレート、Nunc、カタログ番号４４２４０４）に加え、４℃で一夜インキュベートした。次の日、プレートを、０.０５％Tween20を含むＰＢＳで４回洗浄した。次いで、プレートをＰＢＳ中の３％ＢＳＡ（ウェル当り２００μｌ）により、３７℃で２時間ブロックし、再度洗浄した。抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９を、ＰＢＳ及び１％ＢＳＡにより種々の濃度で希釈し、そしてプレートに加えて室温で１時間インキュベートした。プレートを洗浄し、そしてＰＢＳ中１％ＢＳＡで１：２０００に希釈した抗ヒトカッパ軽鎖ＨＲＰ抗体（Amersham Bioscience、カタログ番号ＮＡ９３３）（５０μｌ）を、各ウェルに加えて更に１時間室温でインキュベートした。再度プレートを洗浄し、そして５０μｇ／ｍｌのＴＭＢマイクロウェルペルオキシダーゼ基質（カタログ番号ＫＰＬ　Ｓ２－００－０２）を加えて５～１０分間インキュベートした。ＥＬＩＳＡ反応を停止溶液で停止させ、OD_{450}値をプレートリーダーで測定した。

【０２６３】

ＢＩＡｃｏｒｅ結合試験：

表面プラズモン共鳴を使用して、表面にＣＤ４４－Ｆｃ融合タンパク質（１２μｇ／ｍｌ、１０ｍＭ酢酸塩、ｐＨ４.０）をコーティングしたＣＭ５センサーチップでヒト分子間相互作用を測定した。５、３、２、１、０.５及び０．２５μｇ／ｍｌの濃度で抗ＣＤ４４　Ａｂを直接法によりスクリーニングした。ヒトＩｇＧ１及びＩｇＧ２標準を用いて、非特異的及びバックグラウンド結合をチェックした。曲線の会合相と解離相の初期部を用いて親和性及び速度定数を計算し、表１７に報告する。

【０２６４】

【表２１】

表１７、抗ＣＤ４４抗体のＢＩＡｃｏｒｅ結合データ

抗ＣＤ４４抗体	親和性K_D × 10^{-9} (M)	オフレートk_{off}× 10^{-4} 1/s
1A9.A6.A9	0.6	5.76
2D1.A3.D12	2.01	6.53
14G9.B8.B4	4.88	52.9

【０２６５】

〔実施例６〕

抗ＣＤ４４モノクローナル抗体は、ヒト末梢血単球（ＰＢＭＣ）からの炎症性サイトカイ

ン産生をブロックする

また、抗ＣＤ４４抗体について、精製ヒトＰＢＭＣ由来のＨＡ（Sigma、カタログ番号Ｈ５３８８）によって刺激したＩＬ－１β放出の遮断能を評価した（図６参照）。ヒト末梢血を、ヘパリン入りvacutainerチューブ（Becton Dickinson、カタログ番号３６６４８０）で健常人ボランティアから採取した。ＰＢＭＣを、製造業者説明書に従いSigma Accuspinチューブ（Sigma、カタログ番号Ａ７０５４）を用いて分離した。精製細胞をＲＰＭＩ　１６４０（Gibco、カタログ番号１１８７５－０９３）により2回洗浄し、そしてＲＰＭＩ中５×１０^{6}で再懸濁し、ＰＢＭＣ（１００μｌ／ウェル）を、９６ウェルアッセイプレート（Costar、カタログ番号３５９６）に加えた。次いでヒトＰＢＭＣを、ＲＰＭＩ中種々の濃度の抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４；及び１０Ｃ８.２.３の存在下、ＨＡ（Sigma、カタログ番号Ｈ１７５１）により刺激した。具体的には、ＨＡ保存溶液（ＲＰＭＩ中１０μｇ／ｍｌ）（１００μｌ）をＰＢＭＣと抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４；及び１０Ｃ８.２.３と種々の濃度で混合した。アッセイプレートを加湿雰囲気下（Narco6300 CO_2インキュベータ）、３７℃で２４時間インキュベートした。次いでプレートを、１２００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。次いで上清を各ウェルから除去し、そして製造業者プロトコール（IL－1β Quantikine ＥＬＩＳＡキット、Ｒ＆Ｄ、カタログ番号ＤＬＢ５０）に従い、ＩＬ－１β　ＥＬＩＳＡにより測定した（表１８参照）。

【０２６６】

【表２２】

表１８、HAで刺激したヒト精製ＰＢＭＣを用いる、ＩＬ－１β放出アッセイにおける抗ＣＤ４４Ａｂ抗体

抗体クローン	IC50（μg／mL）
1A9.A6.A9	0.83 ± 0.61 (n=6)
2D1.A3.D12	0.23 ± 0.23 (n=1)
14G9.B8.B4	0.35 ± 0.02 (n=3)
10C8.2.3	0.40 (n=1)
IM7	1.62 ± 0.93 (n=4)
515	1.46 (n=1)

【０２６７】

〔実施例７〕

抗ＣＤ４４モノクローナル抗体は、ヒト末梢Ｔ細胞からの炎症性サイトカイン産生をブロックする

抗ＣＤ４４モノクローナル抗体は、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８抗体により刺激したヒト末梢Ｔ細胞からのＩＬ－２及びＩＦＮ－γ産生をブロックした。ヒト末梢血を、ヘパリン入りvacutainerチューブ（Becton Dickinson、カタログ番号３６６４８０）で健常人ボランティアから採取した。次いで、Falconポリプロピレンチューブ（Falcon、カタログ番号２

０５９）内でＰＢＳで希釈した等量の抗ＣＤ３（ＵＣＴＨ１、Ｒ＆Ｄ、カタログ番号ＭＡＢ１００）及び抗ＣＤ２８抗体（Ｒ＆Ｄ、カタログ番号ＡＦ－３４２－ＰＢ）を混合した。抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８抗体の最終濃度は、それぞれ１μｇ／ｍｌ及び１０ｎｇ／ｍｌであった。９６ウェルのポリスチレンプレート（Costar、カタログ番号３５９６）に、抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４（１０μｌ）を各ウェルに種々の濃度で加え、次いで、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８抗体と予混合したヒト全血（２００μｌ）と混合して、３７℃で２４時間インキュベートした。血清を除去し、ＩＦＮ－γ及びＩＬ－２　ＥＬＩＳＡ法（それぞれ、Ｒ＆Ｄ、カタログ番号ＤＩＦ５０及びＤ２０５０）で分析した(下表１９参照)。

【０２６８】

【表２３】

表１９、抗ＣＤ４４Ａｂは抗ＣＤ３及びＣＤ２８抗体により活性化されたヒト末梢血からのＩＬ－２及びＩＦＮ－γ放出をブロックする

抗ＣＤ４４抗体	IC 50（μg/ml）	
	IL-2	IFN-γ
1A9.A6.A9	0.58 ± 0.21 (n=6)	2.46 ± 1.46n ＝ 7
14G9 B8.34	不活性 (n=10)	不活性 (n=10)
2D1 WT/H38Q	0.46 ± 0.06 (n=5)	2.45 ± 2.2 (n=2)

【０２６９】

〔実施例８〕

ＣＤ４４の表面発現の低下

抗ＣＤ４４抗体によるＣＤ４４の表面発現の低下を検出するために、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）解析を行なった。インビトロの条件下、ヒト全血により各抗ＣＤ４４抗体をおよそ１２時間インキュベートし、そしてヒト末梢白血球でのＣＤ４４表面発現低下を検出した（図７参照）。抗ＣＤ４４抗体１Ａ９.Ａ６.Ｂ９；２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２；１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４；及び１０Ｃ８.２.３抗体（１０μｌ）を種々の濃度で、９６ウェル平底ポリスチレン・アッセイ・プレート（Costar、カタログ番号３５９６）に加えた。ヒト末梢血を、ヘパリン入りvacutainerチューブ(Becton Dickinson、カタログ番号３６６４８０）で健常人ボランティアから採取した。次いで、ヒト血液（１００μｌ／ウェル）を、抗ＣＤ４４Ａｂと混合し、そして加湿雰囲気下（Narco6300 CO_2インキュベータ）、３７℃で２４時間インキュベートした。次いで、ＣＤ４４検出抗体、Ｇ－４４－２６－ＰＥ（BD PharMingen, Franklin Lakes, NJ、カタログ番号５５５４７９）（２０μl）、抗ＣＤ３－ｐｅｒＣＰ抗体（BD PharMingen、カタログ番号３４７３４４）（１０μｌ）及び抗ＣＤ１４－ＡＰＣ（BD PharMingen、カタログ番号５５３３９９）（１０μｌ）をウェルに加え、そして暗所で３０～４０分間氷上に保持した。次いで１００μｌの血液をプレートから除去し、nunc－immunoチューブ（ＶＷＲ、West Chester, PA、カタログ番号４４３９９０）に移し、そしてＦＡＣＳ溶解溶液（BD Pharmingen、カタログ番号３４９２０２）（２ｍｌ）を１：１０の水希釈で加え、ボルテックスして室温で１０分間脇に置いた。１０分後、血液を１２００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、細胞をＦＡＣＳ洗浄緩衝液（ＰＢＳ、０.０２％のアジド、Sigma、カタログ番号Ｓ２００２及び２％のウシ胎仔血清、Gibco、カタログ番号１６１４０－０７１）で洗浄した。次いで細胞を、１％パラホルムアルデヒド（Electron Microscopy Science、カタログ番号１５７１０）（２５０ｍｌ）で固定し、そしてチューブをFACS caliburを用いて読み取り、更にそのデータをCellQuestソフトウェアを用いて解析した(表２０及び２１参照)。図８は、（ａ）リンパ球、（ｂ）単球、及び（ｃ）ＰＭＮについての１０μｇ／ｍｌの１Ａ９.Ａ６.Ｂ９抗体濃度でのＦ

ＡＣＳの結果を示す。１Ａ９．Ａ６．Ｂ９抗体の結果は灰色で、そしてベースライン発現は黒色で示す。

【０２７０】

【表２４】

表２０、抗ＣＤ４４Ａｂは、ヒト及びカニクイザルの末梢ＣＤ３＋Ｔ細胞上のＣＤ４４表面発現を低減する

	ヒト 末梢 CD3+ Ｔ細胞	カニクイザル 末梢CD3+ Ｔ細胞
	IC50（μg/ml）	IC50（μg/ml）
1A9.A6.B9	2.8 ± 1.3 (n=6)	0.82 ± 0.16 (n=3)
14G9.B8.B4	0.93 ± 0.85 (n=4)	0.39 ± 0.18 (n=3)
2D1.A3.D12	>20 (n=4)	>20 (n=4)
10C8.2.3	>20 (n=2)	-
IM7	1.5 ± 0.71 (n=2)	9.9 (n=1)
515	不活性*	

*２０μｇ／ｍｌで４０％阻害より小さい

【０２７１】

【表２５】

表２１、１Ａ９．Ａ６．Ｂ９は、ヒト及びカニクイザル末梢血中の白血球上のＣＤ４４発現を低減する(図８Ａ～Ｃ８参照)

白血球	IC50（μg／ml）	
	ヒト	カニクイザル
Ｔ細胞	2.6 ± 1.0 (n=10)	1.1 ± 0.5 (n=5)
単球	3.3 ± 0.3	N.R.
Ｂ細胞	2.4 ± 1.1	N.T.

Ｎ．Ｒ．＝ 応答なし

Ｎ．Ｔ．＝ 試験せず

【０２７２】

〔実施例９〕

抗ＣＤ４４抗体１Ａ９．Ａ６．Ｂ９の単回投与インビボ試験は、カニクイザルの末梢ＣＤ３＋Ｔ細胞上のＣＤ４４発現の用量依存的な低下を誘導する

抗ＣＤ４４抗体によって誘導されるリンパ球（図９Ａ参照）及び単球（図９Ｂ参照）からのＣＤ４４表面発現の減少を、Charles River Primates, ＢＲＦ（Bio Research Facility、House Texas）から供給されたカニクイザルに対し、１、１０及び１００ｍｇ／ｋｇ（各用量群につき２匹の雄と２匹の雌）での１Ａ９．Ａ６．Ｂ９の単回静脈内投与（２５ｎＭの酢酸ナトリウム中１０ｍｇ／ｍｌ、１４０ｍＭのＮａＣｌ、０．２ｍｇ／ｍｌのポリソルベート－８０、ｐＨ５．５）により調べた。血液試料（約２ｍｌ）を２回の前処置の

絶食サルから静脈穿刺により採取し、そして３色（ＣＤ３＋、ＣＤ１４＋、ＣＤ４４＋）フローサイトメトリー解析を投与後２、２４、４８、１６８、３３６及び５０４時間に行なった。

【０２７３】

ＦＡＣＳ分析によるＣＤ４４発現を検出するために、末梢血（１００μｌ）を、ＣＤ１４－ＦＩＴＣ（クローンＭ５Ｅ２、BD－Pharm、カタログ番号６７５０９）（２０μｌ）、CD3－PerCP（BD－Pharm、カタログ番号１３０４３）（２０μｌ）及びＣＤ４４－ＰＥ（ＩＭ７、BD－Pharm、カタログ番号８９００）（１０μｌ）の組み合わせか、又はＣＤ１４－ＦＩＴＣ（クローンＭ５Ｅ２、BD－Pharm、カタログ番号６７５０９）（２０μｌ）、CD3－PerCP（BD－Pharm、カタログ番号１３０４３）（２０μｌ）及びＲｔ　ＩｇＧ２ｂ－ＰＥ（ＩＭ７、BD－Pharm、カタログ番号６０２５４）（１０μｌ）の組み合わせと混合した。抗体を、低中程度の速度で１秒間ボルテックスを用いて血液と混合した。抗体を有する血液を４℃で２０から３０分間インキュベートし、１：１０ＦＡＣＳ溶解溶液（B.D.Pharmingen, San Diego, CA）（１.５ｍｌ）を各チューブに加えた。各チューブは、低度／中程度の速度で１～３秒間ボルテックスで混合した。チューブを、暗所でおよそ１２分間室温でインキュベートした。完全溶解を確実にするために、各チューブの不透明性をチェックし、そして追加のＦＡＣＳリーゼ（lyse）（５００μｌ）を濁って見えたチューブに加えた。追加のＢＤ染色緩衝液（ＢＤ、PharMingen, San Diego, CA、カタログ番号５５４６５Ｃ）（２ｍｌ）を加えた；チューブを再キャッピングして、チューブの転倒によって混合した。次いでチューブをスイング型ローターに入れ、室温で６～７分間２５０×ｇで遠心した。細胞ペレットを染色緩衝液で洗浄した。cytofix緩衝液（４％ｗ／ｖのパラアルデヒドを含むＰＢＳ）（１００μｌ）を細胞に加えた。試料は、それらがFACSCaliburで得られるまで、４℃で暗所に保持した。cytofix緩衝液（４％ｗ／ｖのパラアルデヒドを含むＰＢＳ）（１００μｌ）を細胞に加えた。試料をcytofix緩衝液中暗所に４℃で保管した。ＰＢＳ（１００μｌ）を、細胞をFACSCaliburで解析する前に全チューブに加えた。ゲーテッドリンパ球上の全２００００事象を採集した。

【０２７４】

〔実施例１０〕

エピトープ分類試験

競合結合解析をBIAcore^{TM}を用いて行なった。

【０２７５】

ＢＩＡｃｏｒｅエピトープマッピング実験：

抗ＣＤ４４抗体、１Ａ９.Ａ６.Ｂ９、２Ｄ１.Ａ３.Ｄ１２及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４のエピトープマッピングを、BIAcore^{TM}でのランニング競合アッセイにより行った（抗体濃度は表２２を、そしてエピトープマップは表２３を参照）。表面プラズモン共鳴によるバイオセンサー生体特異性相互作用解析装置（BIAcore2000）を用いて、ＣＭ５センサーチップでの分子間相互作用を測定した。センサーチップのデキストラン側に対する分子の相互作用により生じる２媒体、ガラスとカルボキシメチル化デキストラン間の屈折率の変化を測定し、製造業者のアプリケーション・ノートとして詳述されている任意の反射率単位（ＲＵ）の変化として報告した。

【０２７６】

センサーチップ上のフローセルのカルボキシメチル化デキストラン表面は、０．２ＭのＮ－エチル－Ｎ’－(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの７分間の介在による、０．０５ＭのＮ－ヒドロキシスクシンイミドを用いる誘導体化により活性化された。１０ｍＭの酢酸ナトリウム中、ｐＨ３.５において３０μｇ／ｍｌの濃度でのＣＤ４４－Ｉｇを、手動により５μｌ／分の速度でフローセルに注入し、そしてＲＵの所望量でフローセル表面に共有結合により固定化した。未反応Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルの非活性化を、１Ｍのエタノールアミン塩酸塩を用いてｐＨ８.５で行なった。固定化に続き、フローセルから全ての未反応の又は結合不十分の物質を、安定なベースラインが得られるまで、５０ｍＭのＮａＯＨ（５μｌ）の５回の再生注入により取り除いた。フローセル２

ではおよそ６２ＲＵが測定され、フローセル３ではおよそ１５３ＲＵが測定された。フローセル１、活性化ブランク表面には、１０ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液（３５μｌ）を、抗原の代わりに固定化中に注入した。フローセル４はおよそ２００ＲＵの固定化ＣＴＬＡ４－Ｉｇを、無関連抗原コントロールとして含有した。

【０２７７】

ランニング／希釈緩衝液（ＨＢＳ－ＥＰ）を用いて、エピトープマッピング実験を行なった。流速は５μｌ／分、機器温度は２０℃であった。抗体の各対の結合後、次いでフローセル表面を５０ｍＭのＮａＯＨ（５μｌ）の注入を用いてベースラインまで再生した。ランニング緩衝液中の精製抗体（２５μｌ）を３０μｇ／ｍｌに希釈して注入した。

【０２７８】

フローセル表面を一次抗体で飽和させ、直ちに二次抗体の注入を続けた。次いで二次抗体の結合を、固定化ＣＤ４４－Ｉｇ表面への「結合」「非結合」「部分結合」のように評価した。結合評価を行った後、表面を再生し、そして同じ一次抗体を再注入し、パネルの次の抗体に続けた。この注入スキームは、パネル中の全抗体のＣＤ４４－Ｉｇへの結合が評価されるまで続けられる。別の抗体が一次として選択され、そして他の抗体がＣＤ４４－Ｉｇに結合する二次抗体として評価される。具体的に、抗ＣＤ４４抗体１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４を一次抗体として評価する場合、それは、結合に関して１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４のオフレートが速いので、それを二次抗体と共注入した。

【０２７９】

パネルの全抗体に対する一次注入として全抗体を試験した後、１つのエピトープ群への類似結合パターンを組み合わせる縮小マトリックスが作製される。次いでトポロジーマップを縮小マトリックスに従って引くことができる。結合マトリックスは、異なるエピトープ間で干渉を示すＣＤ４４－Ｉｇ抗原のトポロジー表面マップから解釈できる。そのようなマップは機能的関連性のみを示し、そして必ずしも抗原表面の実際の物理的構造に何らかの対応を持つものではない。

【０２８０】

BIAcore競合結合解析により、ｍＡｂの１Ａ９.Ａ６.Ｂ９及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４によって認識されるエピトープが、抗体５１５によって認識されるエピトープと重複することが示された。更に、BIAcore^{TM}研究の結果、　ｍＡｂの１Ａ９.Ａ６.Ｂ９及び１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４は、抗体ＩＭ７と重複しないことが示された。

【０２８１】

【表２６】

表２２

抗体	最終濃度
ＩＭ７（BD Bioscience、Frankilin Lakes、NJ、カタログ番号５５３１３４）	１.０ｍｇ／ｍｌ
５１５（BD Bioscience、カタログ番号５５０９９０）	１.０ｍｇ／ｍｌ
１Ａ９.Ａ６.Ｂ９	１.５ｍｇ／ｍｌ
１４Ｇ９.Ｂ８.Ｂ４	１.０ｍｇ／ｍｌ

【０２８２】

【表２７】

表２３、ＣＤ４４抗体の競合エピトープマッピング

	IM7 (BD)	1A9.A6.B9	515 (BD)	14G9.B8.B4	Rmax
IM7 (BD)	×	○	○	○	233
1A9.A6.B9	○	×	×	×	226
515 (BD)	○	×	×	×	170
14G9.B8.B4	○	×	×	×	144

×＝認められた競合

○＝認められなかった競合

【０２８３】

〔実施例１１〕

抗ＣＤ４４抗体の選択性

リンパ管内皮ヒアルロナン受容体１タンパク質（ＬＹＶＥ－１）（Ｒ＆Ｄ、カタログ番号２０８９－Ｌｙ）に対するＣＤ４４抗体の結合親和性を測定し、抗ＣＤ４４抗体がＬＹＶＥ－１よりも、ＣＤ４４に対して１００倍大きい選択性を有することを見出した(表２４参照)。９６ウェルＥＬＩＳＡプレート（Immuno Maxisorpプレート、Nunc、カタログ番号４４２４０４）をＣＤ４４－Ｉｇ融合タンパク質（５０ｎｇ）又はＬＹＶＥ－１でコーティングし、そして４℃で一夜インキュベートした。次いでプレートをＰＢＳ、０．０５％Tween－20で洗浄し、室温で２時間ＰＢＳ中３％ＢＳＡによりブロックした。抗ＣＤ４４抗体又は抗ＬＹＶＥ－１抗体（Ｒ＆Ｄ、カタログ番号ＡＦ２０８９を、ＰＢＳ中１％ＢＳＡ中で種々の濃度に希釈し、プレートに加えた。ＥＬＩＳＡプレートを室温で１．５時間インキュベートした。プレートを洗浄し、抗ＣＤ４４抗体に対する抗ヒトカッパ軽鎖－ＨＲＰ抗体（Bethyl、カタログ番号Ａ８０－１１５Ｐ.６）か又は抗ＬＹＶＥ－１抗体（Cappel／ＩＣＮ、カタログ番号５５３６３）に対する抗ヤギＩｇＧ－ＨＲＰのいずれか（５０μｌ）を、ＰＢＳ中１％ＢＳＡで1:２０００希釈して各ウェルに加え、更に１時間室温でインキュベートした。プレートを再度洗浄し、そして５０μｇ／ｍｌのＴＭＢを加え、５～１０分間インキュベートした。ＥＬＩＳＡ反応を停止溶液で停止させ、OD_{450}値プレートリーダーにより測定した。

【０２８４】

【表２８】

表２４、抗CD４４抗体の選択性

抗体	CD44-Ig (EC50 μg／ml)	LYVE-1 (EC50 μg／ml)
1A9.A6.B9	0.011	10 μg／ml で交差反応なし
2D1.A3.D12	0.024	10 μg／ml で交差反応なし
14G9.B8.B4	0.018	10 μg／ml で交差反応なし
LYVE-1 Ab	>>10	0.1

【０２８５】

〔実施例１２〕

ＭＥＭ－８５及び１Ａ９.Ａ６.Ｂ９抗ＣＤ４４抗体の結合競合研究

本発明のヒト抗ＣＤ４４抗体が、市販の抗ＣＤ４４抗体ＭＥＭ－８５（Caltag Laborat

ories, Burlingame, CA、カタログ番号ＭＨＣＤ－４４０４－４）のように、ＣＤ４４分子の同じか又は異なる部位に結合するかを明らかにするＦＡＣＳ研究を行った。

【０２８６】

レトロウイルスベクター上ヒトＣＤ４４で形質導入したＣＤ３＋ヒト末梢Ｔ細胞及び３００－１９細胞のいずれかを使用して、ＦＡＣＳに基づくＣＤ４４競合結合アッセイを実施した。ヒト末梢血を、ヘパリン（Becton Dickinson、カタログ番号３６６４８０）入りのvacutainerチューブで、健常人ボランティアから採取した。

【０２８７】

ヒト末梢Ｔ細胞のＦＡＣＳ研究：

ヒト末梢血を、健常人ボランティアから、ヘパリン入りのvacutainerチューブ（Becton Dickinson、カタログ番号３６６４８０）に採取した。採取したヒト末梢血（１００μｌ）をNunc－Immunoチューブ（ＶＷＲ、カタログ番号４４３９９０）に加え、次いで、抗ＣＤ４４　Ａｂ　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９（１０μｌ）を各チューブに加えて、０.２μｇ／ｍｌから２０μｇ／ｍｌの濃度を得た。チューブを５分間氷上でインキュベートした。５分のインキュベーション後、ＣＤ４４検出Ａｂ（ＭＥＭ－８５、カタログ番号ＭＨＣＤ－４４０４－４）及び抗CD3-PerCP（BD－Pharmingen、カタログ番号３４７３４４）（２０μｌ）、抗ＣＤ１４－ＡＰＣ（BD Pharmingen、カタログ番号５５５３４９）（１０μｌ）、及び抗ＣＤ４－ＡＰＣ（BD Pharmingen、カタログ番号５５５３４９）（１０ｍｌ）を、各チューブに加えて、暗所にて３０から４０分間氷上で保持した。ＦＡＣＳ溶解溶液（BD Pharmingen、カタログ番号３４９２０２、１：１０水希釈）（２ｍｌ）を加え、ボルテックスして室温で１０分間インキュベートした。細胞をＦＡＣＳ洗浄緩衝液、（ＰＢＳ、Sigma、カタログ番号Ｄ８５３７、０.０２％のアジド、Sigma、カタログ番号Ｓ２００２及び２％のウシ胎仔血清、Gibco、カタログ番号１６１４０－０７１）で洗浄し、遠心分離後上清を除去した。次いで細胞を、１％パラホルムアルデヒド（Electron Microscopy Science, Ft Washington, PA、カタログ番号１５７１０）（２５０μｌ）で固定した。チューブをBecton Dickson のFACS Caliburを用いて読み取り、更にそのデータをCellQuest Pro（Becton Dickinson）を用いて解析した。

【０２８８】

ヒトＣＤ４４分子で形質導入した３００－１９細胞のＦＡＣＳ研究：

10^6細胞／ｍｌの３００－１９細胞（１００ｍｌ）を、Nunc－Immuno（ＶＷＲ、カタログ番号４４３９９０）に加えた。次いで細胞を抗ＣＤ４４　Ａｂ（１０μｌ）と混合して、０から１０μｇ／ｍｌの最終濃度を達成し（図１０Ａ参照）、氷上で５分間インキュベートした。インキュベーション後、抗ＣＤ４４抗体検出Ａｂ　ＭＥＭ－８５（Caltag Laboratories, Burlingame, CA、カタログ番号ＭＨＣＤ－４４０４－４）（２０μｌ）を各チューブに加えて、その細胞を３０～４０分間氷上でインキュベートした。ＦＡＣＳ洗浄緩衝液（ＰＢＳ、Sigma、Ｄ８５３７、０.０２％のアジド、Sigma、Ｓ２００２及び２％のウシ胎仔血清、Gibco、カタログ番号１６１４０－０７１）で洗浄した。１２０００ｒｐｍで１０分間遠心分離して、上清を除去した。細胞を、１％パラホルムアルデヒド（Electron Microscope Science, Ft Washington, PA、カタログ番号１５７１０）（２５０μｌ）で固定した。チューブをBecton DicksonのFACS Caliburを用いて読み取り、更にそのデータをCellQuest Pro（Becton Dickinson）を用いて解析した。

【０２８９】

ＦＡＣＳ競合結合解析の結果、ｍＡｂ　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９によって認識されたエピトープは、ＣＤ４４分子上のＬＩＮＫドメインにマッピングしているＭＥＭ－８５抗体によって認識されたエピトープと重複することを示した。Bajorath, J. et al., (1998) JBC, 273:338-343（図１０Ａ－Ｂ参照）。

【０２９０】

〔実施例１３〕

１Ａ９.Ａ６.Ｂ９（HIS lyo & CIT Lyo）の２凍結乾燥(凍乾)製剤を、下記の表２５のように作製した。製剤は、２０ｍｇ／ｍＬ　１Ａ９.Ａ６.Ｂ９、ヒスチジン又はクエン酸

緩衝液、ポリソルベート８０、ＥＤＴＡ、及びトレハロース・二水和物を含有した。液体製剤（ＨＩＳ液）についても、下記の表２５に示すように調製した（１Ａ９.Ａ６.Ｂ９）。液体製剤の組成は：１０ｍｇ／ｍＬの１Ａ９.Ａ６.Ｂ９、２０ｍＭのヒスチジン緩衝液、０.２ｍｇ／ｍＬのポリソルベート８０、０.０５ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡ、８４ｍｇ／ｍＬのトレハロース・二水和物及び０.１ｍｇ／ｍＬのＬ－メチオニンであった。

【０２９１】

【表２９】

表２５、１Ａ９.Ａ６.Ｂ９液剤及び１ｙｏ製剤の処方成分

製剤	1A9.A6.B9 (mg/ml)	pH	ヒスチジン (mM)	クエン酸塩 (mM)	PS80 (mg/mL)	トレハロース (mg/mL)	スクロース (mg/mL)	EDTA (mg/mL)	メチオニン (mg/mL)
(HIS liquid)	10	5.5	20	-	0.2	84	-	0.05	0.1
(HIS lyo)	20	5.5	20	-	0.2	-	80	0.05	-
(CIT lyo)	20	5.5	-	5	0.2	-	80	0.05	-

【０２９２】

上で調製した各製剤を２～８℃、及び加速安定性条件下(２５及び４０℃)で５２週間保存した（クエン酸緩衝液を含有する凍結乾燥製剤は２２週だけ保存した）。試料を、４、８、１３、２２及び５２週時に分析した。各時点で、肉眼で微粒子の存在、色の変化、及び透明度を分析した。ｐＨ測定も行った。凝集体の存在は、ＳＥ－ＨＰＬＣでモニタリングした。試験した製剤は全て肉眼的に透明で、無色でかつ粒子はないままであり、またｐＨの大きな変化は示さなかった。加えて、２００ｍＭのリン酸緩衝液でｐＨ７.０の移動相を使用し、直列の２カラム（GS SW3000XL及びGS SW2000XL）を用いたＳＥ－ＨＰＬＣによって測定して、表２５の製剤の全て、並びに２～８℃及び２５℃で５２週間、及び４０℃で２２週間（図１１ａ、ｂ及びｃ）保存した後、コントロールとして試験した液体製剤で、９７％以上もの良好なｍＡｂモノマー回収率（＜３％凝集体形成）が得られた。ＨＰＬＣの流速は、４０分の分析時間で０.７ｍＬ／分に維持した。

【０２９３】

各製剤はイメージングキャピラリー等電点電気泳動法（ｉＣＥ）によって解析し、５２週の冷蔵貯蔵（２～８℃）後及び加速温度条件（２５℃で５２週間並びに４０℃で２２週）下の、１Ａ９.Ａ６.Ｂ９電荷変化体（酸性、親及び塩基性種）の形成を評価した。これらの電荷種の分離は、キャピラリー内で行ない、これらの種の可視化及び定量化はＵＶ検出器及びＣＣＤカメラを用いて行なった。ｉＣＥアッセイの結果(酸性種)を、図１２ａ、ｂ及びｃに示す。結果は、全ての製剤が２～８℃及び２５℃で５２週間の貯蔵後類似の酸性種形成を有することを示す。４０℃では、凍結乾燥製剤が、コントロールより低い酸性種形成を示すことを報告した。

【０２９４】

各製剤は、また、ＳＥ－ＨＰＬＣによって分析し、５２週の冷蔵貯蔵（２～８℃）後及び加速温度条件（２５℃で５２週間並びに４０℃で２２週）下に、ｍＡｂの高い及び低いサイズ変化体の形成を評価した。本方法は、経時的なクリップ形成及び凝集体形成のレベルを含む、ｍＡｂ純度の優れた測定法を提供する。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の結果を表２６、２７及び２８に示す。

【０２９５】

また、各製剤を、５２週の冷蔵貯蔵（２～８℃）後及び加速温度条件（２５℃で５２週

間並びに４０℃で２２週）下に、重鎖のメチオニン－位置２５６でのメチオニン酸化の形成を評価するために分析した。モノクローナル抗体製品を、Ｌｙｓ－Ｃで消化し、メチオニン含有ペプチドフラグメント及びその各酸化体をモニタリングした。表２６、２７及び２８は、メチオニンの酸化アッセイの結果を示す。

【０２９６】

また、各製剤を、５２週の冷蔵貯蔵（２～８℃）後及び加速温度条件（２５℃で５２週間並びに４０℃で２２週）下の相対的生物活性を評価するために分析した。生物活性分析の結果を、表２６、２７及び２８に示す。

【０２９７】

【表３０】

表２６、５℃で得られた安定性データ

時点	２２週			５２週		
製剤	HIS-liquid	HIS-lyo	CIT-lyo	HIS-liquid	HIS-lyo	CIT-lyo
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ						
不純物% ＞50K	0.8	0.5	0.7	0.6	0.6	未分析
不純物% 25K － 50K	0	0	0	0	0	未分析
不純物% ＜25K	0	0	0	0	0	未分析
総不純物%	0.8	0.5	0.7	0.6	0.6	未分析
酸化						
met-256	3.1	3.2	3.4	未分析	未分析	未分析
減少ＣＧＥ						
純度%	98.8	98.7	98.8	98.7	98.8	未分析
フラグメント%	1.2	1.3	1.2	1.3	1.2	未分析
バイオアッセイ	95%	未分析	未分析	未分析	未分析	未分析

【０２９８】

【表３１】

表２７、２５℃で得られた安定性データ

時点	２２週			５２週		
製剤	HIS-liquid	HIS-lyo	CIT-lyo	HIS-liquid	HIS-lyo	CIT-lyo
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ						
不純物% ＞50K	1.0	0.6	2.4	1.4	0.3	未分析
不純物% 25K － 50K	0.9	0.1	0.2	0.6	0	未分析
不純物% ＜25K	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	未分析
総不純物%	2.0	0.7	2.7	2.0	0.3	未分析
酸化						
met-256	未分析	未分析	未分析	未分析	未分析	未分析
バイオアッセイ	未分析	未分析	未分析	未分析	未分析	未分析

【０２９９】

【表３２】

表２８、４０℃で得られた安定性データ

時点	２２週		
製剤	HIS-liquid	HIS-lyo	CIT-lyo
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ			
不純物% ＞50K	2.0	0.6	1.1
不純物% 25K － 50K	4.1	0.2	0
不純物% ＜25K	1.5	0	0
総不純物%	7.6	0.9	1.1
酸化			
met-256	8.8	3.5	3.4
ＣＧＥ（減少）			
純度%	91.2	98.9	98.9
フラグメント%	8.3	1.1	1.1
バイオアッセイ	86	73	92

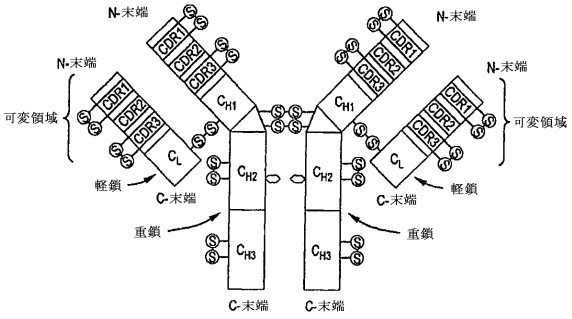
【０３００】
〔実施例１４〕
Biacore^{TM}解析による、ヒト及びカニクイザルＣＤ４４に対する１Ａ９.Ａ６.Ｂ９の結合親和性
別のBiacore^{TM}解析を行って、ヒト及びカニクイザルＣＤ４４に対する１Ａ９.Ａ６.Ｂ９抗体の結合親和性を証明した。ヒトＣＤ４４－Ｉｇ（５５ＲＵ、８６ＲＵ）及びｃｙｎｏＣＤ４４－Ｉｇ（９９ＲＵ、１１６ＲＵ）を、ｐＨ３.５の１０ｍＭの酢酸ナトリウム中、１０μｇ／ｍｌの濃度でＣＭ－５チップに固定化した。変動濃度の１Ａ９.Ａ６.Ｂ９（半対数希釈で１００μｇ／ｍｌから０.１μｇ／ｍｌ）を、５μｌ／分の流速でチップ上に流した。次いでチップを５０ｍＭのＮａＯＨで再生し、そしてＨＢＳ－ＥＰ（BIAcore ２２－０５１２－４４）で洗浄した。分析は、Biacore 2000で行なった。データをBIAEvaluation^{TM}ソフトウェアを用いて解析した（ｎ＝２）。
【０３０１】
【表３３】

表２９、１Ａ9.Ａ6.Ｂ９の動態解析

CD44 Ig	Kd (× 10^{-3}) (1/s)	K_D (pM)
ヒト	0.39	51 (n=3)
カニクイザル	0.53	150 (n=3)

【０３０２】
限定されないが、全ての論文、刊行物、特許、特許出願、プレゼンテーション、テキスト、レポート、原稿、パンフレット、書籍、インターネット・ポジティング、学術論文、定期刊行物、製品ファクトシート等を含む、本明細書に引用されている全ての参考文献は、参照により、それらの全体が本明細書に組み込まれる。本明細書の参考文献の議論・考察は、それらの著者らによってなされる主張を単に要約することを意図しており、またどの参考文献が先行技術を構成するものと自白するものではなく、そして引用した参考文献の正確さと適切さにチャレンジする出願人の権利を留保するものである。
【０３０３】
前述の発明を、理解を明瞭にする目的で図面と実施例により若干詳細に説明してきたが、本発明の教示の観点から当業者には当然のことながら、添付した特許請求の範囲の精神又は範囲から逸脱することなしに、一定の変更及び修正をそれに加えることは可能である。

【図１】



【図２ａ】

1A9.A6.B9

V_H

生殖細胞系	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKG
1A9.A6.B9	----------F-------
生殖細胞系	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR##HYYYYGMDV WGQGTTVTVSS 配列番号 193
1A9.A6.B9	----------RSD-RG----------

V_L

生殖細胞系	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRAS
1A9.A6.B9	----------IN----------
生殖細胞系	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLT FGGGTKVEIK 配列番号 194
1A9.A6.B9	----------R----------

【図２ｂ】

2D1.A3.D12

V_H

生殖細胞系	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQG
2D1.A3.D12	----------I----------AI-S---------
生殖細胞系	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARY##HYYYGMDV WGQGTTVTVSS 配列番号 195
2D1.A3.D12	----------DGWED---H----------

V_L

生殖細胞系	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
2D1.A3.D12	----------H----------
生殖細胞系	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPWT FGQGTKVEIK 配列番号 196
2D1.A3.D12	----------N----------

【図２ｃ】

14G9.B8.B4

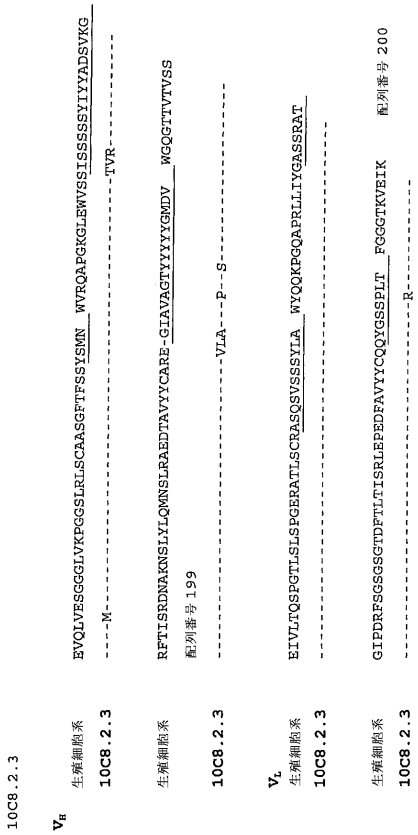
V_H

生殖細胞系	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQG
14G9.B8.B4	----------N----------T----------
生殖細胞系	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYGSGSP WGQGTLVTVSS 配列番号 197
14G9.B8.B4	----------F-S----------

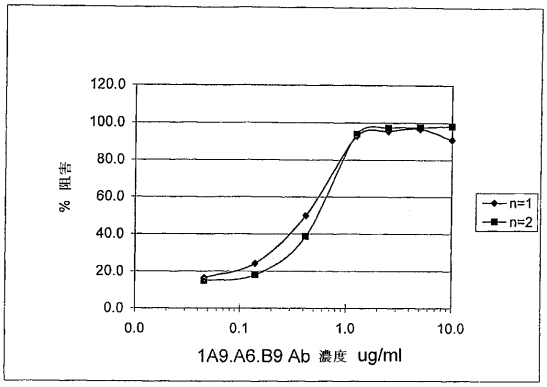
V_L

生殖細胞系	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
14G9.B8.B4	----------
生殖細胞系	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLT FGGGTKVEIK 配列番号 198
14G9.B8.B4	----------

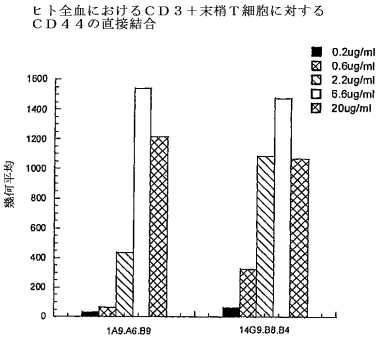
【図２ｄ】



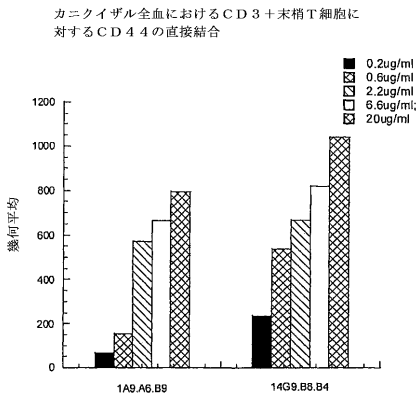
【図３】



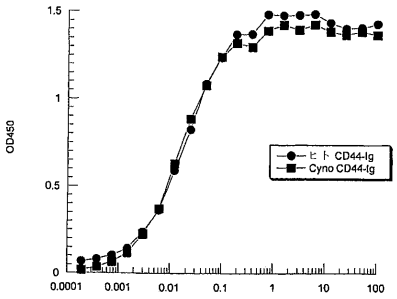
【図４Ａ】



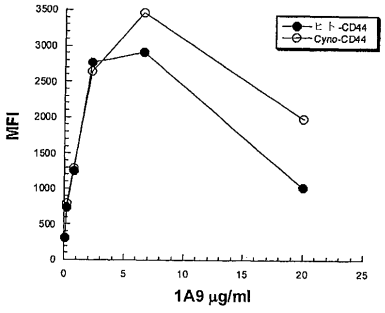
【図４Ｂ】



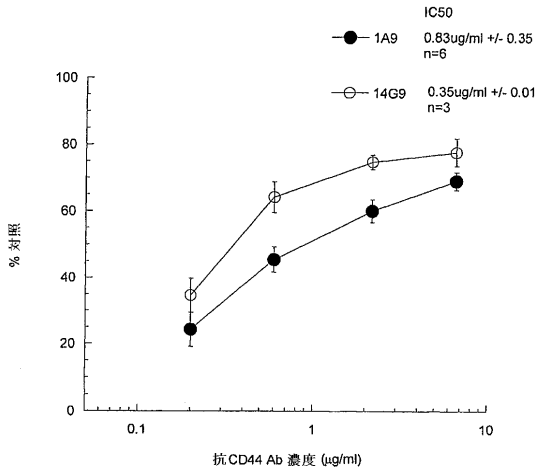
【図５】



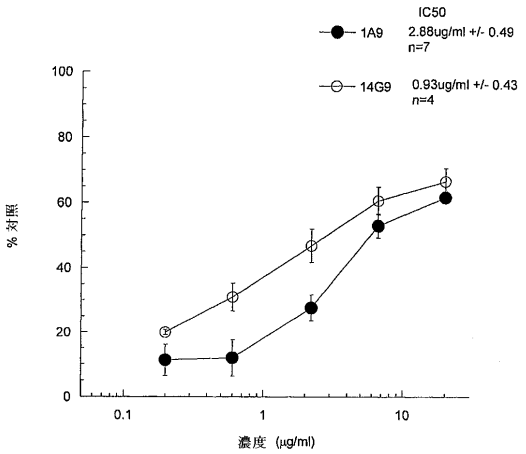
【図４Ｃ】



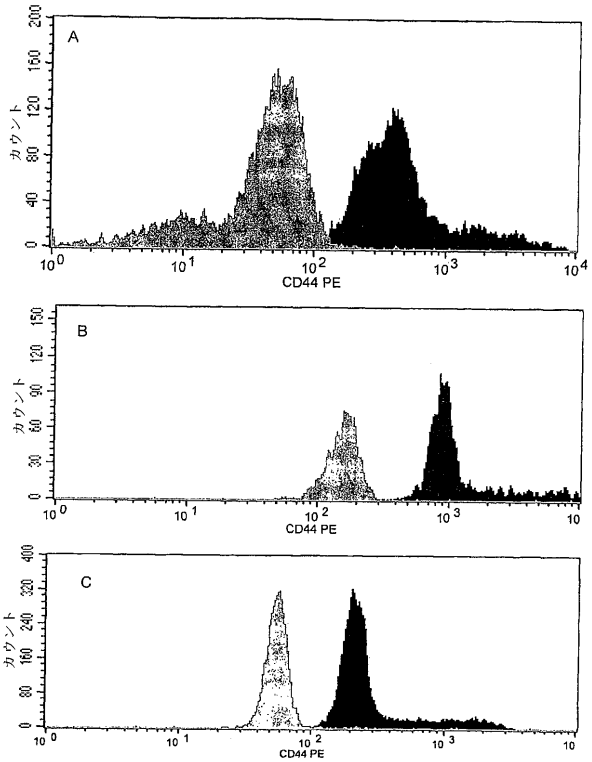
【図６】



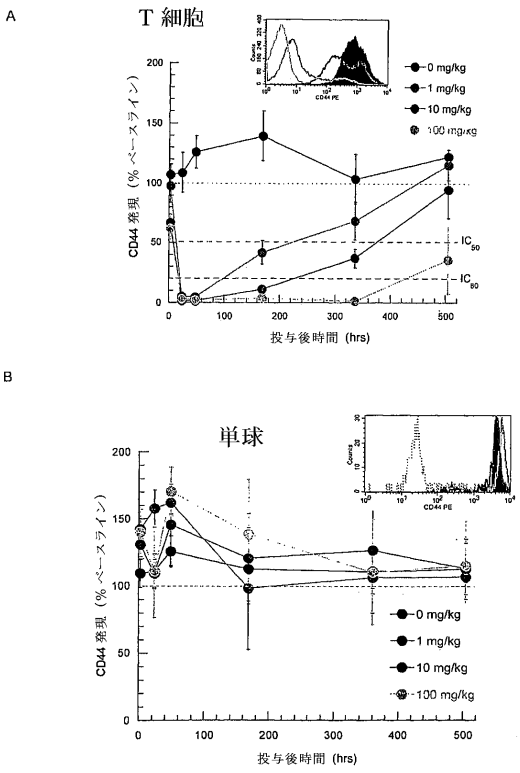
【図７】


IC50
1A9 2.88ug/ml +/- 0.49
n=7
14G9 0.93ug/ml +/- 0.43
n=4
% 対照
濃度 (μg/ml)

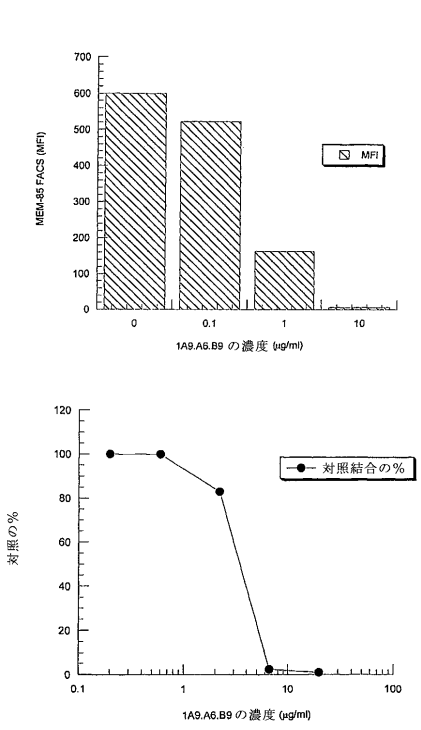
【図８】


A
B
C
カウント
CD44 PE

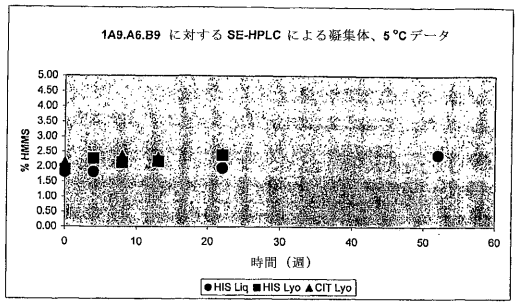
【図９】


A
T 細胞
0 mg/kg
1 mg/kg
10 mg/kg
100 mg/kg
CD44 発現 (% ベースライン)
投与後時間 (hrs)
B
単球
0 mg/kg
1 mg/kg
10 mg/kg
100 mg/kg
CD44 発現 (% ベースライン)
投与後時間 (hrs)

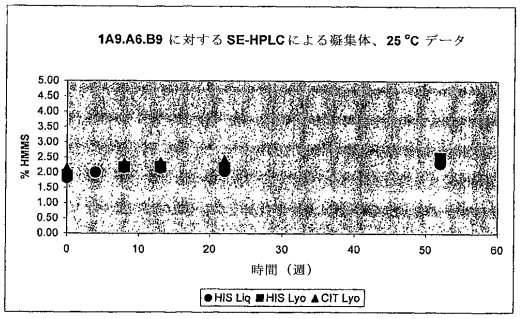
【図１０】


A
MEM-85 FACS (MFI)
MFI
1A9.A6.B9 の濃度 (μg/ml)
B
対照の%
対照結合の%
1A9.A6.B9 の濃度 (μg/ml)

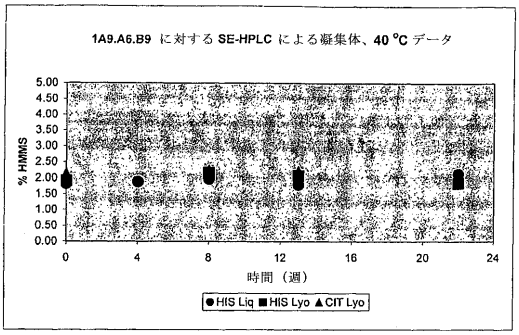
【図１１ａ】



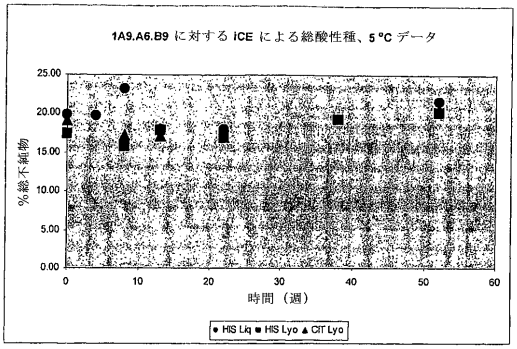
【図１１ｂ】



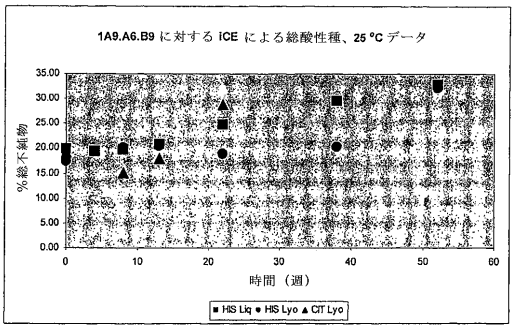
【図１１ｃ】



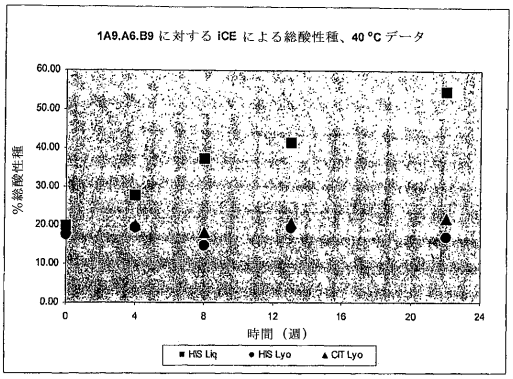
【図１２ａ】



【図１２ｂ】



【図１２ｃ】



【配列表】
2010512790000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: **C07K 16/00(2006.01);C12P 21/08(2006.01)**

USPC: **530/387.3,388.15**
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 530/387.3,388.15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
STIC sequence search of SEQ ID NO:17, 19, 21, 23, 25 and 27

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Colnot et al (Can. Immunol. Immunother., 52:576-582, 2003)	1-3, 5-17 and 21-25
A	WO 2005/087264 A1 (Rouschop et al., WIPO, 2005)	1-3, 5-17 and 21-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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
11 August 2008 (11.08.2008)

Date of mailing of the international search report
08 OCT 2008

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer
/Stephen L. Rawlings/ for BRADLEY DUFFY

Telephone No. (571)272-0700

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Group I, claims 1-3, 5-17 and 21-25

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING
This International Search Authority has found 52 inventions claimed in the International Application covered by the claims indicated below:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I, claims 1-3, 5-17 and 21-25, insofar as the claims are drawn to an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21 and a light chain variable (VL) domain amino acid sequence comprising a VL CDR1 as set forth in SEQ ID NOs:23, a VL CDR2 as set forth in SEQ ID NOs:25, and a VL CDR3 as set forth in SEQ ID NO:27, compositions thereof, nucleic acids comprising a sequence that encodes said antibody, and cell lines that produce said antibody.

Group II, claims 1-2, 5-17 and 21-25, insofar as the claims are drawn to an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57 and a light chain variable (VL) domain amino acid sequence comprising a VL CDR1 as set forth in SEQ ID NOs:59, a VL CDR2 as set forth in SEQ ID NOs:61, and a VL CDR3 as set forth in SEQ ID NO:63, compositions thereof, nucleic acids comprising a sequence that encodes said antibody, and cell lines that produce said antibody.

Group III, claims 1-2, 4-17 and 21-25, insofar as the claims are drawn to an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93 and a light chain variable (VL) domain amino acid sequence comprising a VL CDR1 as set forth in SEQ ID NOs:95, a VL CDR2 as set forth in SEQ ID NOs:97, and a VL CDR3 as set forth in SEQ ID NO:99, compositions thereof, nucleic acids comprising a sequence that encodes said antibody, and cell lines that produce said antibody.

Group IV, claims 1-2, 5-17 and 21-25, insofar as the claims are drawn to an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129 and a light chain variable (VL) domain amino acid sequence comprising a VL CDR1 as set forth in SEQ ID NOs:131, a VL CDR2 as set forth in SEQ ID NOs:133, and a VL CDR3 as set forth in SEQ ID NO:135, compositions thereof, nucleic acids comprising a sequence that encodes said antibody, and cell lines that produce said antibody.

Group V, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating rheumatoid arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group VI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating rheumatoid arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group VII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating rheumatoid arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group VIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating rheumatoid arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group IX, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating juvenile rheumatoid arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group X, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating juvenile rheumatoid arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating juvenile rheumatoid arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating juvenile rheumatoid arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating atherosclerosis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XIV, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating atherosclerosis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XV, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating atherosclerosis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XVI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating atherosclerosis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XVII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating granulmatous disease comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XVIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating granulmatous disease comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

Group XIX, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating granulmatous disease comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XX, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating granulmatous disease comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XXI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating multiple sclerosis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XXII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating multiple sclerosis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XXIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating multiple sclerosis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XXIV, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating multiple sclerosis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XXV, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating asthma comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XXVI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating asthma comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XXVII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating asthma comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chainvariable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XXVIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating asthma comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XXIX, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating Crohn's disease comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XXX, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating Crohn's disease comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XXXI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating Crohn's disease comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XXXII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating Crohn's disease comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XXXIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating ankylosing spondylitis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XXXIV, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating ankylosing spondylitis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XXXV, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating ankylosing spondylitis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XXXVI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating ankylosing spondylitis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable(VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XXXVII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating psoriatic arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XXXVIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating psoriatic arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XXXIX, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating psoriatic arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XXXX, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating psoriatic arthritis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XXXXI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating plaque psoriasis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XXXXII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating plaque psoriasis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XXXXIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating plaque psoriasis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

Group XXXXIV, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating plaque psoriasis comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group XXXXV, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating cancer comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group XXXXVI, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating cancer comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group XXXXVII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating cancer comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group XXXXVIII, claims 18-20, insofar as the claims are drawn to a method of treating cancer comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Group IL, claim 18, insofar as the claim is drawn to a method of preventing a CD-44 mediated disorder comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Group L, claim 18, insofar as the claim is drawn to a method of preventing a CD-44 mediated disorder comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Group LI, claim 18, insofar as the claim is drawn to a method of preventing a CD-44 mediated disorder comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Group LII, claim 18, insofar as the claim is drawn to a method of preventing a CD-44 mediated disorder comprising administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129

1. This International Searching Authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

The inventions listed as Groups I-LII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

In this case, the heavy chain variable (VH) domain amino acid sequences presented in claim 1 all recite different SEQ ID NOs, and therefore appear to comprise different CDR amino acid sequences. Accordingly, the special technical feature presented in claim 1 that appears to link these structurally distinct antibodies is that they are human antibodies which specifically bind to human CD44. However, US 2004/0126379 (Adolf et al., 2004) teach such human antibodies which specifically bind to human CD44; see entire document (e.g., paragraph [0031]). Accordingly, the technical feature recited in claim 1, does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.1, as it does not define a contribution over the prior art.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group I is making a human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21 and a light chain variable

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

(VL) domain amino acid sequence comprising a VL CDR1 as set forth in SEQ ID NOs:23, a VL CDR2 as set forth in SEQ ID NOs:25, and a VL CDR3 as set forth in SEQ ID NO:27.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group II is making an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57 and a light chain variable (VL) domain amino acid sequence comprising a VL CDR1 as set forth in SEQ ID NOs:59, a VL CDR2 as set forth in SEQ ID NOs:61, and a VL CDR3 as set forth in SEQ ID NO:63.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group III is making an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93 and a light chain variable (VL) domain amino acid sequence comprising a VL CDR1 as set forth in SEQ ID NOs:95, a VL CDR2 as set forth in SEQ ID NOs:97, and a VL CDR3 as set forth in SEQ ID NO:99.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group IV is making an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129 and a light chain variable (VL) domain amino acid sequence comprising a VL CDR1 as set forth in SEQ ID NOs:131, a VL CDR2 as set forth in SEQ ID NOs:133, and a VL CDR3 as set forth in SEQ ID NO:135.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group V is treating rheumatoid arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group VI is treating rheumatoid arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group VII is treating rheumatoid arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group VIII is treating rheumatoid arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group IX is treating juvenile rheumatoid arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group X is treating juvenile rheumatoid arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XI is treating juvenile rheumatoid arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XII is treating juvenile rheumatoid arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XIII is treating atherosclerosis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XIV is treating atherosclerosis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XV is treating atherosclerosis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XVI is treating atherosclerosis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XVII is treating granulmatous disease by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XVIII is treating granulmatous disease by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XIX is treating granulmatous disease by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XX is treating granulmatous disease by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXI is treating multiple sclerosis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXII is treating multiple sclerosis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXIII is treating multiple sclerosis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXIV is treating multiple sclerosis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain

variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXV is treating asthma by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXVI is treating asthma by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXVII is treating asthma by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXVIII is treating asthma by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXIX is treating Crohn's disease by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXX is treating Crohn's disease by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXI is treating Crohn's disease by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXII is treating Crohn's disease by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXIII is treating ankybsing spondylitis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXIV is treating ankylosing spondylitis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXV is treating ankylosing spondylitis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain

variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXVI is treating ankylosingspondylitis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXVII is treating psoriatic arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXVIII is treating psoriatic arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXIX is treating psoriatic arthritisby administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXX is treating psoriatic arthritis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXXI is treating plaque psoriasis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXXII is treating plaque psoriasis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXXIII is treating plaque psoriasis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXXIV is treating plaque psoriasis by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXXV is treating cancer by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/25975

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXXVI is treating cancer by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXXVII is treating cancer by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group XXXXVIII is treating cancer by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group IL is preventing a CD44 mediated disorder by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:17, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:19, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:21.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group L is preventing a CD44 mediated disorder by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:53, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:55, and a VH CDR3 as set forth in SEQID NO:57.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group LI is preventing a CD44 mediated disorder by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:89, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:91, and a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:93.

Therefore, the special technical feature of the invention of Group LII is preventing a CD44 mediated disorder by administering an isolated human antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds human CD44, comprising a heavy chain variable (VH) domain amino acid sequence comprising a VH CDR1 as set forth in SEQ ID NO:125, a VH CDR2 as set forth in SEQ ID NO:127, a VH CDR3 as set forth in SEQ ID NO:129.

Accordingly, the inventions of Groups I-LII do not share the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept under PCT Rules 13.1 and 13.2.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
Medline and WEST(PGPB, USPT, USOC, JPAB, EPAB, DWPI) search -terms- CD44, antibody, human and inventor search
STIC sequence search of SEQ ID NO:17, 19, 21, 23, 25 and 27

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	101	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	C12N	5/00	102	
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	111	
A61P	*37/06*	*(2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*9/10*	*(2006.01)*	A61P	37/06		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00	101	
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	9/10		
A61P	*11/06*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*1/04*	*(2006.01)*	A61P	25/00		
A61P	*19/02*	*(2006.01)*	A61P	11/06		
A61P	*17/06*	*(2006.01)*	A61P	1/04		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61P	19/02		
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	A61P	17/06		
			A61K	39/395	N	
			C12P	21/08		

(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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,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,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,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100140132
弁理士 竹林 則幸
(74)代理人 100091731
弁理士 高木 千嘉
(72)発明者 シュー・シュー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１８９０．ウィンチェスター．ハイランドアヴェニュー２６６
(72)発明者 ヴァーヘ・ベディアン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０１７０１．フレイミンガム．オーヴァールックドライヴイースト３５
(72)発明者 エリカ・ミードウ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９５０２０．ギルヴォイ．ホーピレーン９７７１
(72)発明者 ハイチュン・フアーン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４５３８．フレモント．クレストウッドストリート４３２９
(72)発明者 ラン・ヤン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９５０３７．モーガンヒル．プリシマウェイ１８６６８
(72)発明者 クリストファー・トイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９５１３１．サンホゼ．アムバーグローヴドライヴ１６９４
(72)発明者 モハーン・スリニヴァサン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４４０３．サンマテオ．マリーナコート１７１５Ａ
(72)発明者 アドヴァイト・ヴィー・バドカール
アメリカ合衆国ミズーリ州５３０１１．ワイルドウッド．キングスタウンプレイスコート２３２０

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA02 DA02 GA03

4B064 AG27 CA20 CB24 DA01
4B065 AA91X AA92X AB01 AB05 BA02 BA08 CA25 CA44
4C085 AA14 BB36 BB41 CC23 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74