

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-107050

(P2012-107050A)

(43) 公開日 平成24年6月7日(2012.6.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28 ZNA	4C084
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395 N	4C085
<b>A61P 29/00 (2006.01)</b>	A61P 29/00	4H045
<b>A61P 11/06 (2006.01)</b>	A61P 11/06	
<b>A61P 1/04 (2006.01)</b>	A61P 1/04	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-37811 (P2012-37811)	(71) 出願人	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド
(22) 出願日	平成24年2月23日 (2012.2.23)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー
(62) 分割の表示	特願2007-530413 (P2007-530413) の分割		ウェイ 1
原出願日	平成17年9月2日 (2005.9.2)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/607, 377	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成16年9月3日 (2004.9.3)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	マーク エス. デニス アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 70, サン カルロス, プリマス 1 20

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗β7アンタゴニストおよびその使用

## (57) 【要約】

【課題】治療用の抗ベータ7抗体、これらの抗体を含む組成物及びその使用方法を提供すること。

【解決手段】本発明はMAdCAM - アルファ4ベータ7結合及び胃腸上皮への白血球リクルートメント、結合及びアレルギー、喘息、IBD（例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎）、糖尿病、移植に関わる炎症、対宿主性移植片病及び/又は同種移植片障害及びベータ7インテグリンにより媒介される他の生物学的/生理学的な活性の調節を包含する、ベータ7インテグリン媒介経路を調節することに関連する方法、組成物、キット及び製造物品を提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

明細書に記載の発明。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は参照により全体が本明細書に組み込まれる2004年9月3日出願の米国暫定出願番号60/607,377に対して35 USC § 119(e)の下に優先権を請求する37 CFR § 1.53(b)(1)の下に出願された非暫定出願である。

10

## 【0002】

(技術分野)

本発明は一般的に分子生物学及び成長因子調節の分野に関する。より詳細には、本発明はベータ7サブユニットを含有するインテグリンの生物学的活性のモジュレーター及び該モジュレーターの使用に関わる。

## 【背景技術】

## 【0003】

(背景)

インテグリンは細胞接着から遺伝子調節まで多くの細胞過程に関与している / ヘテロ2量体細胞表面受容体である(非特許文献1及び非特許文献2)。数種のインテグリンは疾患過程に関連付けられており、薬剤発見の潜在的標的として広範に注目されている(非特許文献3)。免疫系においては、インテグリンは炎症過程の間の白血球の移動、接着及び浸潤に関与している(非特許文献4)。インテグリンの示差的発現は細胞の接着特性を調節し、そして異なるインテグリンが異なる炎症応答に関与している。非特許文献5。ベータ7インテグリン(すなわちアルファ4ベータ7(47)及びアルファEベータ7(E7))は主に単球、リンパ球、好酸球、好塩基球及びマクロファージ上で発現されるが、好中球上では発現されない。非特許文献6。47インテグリンの主要リガンドは内皮表面蛋白粘膜炎細胞接着分子(MAdCAM)及び血管細胞接着分子(VCAM-1)である(非特許文献7)。炎症部位における高内皮細静脈(HEV)上に発現されるMAdCAM及び/又はVCAMへの47の結合は内皮への白血球の堅固な接着とそれに続く炎症組織への溢出をもたらす(非特許文献8)。E7インテグリンに対する主要リガンドは上皮内リンパ球(IEL)表面蛋白、Eカドヘリンであり、これはE7担持細胞の上皮リンパ球への接着を促進する。47、MAdCAM又はVCAMに対して指向されたモノクローナル抗体は喘息のような慢性炎症性疾患(非特許文献9)、慢性関節リウマチ(RA;非特許文献10)、結腸炎(非特許文献11)及び炎症性腸疾患(IBD;非特許文献12;非特許文献13)の動物モデルにおける効果的なモジュレーターであることがわかっている。ベータ7サブユニットに指向されたモノクローナル抗体はインテグリンサブユニットに結合することがわかっている(非特許文献14)が、非ヒト又は非ヒト化抗体としては、それらは臨床的有用性を欠いている。

20

30

## 【0004】

40

アルファ4ベータ7インテグリンとそのリガンドMAdCAM及び/又はVCAMとの間の相互作用、並びに、アルファEベータ7インテグリンとそのリガンドE-カドヘリンとの間の相互作用を阻害するヒト化抗体又はその結合フラグメントのような高度に特異的な化合物が望まれている。これらの化合物は喘息、クローン病、潰瘍性大腸炎、糖尿病、臓器移植の合併症及び同種移植片関連障害のような慢性炎症性疾患の治療のために有用である。

本明細書において引用する全ての参考文献は、特許出願及び公開物を含めて、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

50

## 【0005】

【非特許文献1】Hynes, R. O., Cell, 1992, 69: 11 - 25

【非特許文献2】Hemler, M. E., Annu. Rev. Immunol., 1990, 8: 365 - 368

【非特許文献3】Sharar, S. R. & Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16: 359 - 378

【非特許文献4】Nakajima, H. & J. Exp. Med., 1994, 179: 1145 - 1154

【非特許文献5】Butcher, E. C. & Science, 1996, 272: 60 - 66

【非特許文献6】Ellices, M. J. & Cell, 1990, 60: 577 - 584

【非特許文献7】Makarem, R. & J. Biol. Chem., 1994, 269: 4005 - 4011

【非特許文献8】Chuluyan, H. E. & Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16: 391 - 404

【非特許文献9】Laberge, S. & Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1995, 151: 822 - 829

【非特許文献10】Barbadillo, C. & Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16: 375 - 379

【非特許文献11】Viney & J. Immunol., 1996, 157: 2488 - 2497

【非特許文献12】Podalski, D. K., N. Eng. J. Med., 1991, 325: 928 - 937

【非特許文献13】Powrie, F. & Ther. Immunol., 1995, 2: 115 - 123

【非特許文献14】Tidswell, M. & J. Immunol. (1997) 159: 1497 - 1505

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

(発明の開示)

本発明は部分的には、重要で好都合な治療標的として存在する一般的には生物学/細胞経路であるベータ7含有インテグリンの関与する生物学的経路の拮抗剤についての種々の発見に基づいている。このような生物学的経路は、例えば、炎症、特に慢性炎症性障害、例えば喘息、アレルギー、IBD、糖尿病、移植及び対宿主性移植片病を包含する。本発明はアルファ4ベータ7インテグリンの細胞外部分へのMAdCAM及びVCAM-1の結合、及び、アルファEベータ7インテグリン相互作用とのE-カドヘリン相互作用に干渉することを包含する、ベータ7インテグリン媒介細胞接着及び/又はリクルートメント (recruitment) に干渉することに基づいた組成物及び方法を提供する。本明細書に記載した本発明の拮抗剤はベータ7インテグリンを介した異常又は望ましくないシグナリングに関連する病理学的状態をターゲティングする場合に使用するための重要な治療薬及び診断剤を提供する。従って、本発明はMAdCAM-アルファ4ベータ7結合及び胃腸上皮への白血球リクルートメント、結合及びアレルギー、喘息、IBD (例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎)、糖尿病、移植に関わる炎症、対宿主性移植片病及び/又は同種移植片障害及びベータ7インテグリンにより媒介される他の生物学的/生理学的な活性の調節を包含する、ベータ7インテグリン媒介経路を調節することに関連する方法、組成物、キット及び製造物品を提供する。

## 【0007】

1つの特徴において、本発明は治療における使用に適しており、そして、ベータ7イン

10

20

30

40

50

テグリン媒介経路の分断の種々の段階を誘発することができる抗ベータ7治療薬を提供する。例えば、1つの実施形態において、本発明は、F a bフラグメントとしての抗体が図1 A及び1 B又は図9 A及び9 Bに示す軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなるマウスF a bフラグメントと実質的に同じヒトベータ7への結合親和性を有するヒト化抗ベータ7抗体を提供する。別の実施形態においては、本発明は、F a bフラグメントとしての抗体が図1 A及び1 Bに示す軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列又は図9 A及び9 Bに示す可変ドメイン配列を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなるマウス又はラットF a bフラグメントよりも低い、例えば、少なくとも3分の1、少なくとも5分の1、少なくとも7分の1又は少なくとも10分の1である、ヒトベータ7への結合親和性を有する、ヒト化抗ベータ7抗体を提供する。或いは、本発明のヒト化抗ベータ7抗体又はそのベータ7結合フラグメントはヒトベータ7に対して1価の親和性を示し、その親和性は図1 A（配列番号10）及び/又は図1 B（配列番号11）又は図9 A（配列番号12）及び/又は図9 B（配列番号13）に示す軽鎖及び重鎖の可変配列を含む抗体のヒトベータ7に対する1価の親和性と実質的に同じかそれより大きい。ヒトベータ7に対する大きい親和性を有する抗体又はその結合フラグメントは、図1 A（配列番号10）及び/又は図1 B（配列番号11）又は図9 A（配列番号12）及び/又は図9 B（配列番号13）に示す軽鎖及び重鎖の配列を含む抗体よりも、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、少なくとも5000倍、少なくとも10000倍高値である親和性を示す。

10

20

#### 【0008】

別の実施形態においては、F a bフラグメントとしての抗体が、それぞれ図1 A及び図1 Bに示す軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなるげっ歯類（例えばラット又はマウス）のF a bフラグメントよりも高値、例えば少なくとも3、少なくとも5、少なくとも7、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20又は少なくとも100倍高値であるヒトベータ7に対する結合親和性を有する。1つの実施形態において、上記げっ歯類F a bフラグメントはAmerican Type Culture Collection Accession Number ATCC HB-293の下に寄託されているハイブリドーマ細胞株により生産されるFIB504.64と標記されるラット抗体の可変ドメイン配列を含むF a bフラグメントの結合親和性を有する。別の実施形態においては、本発明のヒト化F a bフラグメントは本発明のヒト化抗ベータ7抗体のいずれかにより生産される抗体の可変ドメイン配列を含むF a bフラグメントの結合親和性を有する。当該分野で十分確立されている通り、リガンドのその受容体への結合親和性は種々の試験の何れかを用いて測定することができ、そして種々の定量的数値において表示できる。従って、1つの実施形態において、結合親和性はKd値として表示し、内因性結合親和性（例えば最小限化されたアビディティ作用を伴う）を反映している。一般的に、そして好ましくは、結合親和性は無細胞系又は細胞関連の状況の何れかに関わらず、インビトロで測定される。本明細書において詳述する通り、結合親和性における倍差は、F a b形態のヒト化抗体の結合親和性の値及び参照物/比較物のF a b抗体（例えばドナー超可変領域配列を有するマウス抗体）の結合親和性の値の比として定量することができ、ここで結合親和性の値は同様の試験条件下で測定される。即ち、1つの実施形態において、結合親和性における倍差は、F a b形態のヒト化抗体及び上記参照物/比較物のF a b抗体のKd値の比として測定される。例えばBiacore（登録商標）（Biacore International Ab, Uppsala, Sweden）及びELISAを包含する本明細書に記載するものを包含する当該分野で知られた多くの試験の何れかを用いることにより結合親和性の測定値を得ることができる。

30

40

#### 【0009】

種々の特徴及び実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体は本出願の潜在的請求項の以下のセット：

50

( a ) 下記 :

( i ) 配列 A 1 - A 1 1 を含む H V R - L 1、ここで A 1 - A 1 1 は R A S E S V D T Y L H ( 配列番号 1 ) であるもの、

( i i ) 配列 B 1 - B 8 を含む H V R - L 2、ここで B 1 - B 8 は K Y A S Q S I S ( 配列番号 2 ) であるもの、

( i i i ) 配列 C 1 - C 9 を含む H V R - L 3、ここで C 1 - C 9 は Q Q G N S L P N T ( 配列番号 3 ) であるもの、

( i v ) 配列 D 1 - D 1 0 を含む H V R - H 1、ここで D 1 - D 1 0 は G F F I T N N Y W G ( 配列番号 4 ) であるもの、

( v ) 配列 E 1 - E 1 7 を含む H V R - H 2、ここで E 1 - E 1 7 は G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S ( 配列番号 5 ) であるもの ; および、

( v i ) 配列 F 2 - F 1 1 を含む H V R - H 3、ここで F 2 - F 1 1 は M T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 ) であるもの、

からなる群より選択される少なくとも 1、2、3、4 又は 5 又は超可変領域 ( H V R ) 配列 ;

を含む抗ペータ 7 抗体又はそのペータ 7 結合フラグメントを含む抗体を指向している。

【 0 0 1 0 】

請求項 1 のポリペプチド又は抗体の実施形態においては、このポリペプチド又は抗体は、少なくとも 1 つの変異体 H V R を含み、この変異体 H V R の配列は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8 及び 9 に示す配列のうち少なくとも 1 つに、少なくとも 1 つの残基の修飾を含む。

【 0 0 1 1 】

請求項 1 又は 2 の別の実施形態においては、本発明は H V R - L 1、H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 からなる群より選択される 1、2、3、4、5 又は 6 つの超可変領域 ( H V R ) を含む抗ペータ 7 抗体又はそのペータ 7 結合フラグメントを含み、ここで :

( i ) H V R - L 1 はアミノ酸配列 R A S E S V D T Y L H ( 配列番号 1 ) ; R A S E S V D S L L H ( 配列番号 7 )、R A S E S V D T L L H ( 配列番号 8 )、又は R A S E S V D D L L H ( 配列番号 9 ) を含み ;

( i i ) H V R - L 2 はアミノ酸配列 K Y A S Q S I S ( 配列番号 2 )、R Y A S Q S I S ( 配列番号 6 7 ) 又は X Y A S Q S I S ( 配列番号 6 8、ここで X は何れかのアミノ酸を示す ) を含み ;

( i i i ) H V R - L 3 はアミノ酸配列 Q Q G N S L P N T ( 配列番号 3 ) を含み ;

( i v ) H V R - H 1 はアミノ酸配列 G F F I T N N Y W G ( 配列番号 4 ) を含み ;

( v ) H V R - H 2 はアミノ酸配列 G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S ( 配列番号 5 ) を含み ; そして、

( v i ) H V R - H 3 は相対的な位置 F 2 - F 1 1 についてアミノ酸配列 M T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 ) 又は R T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 6 ) を含むか ; 又はアミノ酸配列 F 1 - F 1 1 を含み、ここで F 1 - F 1 1 は A M T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 3 )、A R T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 4 ) 又は A Q T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 5 ) である。

【 0 0 1 2 】

請求項 1 の更に別の実施形態又は実施形態の何れかにおいて、本発明は H V R - L 1、H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 からなる群より選択される 1、2、3、4、5 又は 6 つの超可変領域 ( H V R ) を含む抗ペータ 7 抗体又はそのペータ 7 結合フラグメントを含み、ここで :

( i ) H V R - L 1 はアミノ酸配列 A 1 - A 1 1 を含み、ここで A 1 - A 1 1 は R A S E S V D T Y L H ( 配列番号 1 ) ; R A S E S V D S L L H ( 配列番号 7 )、R A S E S V D T L L H ( 配列番号 8 )、又は R A S E S V D D L L H ( 配列番号 9 ) 又は配列番号 1、7、8 又は 9 の変異体であり、ここで、アミノ酸 A 2 は A、G、S、T 及び V からなる

10

20

30

40

50

群より選択され、及び/又はアミノ酸 A 3 は S、G、I、K、N、P、Q、R 及び T からなる群より選択され、及び/又は、アミノ酸 A 4 は E、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N 及び R からなる群より選択され、及び/又は、アミノ酸 A 5 は S、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T 及び V からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 A 6 は V、R、I、A、G、K、L、M 及び Q からなる群より選択され、及び/又は、アミノ酸 A 7 は D、V、S、A、E、G、H、L、K、L、N、P、S 及び T からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 A 8 は D、G、N、E、T、P 及び S からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 A 9 は L、Y、I 及び M からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 A 10 は L、A、I、M 及び V からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 A 11 は H、Y、F 及び S からなる群より選択され；

10

( i i ) H V R - L 2 はアミノ酸配列 B 1 - B 8 を含み、ここで B 1 - B 8 は K Y A S Q S I S (配列番号 2)、R Y A S Q S I S (配列番号 6 7) 又は X Y A S Q S I S (配列番号 6 8、ここで X は何れかのアミノ酸を示す) 又は配列番号 2、6 7 又は 6 8 の変異体であり、ここでアミノ酸 B 1 は K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y 及び X からなる群より選択され(ここで X は何れかのアミノ酸を示す)、及び/又はアミノ酸 B 4 は S 及び D からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 B 5 は Q 及び S からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 B 6 は S、D、L 及び R からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 B 7 は I、V、E 及び K からなる群より選択され；

( i i i ) H V R - L 3 はアミノ酸配列 C 1 - C 9 を含み、ここで C 1 - C 9 は Q Q G N S L P N T (配列番号 3) 又は配列番号 3 の変異体であり、ここでアミノ酸 C 8 は N、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、M 及び Y からなる群より選択され；

20

( i v ) H V R - H 1 はアミノ酸配列 D 1 - D 10 を含み、ここで D 1 - D 10 は G F F I T N N Y W G (配列番号 4) であり、

( v ) H V R - H 2 はアミノ酸配列 E 1 - E 17 を含み、ここで E 1 - E 17 は G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S (配列番号 5) 又は配列番号 5 の変異体であり、ここでアミノ酸 E 2 は Y、F、V 及び D からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 E 6 は S 及び G からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 E 10 は S 及び Y からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 E 12 は N、T、A 及び D からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 E 13 は P、H、D 及び A からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 E 15 は L 及び V からなる群より選択され、及び/又はアミノ酸 E 17 は S 及び G からなる群より

30

選択され；そして、  
( v i ) H V R - H 3 はアミノ酸配列 F 2 - F 11 を含み、ここで F 2 - F 11 は M T G S S G Y F D F (配列番号 6) 又は R T G S S G Y F D F (配列番号 6 6) であるか；又はアミノ酸配列 F 1 - F 11 を含み、ここで F 1 - F 11 は A M T G S S G Y F D F (配列番号 6 3)、A R T G S S G Y F D F (配列番号 6 4) 又は A Q T G S S G Y F D F (配列番号 6 5) 又は配列番号 6、6 3、6 4、6 5 又は 6 6 の変異体であり、ここでアミノ酸 F 2 は R、M、A、E、G、Q、S であり、及び/又は、アミノ酸 F 11 は F 及び Y からなる群より選択される。

#### 【 0 0 1 3 】

請求項 1 の 1 つの実施形態又は本発明の抗体の何れかにおいて、重鎖フレームワーク 7 1 位 ( K a b a t ナンバリング法による) におけるアミノ酸は R、A 及び T からなる群より選択され；及び/又は重鎖フレームワーク 7 3 位 ( K a b a t ナンバリング法による) におけるアミノ酸は N 及び T からなる群より選択され；及び/又は重鎖フレームワーク 7 8 位 ( K a b a t ナンバリング法による) におけるアミノ酸は F、A 及び L からなる群より選択される。

40

#### 【 0 0 1 4 】

請求項 1 の 1 つの実施形態又は本発明の抗体の何れかにおいて、本発明の抗体の H V R - L 1 は配列番号 1 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体の H V R - L 2 は配列番号 2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体の H V R - L 3 は配列番号 3 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体の H V R - H 1 は配列番号 4 を含む。1 つ

50

の実施形態において、本発明の抗体のHVR - H2は配列番号5を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体のHVR - H3は、相対的な位置F2 - F11に配列番号6又は66を、又は相対的な位置F1 - F11に配列番号63、64又は65を含む。1つの実施形態において、HVR - L1はRASESVDSLH(配列番号7)を含む。1つの実施形態において、HVR - L1はRASESVDTLLH(配列番号8)を含む。1つの実施形態において、HVR - L1はRASESVDDLH(配列番号9)を含む。1つの実施形態においてこれらの配列(本明細書に記載する通りの組み合わせにおいて)を含む抗体はヒト化又はヒト型のものである。

#### 【0015】

1つの特徴において、本発明は1、2、3、4、5又は6つのHVRを含む抗体を提供し、ここで各HVRは配列番号1、2、3、4、5、6、7、8及び9からなる群より選択される配列を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなるものであり、そしてここで配列番号1、7、8又は9はHVR - L1に相当し、配列番号2はHVR - L2に相当し、配列番号3はHVR - L3に相当し、配列番号4はHVR - H1に相当し、配列番号5はHVR - H2に相当し、そして配列番号6はHVR - H3に相当する。1つの実施形態において、本発明の抗体はHVR - L1、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、ここで各々はこの順序において、配列番号1、2、3、4、5及び6を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体はHVR - L1、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、ここで各々はこの順序において、配列番号7、2、3、4、5及び6を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体はHVR - L1、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、ここで各々はこの順序において、配列番号8、2、3、4、5及び6を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体はHVR - L1、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、ここで各々はこの順序において、配列番号9、2、3、4、5及び6を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体はHVR - L1、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、ここで各々はこの順序において、配列番号9、2、3、4、5及び66、又は配列番号9、2、3、4、5、63、又は配列番号9、2、3、4、5、64、又は配列番号9、2、3、4、5、65、又は配列番号9、67、3、4、5、64、又は配列番号9、68、3、4、5、64を含む。

10

20

30

#### 【0016】

本発明の抗体における変異体HVRはHVR内の1つ以上の残基の修飾を有してよく、及び/又はフレームワーク領域をヒト化してよい。HVR及び/又はフレームワークの修飾が存在する本発明の実施形態は例えば本出願の以下の潜在的請求項を包含する。

#### 【0017】

請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここで変異体HVR - L1におけるA8はS、D又はTであり、そしてA9はLであるもの。

3. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここで抗体はヒト化されているもの。

4. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここでフレームワーク配列の少なくとも一部はヒトコンセンサスフレームワーク配列であるもの。

40

5. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここで上記修飾が置換、挿入又は欠失であるもの。

6. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここでHVR - L1変異体が以下の位置：A2(G、S、T又はV)；A3(G、I、K、N、P、Q、R又はT)；A4(A、D、G、H、I、K、L、N、Q、R又はV)；A5(A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、V又はY)；A6(A、G、I、K、L、M、Q又はR)；A7(A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、T又はV)；A8(S、D、E、G、P又はN)；A9(L、I又はM)；A10(A、I、M又はV)及びA11(F、S又はY)の何れかの組み合わせにおいて1~10(1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10)置換を含むもの。

50

7. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここでHVR-L2変異体が以下の位置：B1(N)、B5(S)、B6(R又はL)及びB7(T、E、K又はV)の何れかの組み合わせにおいて1~4(1、2、3又は4)置換を含むもの。

8. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここでHVR-L3変異体が位置C8(W、Y、R、S、A、F、H、I、L、M、N、T又はV)において少なくとも1つの置換を含むもの。

9. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここでHVR-H2変異体が以下の位置：E2(V、D又はF)、E6(G)、E10(Y)、E12(A、D又はT)、E13(D、A又はH)、E15(V)、E17(G)の何れかの組み合わせにおいて1~7(1、2、3、4、5、6又は7)置換を含むもの。

10. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体、ここでHVR-H3変異体が以下の位置：F2(A、E、G、Q、R又はS)及びF11(Y)の何れかの組み合わせにおいて1又は2置換を含むもの。

11. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体であって配列番号7の配列を有するHVR-L1を含むもの。

12. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体であって配列番号8の配列を有するHVR-L1を含むもの。

13. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体であって配列番号9の配列を有するHVR-L1を含むもの。

14. 請求項11~13の何れか1項に記載の抗体であって、71、73及び/又は78位に置換を含む重鎖サブグループIII重鎖コンセンサスフレームワーク配列を含むもの。

15. 請求項14又はその実施形態の1つの抗体であって、置換がR71A、N73T及び/又はN78Aであるもの。

16. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体であって、配列番号3の配列を有するHVR-L3を含むもの。

17. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体であって、変異体HVR-L1のA8がSであるもの。

18. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体であって、変異体HVR-L1のA8がDであるもの。

19. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体であって、変異体HVR-L1のA9がLであるもの。

20. 請求項1又はその実施形態の1つの抗体であって、配列番号E1-E17とF1-F11の間のフレームワーク配列がHFR3-1-HFR3-31であり、HFR3-6はA又はRであり、HFR3-8はN又はTであり、そしてHFR3-13がL又はA又はFであるもの。

21. ヒト化抗ペータ7抗体であって、ここで抗体のヒトペータ7に対する1価の親和性が図9に示す軽鎖及び重鎖の可変配列を含むラット抗体の1価の親和性と実質的に同じであるもの。

22. ヒト化抗ペータ7抗体であって、ここで抗体のヒトペータ7に対する1価の親和性が図9に示す軽鎖及び重鎖の可変配列を含むラット抗体の1価の親和性の少なくとも3倍高値であるもの。

23. 請求項11又は22記載のヒト化抗体であって、ラット抗体がHB-293の標記を有するAmerican Type Culture Collection Accession Number ATCC下に寄託されているハイブリドーマにより生産されるもの。

24. 請求項11~23の何れかに記載の抗体であって、結合親和性がKd値で表示されるもの。

25. 請求項11~24の何れかに記載の抗体であって、結合親和性がBiacore<sup>TM</sup>又はラジオイムノアッセイで測定されるもの。

10

20

30

40

50



26．請求項1記載の抗体であって、ヒトサブグループ軽鎖コンセンサスフレームワーク配列を含むもの。

27．請求項1記載の抗体であって、ヒトサブグループI I I重鎖コンセンサスフレームワーク配列を含むもの。

28．請求項17記載の抗体であって、フレームワーク配列が71、73及び/又は78位に置換を含むもの。

29．請求項18記載の抗体であって、上記置換がR71A、N73T及び/又はN78Aにあるか、71位の置換アミノ酸がR又はAであり、及び/又は78位のアミノ酸置換がN又はTであり、及び/又は78位のアミノ酸置換がL又はA又はFであるもの。

30．請求項18記載の抗体であって、上記置換がL78F又はA78F又はA78L又はL78Aであるもの。

31．ヒトベータ7インテグリンサブユニットの第2のインテグリンサブユニット及び/又はリガンドとの相互作用を阻害する方法であって、請求項1～30の何れか1項の抗体を第2のインテグリンサブユニット及び/又はリガンドに接触させることによる方法。

32．請求項31記載の方法であって、第2のインテグリンサブユニットがアルファ4インテグリンサブユニットであり、そしてリガンドがMAdCAM、VCAM又はフィブロネクチンであるもの。

33．請求項32記載の方法であって、アルファ4インテグリンサブユニットがヒト型であるもの。

34．請求項33記載の方法であって、リガンドがヒト型であるもの。

35．請求項32記載の方法であって、第2のインテグリンサブユニットがアルファEインテグリンサブユニットであり、そしてリガンドがE-カドヘリンであるもの。

36．請求項35記載の方法であって、アルファEインテグリンサブユニットがヒト型であるもの。

37．請求項36記載の方法であって、リガンドがヒト型であるもの。

38．請求項31記載の方法であって、阻害により、炎症、喘息、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性結腸炎、糖尿病、臓器移植に起因する炎症、対宿主性移植片病、及び、同種移植片障害に関連する炎症からなる群より選択される障害の症状が低減又は緩和されるもの。

#### 【0018】

本発明の別の実施形態は以下のものを包含する。

#### 【0019】

1つの実施形態において、HVR-L1変異体は配列番号1、7、8又は9であるか、又は以下の位置：A2(A、G、S、T又はV)；A3(S、G、I、K、N、P、Q、R又はT)；A4(E、A、D、G、H、I、K、L、N、Q、R又はV)；A5(S、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、V又はY)；A6(V、A、G、I、K、L、M、Q又はR)；A7(D、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、T又はV)；A8(T、S、D、E、G、P又はN)；A9(Y、L、I又はM)；A10(L、A、I、M又はV)及びA11(H、F、S又はY)の何れかの組み合わせにおいて相対的な位置A1～A11において1～10(1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10)置換を含む配列番号1、7、8又は9のHVR-L1変異体である。1つの実施形態において、HVR-L2は配列番号2、67又は68であるか、又は、以下の位置：B1(K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y又はX(Xは何れかのアミノ酸を示す))、B4(S)、B5(Q又はS)、B6(S、R又はL)及びB7(I、T、E、K又はV)の何れかの組み合わせにおいて相対的な位置B1～B8において1～4(1、2、3、4、4又は5)置換を含む配列番号2、67又は68のHVR-L2変異体である。1つの実施形態において、HVR-L3は配列番号3であるか、又はHVR-L3は位置C8(W、Y、R、S、A、F、H、I、L、M、N、T又はV)のような位置において相対的な位置C1～C8において少なくとも1つの置換を含む配列番号3のHVR-L3変異体である。1つの実施形態において、HVR-H1は配列番号4である。1つの実施形

10

20

30

40

50

態において、HVR - H2は配列番号5であるか、又は以下の位置：E2（Y、V、D又はF）、E6（S又はG）、E10（S又はY）、E12（N、A、D又はT）、E13（P、D、A又はH）、E15（L又はV）、E17（S又はG）の何れかの組み合わせにおいて相対的な位置E1～E17において1～7（1、2、3、4、5、6又は7）置換を含むHVR - H2の変異体である。1つの実施形態において、HVR - H3は配列番号6、63、64、65又は66であるか、又は、以下の位置：F2（M、A、E、G、Q、R又はS）及びF11（F又はY）の何れかの組み合わせにおいて、配列番号63、64及び65に関しては相対的な位置F1 - F11において、又は、配列番号6及び66に関しては相対的な位置F2 - F11において、1又は2置換を含む配列番号6、63、64、65又は66のHVR - H3変異体である。本明細書の観点においては置換アミノ酸は当該分野で知られた、及び/又は、本明細書に記載した手法を用いて日常的に評価できるものであるため、各位置に続くカッコ内の文字は、適切には別のアミノ酸の当業者のよく知るコンセンサス又は他のアミノ酸に関する例示される置換（即ち置き換え）アミノ酸を示す。

10

20

30

40

50

#### 【0020】

1つの実施形態においてHVR - L1は配列番号1の配列を有する。1つの実施形態において変異体HVR - L1におけるA8はDである。1つの実施形態において、変異体HVR - L1におけるA8はSである。1つの実施形態において変異体HVR - L1におけるA9はLである。1つの実施形態において、変異体HVR - L1におけるA8はDであり、変異体HVR - L1におけるA9はLである。1つの実施形態において、変異体HVR - L1におけるA8はSであり変異体HVR - L1におけるA9はLである。本発明の1つの実施形態において、HVR - L1、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3におけるこれらの変異は、この順序において、配列番号2、3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。一部の実施形態においては、HVR - H3は配列番号6又は66（相対的な位置F2 - F11に関して）又は配列番号63又は64又は65（相対的な位置F1 - F11に関して）を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

#### 【0021】

1つの実施形態において、HVR - L1におけるA8はIであり、そしてHVR - L1におけるA9はLであり、この変異体は更に、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号2、3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

#### 【0022】

1つの実施形態において、変異体HVR - L1におけるA8、A9及びA10はそれぞれD、L及びVであり、この変異体は更に、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号2、3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

#### 【0023】

1つの実施形態において、変異体HVR - L1におけるA8及びA9はそれぞれN及びLであり、この変異体は更に、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号2、3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

#### 【0024】

1つの実施形態において、変異体HVR - L1におけるA8及びA9はそれぞれP及びLであり、そして変異体HVR - L2におけるB6及びB7はそれぞれR及びTであり、この変異体は更に、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

#### 【0025】

1つの実施形態において、変異体HVR - L1におけるA2、A4、A8、A9及びA

10はそれぞれS、D、S、L及びVであり、この変異体は更に、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号2、3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

【0026】

1つの実施形態において、変異体HVR-L1におけるA5及びA9はそれぞれD及びTであり、この変異体は更に、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号2、3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

【0027】

1つの実施形態において、変異体HVR-L1におけるA5及びA9はそれぞれN及びLであり、この変異体は更に、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号2、3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

【0028】

1つの実施形態において、変異体HVR-L1におけるA9はLであり、この変異体は更に、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号2、3、4、5及び6を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

【0029】

1つの実施形態において、本発明の抗体又は抗ペータ7結合ポリペプチドは、HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、各HVRは、この順序において、配列番号9、2、3、4、5及び64を含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。別の実施形態において、各HVRは、配列番号9、67、3、4、5及び64をこの順序において含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。別の実施形態において、各HVRは、配列番号9、68、3、4、5及び64をこの順序において含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。別の実施形態において、各HVRは、配列番号9、2又は67又は68、3、4、5及び66をこの順序において含むか、これよりなるか、本質的にこれよりなる。

【0030】

一部の実施形態においては、上記変異体HVR-L1抗体変異体は更に、HVR-L2、HVR-L3、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、ここで各々は配列番号2、3、4、5及び6に示した配列をこの順序で含む。抗体変異体がHVR-L1A8(P)及びA9(L)及びHVR-L2B6(R)及びB7(T)を含む場合は、一部の実施形態においては上記HVR-L1、HVR-L2変異体は更にHVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、ここで各々は配列番号3、4、5及び6に示す配列をこの順序に含む。

【0031】

一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループIII重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の1つの実施形態において、フレームワークコンセンサス配列は71、73及び/又は78位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、71位はA、73位はT及び/又は78位はAである。これらの抗体の1つの実施形態において、これらの抗体は更にヒトI軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

【0032】

1つの実施形態において、本発明の抗体は配列番号1を含むHVR-L1を含む。1つの実施形態において、本発明の変異体抗体はA10がVである変異体HVR-L1を含む。1つの実施形態において、上記変異体抗体は更にHVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、ここで各々は配列番号2、3、4、5及び6に示した配列をこの順序で含む。一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒ

10

20

30

40

50

トサブグループ I I I 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 7 1、7 3 及び / 又は 7 8 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、7 1 位は A、7 3 位は T 及び / 又は 7 8 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態においては、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

**【 0 0 3 3 】**

1 つの実施形態において、本発明の抗体は配列番号 3 を含む H V R - L 3 を含む。1 つの実施形態において、本発明の変異体抗体は C 8 が L である変異体 H V R - L 3 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に H V R - L 1、H V R - L 2、H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 を含み、ここで各々は配列番号 1、2、4、5 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は C 8 が W である H V R - L 3 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に H V R - L 1、H V R - L 2、H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 を含み、ここで各々は配列番号 1、2、4、5 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。一部の実施形態においては、H V R - L 1 は配列番号 7、8 又は 9 を含む。一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループ I I I 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 7 1、7 3 及び / 又は 7 8 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、7 1 位は A、7 3 位は T 及び / 又は 7 8 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態において、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

**【 0 0 3 4 】**

1 つの実施形態において、本発明の抗体は配列番号 6 を含む H V R - H 3 を含む。1 つの実施形態において、上記抗体の変異体は F 1 が Q である変異体 H V R - H 3 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に H V R - L 1、H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1 及び H V R - H 2 を含み、ここで各々は配列番号 1、2、3、4 及び 5 に示した配列をこの順序で含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は F 1 が R である変異体 H V R - H 3 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に H V R - L 1、H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1 及び H V R - H 2 を含み、ここで各々は配列番号 1、2、3、4 及び 5 に示した配列をこの順序で含む。1 つの実施形態において、H V R - L 1 は配列番号 7、8 又は 9 を含む。一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループ I I I 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 7 1、7 3 及び / 又は 7 8 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、7 1 位は A、7 3 位は T 及び / 又は 7 8 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態において、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

**【 0 0 3 5 】**

1 つの実施形態において、本発明の抗体は配列番号 1 を含む H V R - L 1 を含む。1 つの実施形態においては、本発明の変異体抗体は A 4 が Q である変異体 H V R - L 1 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 を含み、ここで各々は配列番号 2、3、4、5 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。1 つの実施形態において、本発明の変異体抗体は A 6 が I である変異体 H V R - L 1 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 を含み、ここで各々は配列番号 2、3、4、5 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。1 つの実施形態において、本発明の変異体抗体は A 7 が S である変異体 H V R - L 1 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 を含み、こ

ここで各々は配列番号 2、3、4、5 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループ III 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 71、73 及び / 又は 78 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、71 位は A、73 位は T 及び / 又は 78 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態において、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

【0036】

1 つの実施形態において、本発明の抗体は配列番号 2 を含む HVR - L2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は B1 が N である変異体 HVR - L2 を含む。1 つの実施形態においては、本発明の抗体は B5 が S である変異体 HVR - L2 を含む。1 つの実施形態においては、本発明の抗体は B6 が L である変異体 HVR - L2 を含む。1 つの実施形態においては、本発明の抗体は B7 が V である変異体 HVR - L2 を含む。1 つの実施形態においては、本発明の抗体は B7 が E 又は K である変異体 HVR - L2 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に HVR - L1、HVR - L3、HVR - H1、HVR - H2 及び HVR - H3 を含み、ここで各々は配列番号 1、3、4、5 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。一部の実施形態においては、HVR - L1 は配列番号 7、8 又は 9 を含む。一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループ III 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 71、73 及び / 又は 78 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、71 位は A、73 位は T 及び / 又は 78 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態において、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

【0037】

1 つの実施形態において、本発明の抗体は配列番号 3 を含む HVR - L3 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は C8 が W、Y、R 又は S である変異体 HVR - L3 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に HVR - L1、HVR - L2、HVR - H1、HVR - H2 及び HVR - H3 を含み、ここで各々は配列番号 1、2、4、5 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。一部の実施形態においては、HVR - L1 は配列番号 7、8 又は 9 を含む。一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループ III 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 71、73 及び / 又は 78 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、71 位は A、73 位は T 及び / 又は 78 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態において、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

【0038】

1 つの実施形態において、本発明の抗体は配列番号 5 を含む HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は E2 が F である変異体 HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は E2 が V 又は D である変異体 HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は E6 が G である変異体 HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は E10 が Y である変異体 HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は E12 が A、D 又は T である変異体 HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は E13 が D、A 又は N である変異体 HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は E15 が V である変異体 HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は E17 が G である変異体 HVR - H2 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に HVR - L1、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1 及び HVR - H3 を含み、ここで各々は配列番号 1、2、3、4 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。一部の実施形態においては、HVR - L1 は配列番号 7、8 又は 9 を含む。一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループ III 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一

10

20

30

40

50

部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 7 1、7 3 及び / 又は 7 8 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、7 1 位は A、7 3 位は T 及び / 又は 7 8 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態において、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

【0039】

1 つの実施形態において、本発明の抗体は配列番号 6 を含む H V R - H 3 を含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は F 1 1 が Y である変異体 H V R - H 3 を含む。1 つの実施形態において、上記変異体抗体は更に H V R - L 1、H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1 及び H V R - H 3 を含み、ここで各々は配列番号 1、2、3、4 及び 6 に示した配列をこの順序で含む。一部の実施形態においては、H V R - L 1 は配列番号 7、8 又は 9 を含む。一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループ I I I 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 7 1、7 3 及び / 又は 7 8 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、7 1 位は A、7 3 位は T 及び / 又は 7 8 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態において、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

10

【0040】

一部の実施形態においては、これらの抗体は更にヒトサブグループ I I I 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、フレームワークコンセンサス配列は 7 1、7 3 及び / 又は 7 8 位に置換を含む。これらの抗体の一部の実施形態においては、7 1 位は A、7 3 位は T 及び / 又は 7 8 位は A である。これらの抗体の 1 つの実施形態において、これらの抗体は更にヒト I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。

20

【0041】

宿主被験体における使用のための治療薬は好ましくは、その宿主において薬剤に対抗する免疫原性応答を殆ど、又は、全く誘発しない。1 つの実施形態において、本発明はこのような薬剤を提供する。例えば、1 つの実施形態において、本発明は宿主被験体において配列番号 1 0 及び / 又は 1 1 ( 図 1 A 及び 1 B ) 又は配列番号 1 2 及び / 又は 1 3 ( ラット抗マウス F i b 5 0 4 アミノ酸配列を示す図 9 A 及び 9 B ) を含む配列を含む抗体と比較して、実質的に低減された水準のヒト抗げっ歯類抗体応答 ( 例えば抗マウス又は抗ラット応答 ) 又はヒト抗ヒト応答を誘発する及び / 又は誘発すると予測されるヒト化抗体を提供する。別の実施形態において、本発明はヒト抗げっ歯類 ( 例えばヒト抗マウス ( H A M A ) 又はヒト抗マウス ) 又はヒト抗ヒト抗体応答 ( H A H A ) を誘発しない、及び / 又は、誘発しないと予測されるヒト化抗体を提供する。

30

【0042】

本発明のヒト化抗体はその重鎖及び / 又は軽鎖の可変ドメインにおいて 1 つ以上のヒト及び / 又はヒトコンセンサス非超可変領域 ( 例えばフレームワーク ) を含む。一部の実施形態においては、追加的な修飾 1 つ以上がヒト及び / 又はヒトコンセンサス非超可変領域配列内に存在する。1 つの実施形態において、本発明の抗体の重鎖可変ドメインはヒトコンセンサスフレームワークを含み、これは 1 つの実施形態においてはサブグループ I I I コンセンサスフレームワーク配列である。1 つの実施形態において、本発明の抗体は少なくとも 1 つのアミノ酸位置において修飾された変異体サブグループ I I I コンセンサスフレームワーク配列を含む。例えば、1 つの実施形態において、変異体サブグループ I I I コンセンサスフレームワーク配列は 7 1、7 3、7 8 及び / 又は 9 4 位の 1 つ以上において置換を含んでよい。1 つの実施形態においては、そのような置換は何れかの組み合わせにおける R 7 1 A、N 7 3 T、L 7 8 A 及び / 又は R 9 4 M である。

40

【0043】

当該分野で知られるとおり、そして後により詳細に説明するとおり、アミノ酸位置 / 抗体の超可変領域を決定する境界は、当該分野で知られた観点及び種々の定義に応じて変動することができる ( 後述参照 ) 。可変ドメイン内の一部の位置は、それらの位置がある 1

50

つのセットの基準の下においては超可変領域内にあると考えられるが、異なるセットの基準の下においては超可変領域外にあると考えられるという点において、ハイブリッド超可変位置とみなしてよい。これらの位置の1つ以上はまた伸長した超可変領域内にも存在することができる(後述参照)。本発明はこれらのハイブリッド超可変位置内の修飾を含む抗体を提供する。1つの実施形態において、ハイブリッド超可変位置は重鎖可変ドメイン内の位置26-30、33-35B、47-49、49、57-65、93、94及び102の1つ以上を包含する。1つの実施形態において、これらのハイブリッド超可変位置は軽鎖可変ドメイン内の位置24-29、35-36、46-49、49、56及び97の1つ以上を包含する。1つの実施形態において、本発明の抗体はハイブリッド超可変位置1つ以上において修飾された変異体ヒトサブグループコンセンサスフレームワーク配列を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体は位置28-35、49、50、52a、53、54、58-61、63、65、94及び102の1つ以上において修飾された変異体ヒトサブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列を含む重鎖可変ドメインを含む。1つの実施形態において、抗体はT28F、F29I、S30T、S31N、Y32N、A33Y、M34W及びS35G置換を含む。1つの実施形態において、抗体はS49G置換を含む。1つの実施形態において、抗体はV50F又はV50D又はV50Y置換を含む。1つの実施形態において、抗体はG53Y置換を含む。1つの実施形態において、抗体はG54S置換を含む。1つの実施形態において、抗体はY58S置換を含む。1つの実施形態において、抗体はA60N又はA60D又はA60T置換を含む。1つの実施形態において、抗体はD61P又はD61A又はD61H置換を含む。1つの実施形態において、抗体はV63L置換を含む。1つの実施形態において、抗体はG65S置換を含む。1つの実施形態において、抗体はR94M置換を含む。1つの実施形態において、抗体はR94A又はR94E又はR94G又はR94Q又はR94S置換を含む。1つの実施形態において、抗体はG95T置換を含む。1つの実施形態において、抗体は位置28-35、49、50、52a、53、54、58-61、63、65、94及び102において置換1つ以上を有し、そして更に、R71A又はN73T又はL78A又はL78Fの1つ以上を含む。1つの実施形態において、抗体はY102F置換を含む。これらの置換は重鎖のHVR-H1、HVR-H2及び/又はHVR-H3にあることが図1Bを参照することによりわかる。

10

20

30

40

50

#### 【0044】

1つの実施形態において本発明の抗体は位置27、29-31、33、34、49、50、53-55、91及び96の1つ以上において修飾された変異体ヒトサブグループIコンセンサスフレームワーク配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。1つの実施形態において、抗体はQ27E置換を含む。1つの実施形態において、抗体はI29V置換を含む。1つの実施形態において、抗体はS30D置換を含む。1つの実施形態において、抗体はN31T又はN31S又はN31D置換を含む。1つの実施形態において、抗体はY32L置換を含む。1つの実施形態において、抗体はA34H置換を含む。1つの実施形態において、抗体はY49K置換を含む。1つの実施形態において、抗体はA50Y置換を含む。1つの実施形態において、抗体はS53Q置換を含む。1つの実施形態において、抗体はL54S置換を含む。1つの実施形態において、抗体はE55I又はE55V置換を含む。1つの実施形態において、抗体はY91G置換を含む。1つの実施形態において、抗体はW96N又はW96L置換を含む。1つの実施形態において、抗体はA25S置換を含む。1つの実施形態において、抗体はA25からG、S、T又はVへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体は置換の以下の群の1つ以上から選択される修飾を含む。例えば、1つの実施形態において、抗体はS26からG、I、K、N、P、Q又はTへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はQ27からE、A、D、G、H、I、K、L、N、Q、R又はVへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はS28からA、D、G、H、I、K、N、P、R、T、V又はYへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はI29からV、A、G、K、L、M、Q又はRへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はS30からD、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、T又はV

への置換を含む。1つの実施形態において、抗体はN 3 1からD、T、E又はGへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はY 3 2からL、I又はMへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はL 3 3からA、I、M又はVへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はA 3 4からH、F、Y又はSへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はY 4 9からK又はNへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はA 5 0 Y置換を含む。1つの実施形態において、抗体はS 5 3 Q置換を含む。1つの実施形態において、抗体はL 5 4 S置換を含む。1つの実施形態において、抗体はE 5 5からV、I又はKへの置換を含む。1つの実施形態において、抗体はY 9 1 G置換を含む。1つの実施形態において、抗体はW 9 6からN、L、W、Y、R、S、A、F、H、I、M、N、R、S、T、V又はYへの置換を含む。これらの置換は軽鎖のHVR - L 1、HVR - L 2及び/又はHVR - L 3にあることが図1 Aを参照することによりわかる。

10

## 【0045】

本発明の抗体は、抗体が所望の生物学的特性（例えば所望の結合親和性）を示す限り、何れかの適当なヒト又はヒトコンセンサス軽鎖フレームワーク配列を含むことができる。1つの実施形態において、本発明の抗体はヒト 軽鎖のフレームワーク配列の一部（又は全て）を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体はヒト サブグループIフレームワークコンセンサス配列の一部（又は全て）を含む。

## 【0046】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、計算の49位及び重鎖の94位が伸長されたHVRに包含される限り、そして、その49位がKであり、その94位が必然ではないが好ましくはMであり、そしてRでもあってよい限り、配列番号34～41及び図1、7及び8に示すフレームワーク配列を含む重鎖及び/又は軽鎖可変ドメインを含む。

20

## 【0047】

本発明の拮抗剤はベータ7関連の作法、例えばアルファ4インテグリンサブユニットとの会合、アルファEインテグリンサブユニットとの会合、アルファ4ベータ7インテグリンのMAdCAM、VCAM-1又はフィブロネクチンとの結合、及び、アルファEベータ7インテグリンのE-カドヘリンとの結合の1つ以上の特徴を調節するために使用できる。これらの作用は何れかの生物学的に該当する機序、例えばベータ7サブユニット又はアルファ4ベータ7又はアルファEベータ7 2量体インテグリンに結合するリガンドの分断により、及び/又は、2量体インテグリンの形成が阻害されるようにアルファ及びベータインテグリンのサブユニットの間の会合を分断することにより、調節することができる。従って、1つの実施形態において本発明はベータ7へのアルファ4の結合を阻害するベータ7拮抗剤抗体を提供する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はMAdCAMへのアルファ4ベータ7の結合を分断する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はVCAM-1へのアルファ4ベータ7の結合を分断する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はフィブロネクチンへのアルファ4ベータ7の結合を分断する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はアルファEへのベータ7の結合を分断する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はE-カドヘリンへのアルファEベータ7インテグリンの結合を分断する。干渉は直接又は間接的であることができる。例えば、ベータ7拮抗剤抗体はアルファ4ベータ7又はアルファEベータ7の2量体化領域の配列内のベータ7に結合してよく、これにより、インテグリンサブユニットの相互作用及びインテグリン2量体の形成を阻害する。別の例においては、ベータ7拮抗剤抗体はベータ7のリガンド結合ドメイン内の配列に結合してよく、これによりその結合相手（例えばアルファ4ベータについてはフィブロネクチン、VCAM及び/又はMAdCAM；又はアルファEベータ7インテグリンについてはE-カドヘリン）とのその結合ドメインの相互作用を防止する。別の例においては、ベータ7拮抗剤抗体はインテグリンサブユニット2量体化ドメイン又はリガンド結合ドメイン内にはないが、そのベータ7拮抗剤抗体結合によりベータ7ドメインがその結合相手（例えばアルファ4又はアルファEインテグリンサブユニット及び/又はリガンド、例えばフィブロネクチン、VCAM、MAdCAM又はE-カドヘリン）と相互作用する能力が妨害

30

40

50



されるような配列に結合してよい。1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体は、アルファ4又はアルファEサブユニットとのベータ7の2量体化が妨害されるようにベータ7（例えば細胞外ドメイン）に結合する。1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体はベータ7及び/又はアルファ4ベータ7及び/又はアルファEベータ7インテグリンがそれぞれのリガンドに結合する能力が妨害されるようにベータ7に結合する。例えば、1つの実施形態において、本発明はベータ7分子への結合によりその分子の2量体化を阻害する拮抗剤抗体を提供する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はベータ7のリガンド結合ドメイン中の配列に特異的に結合する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はアルファ4ベータ7インテグリンへのリガンドの結合（即ちフィブロネクチン、VCAM及び/又はMAdCAM）が妨害されるようにベータ7のリガンド結合ドメイン中の配列に特異的に結合する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はアルファEベータ7インテグリンへのリガンドの結合（即ちE-カドヘリン）が妨害されるようにベータ7のリガンド結合ドメイン中の配列に特異的に結合する。

10

## 【0048】

1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体はヘテロ2量体化を含むベータ7の2量体化（即ちアルファ4又はアルファEインテグリンサブユニット分子とのベータ7の2量体化）を妨害する。

## 【0049】

1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体はアミノ酸176～237をマッピングするベータ7インテグリンサブユニット上のエピトープに結合する。別の実施形態においては、本発明の拮抗剤抗体はFib504.64（ATCC HB-293）と実質的に同じエピトープであるベータ7インテグリン上のエピトープに結合する。エピトープ結合の測定は例えば競合結合分析のような標準的手法により行う。

20

## 【0050】

1つの特徴において、本発明は図13のアミノ酸置換の表において示すHVR配列の1、2、3、4、5又は全ての組み合わせを含む抗体を提供する。

## 【0051】

宿主被験体における使用のための治療薬は好ましくはその被験体において薬剤に対する免疫原性の応答を全く誘発しない。1つの実施形態において本発明はそのような薬剤を提供する。例えば、1つの実施形態において、本発明は宿主被験体において配列番号10、11、12及び/又は配列番号13の配列番号を含む抗体（ラット抗マウスFib504（ATCC HB-293）、図1及び9）と比較して実質的に低減された水準でヒト抗ラット又はヒト抗マウス又はヒト抗ヒト抗体応答を誘発する、及び/又は、誘発すると予測されるヒト化抗体を提供する。別の例においては、本発明はヒト抗マウス、ヒト抗ラット又はヒト抗ヒト抗体応答を全く誘発しない、及び/又は、誘発しないと予測されるヒト化抗体を提供する。

30

## 【0052】

本発明のヒト化抗体はその重鎖及び/又は軽鎖可変ドメイン内に1つ以上のヒト及び/又はヒトコンセンサス非超可変領域（例えばフレームワーク）配列を含んでよい。一部の実施形態においては、1つ以上の別の修飾がヒト及び/又はヒトコンセンサス非超可変領域の配列内に存在する。1つの実施形態において、本発明の抗体の重鎖可変ドメインはヒトコンセンサスフレームワーク配列を含み、これは1つの実施形態においてサブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列である。1つの実施形態においては、本発明の抗体は少なくとも1つのアミノ酸位置において修飾された変異体サブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列を含む。例えば、1つの実施形態において、変異体サブグループIIIコンセンサスフレームワーク配列は、94位は本発明の伸長重鎖超可変領域H3の一部であるが、71、73、78及び/又は94位の1つ以上において置換を含んでよい。1つの実施形態において、上記置換は何れかの組み合わせにおけるR71A、N73T、N78A及び/又はR94Mである。

40

50

## 【0053】

本発明の抗体は、抗体が所望の生物学的特性（例えば所望の結合親和性）を示す限り、何れかの適当なヒト又はヒトコンセンサス軽鎖フレームワーク配列を含むことができる。1つの実施形態において本発明の抗体はヒト 軽鎖のフレームワーク配列の少なくとも1部分（又は全て）を含む。1つの実施形態において本発明の抗体はヒト サブグループ I のフレームワークコンセンサス配列の少なくとも1部分（又は全て）を含む。

## 【0054】

本発明の拮抗剤はベータ7関連作用の1つ以上の特徴を調節するために使用することができる。例えば、ベータ7拮抗剤抗体はアルファ4ベータ7又はアルファEベータ72量体化領域の配列内のベータ7に結合し、そしてこれによりインテグリンサブユニットの相互作用及びインテグリン2量体の形成を阻害してよい。別の例においては、ベータ7拮抗剤抗体はベータ7のリガンド結合ドメイン内の配列に結合してよく、これによりその結合相手（例えばアルファ4ベータ7についてはフィブロネクチン、VCAM及び/又はMAdCAM；又はアルファEベータ7インテグリンについてはE-カドヘリン）とのその結合ドメインの相互作用を防止する。別の例においては、ベータ7拮抗剤抗体はインテグリンサブユニット2量体化ドメイン又はリガンド結合ドメイン内にはないが、そのベータ7拮抗剤抗体結合によりベータ7ドメインがその結合相手（例えばアルファ4又はアルファEインテグリンサブユニット及び/又はリガンド、例えばフィブロネクチン、VCAM、MAdCAM又はE-カドヘリン）と相互作用する能力が妨害されるような配列に結合してよい。1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体は、アルファ4又はアルファEサブユニットとのベータ7の2量体化が妨害されるようにベータ7（例えば細胞外ドメイン）に結合する。1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体はベータ7及び/又はアルファ4ベータ7及び/又はアルファEベータ7インテグリンがそれぞれのリガンドに結合する能力が妨害されるようにベータ7に結合する。例えば、1つの実施形態において、本発明はベータ7分子への結合によりその分子の2量体化を阻害する拮抗剤抗体を提供する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はベータ7のリガンド結合ドメイン中の配列に特異的に結合する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はアルファ4ベータ7インテグリンへのリガンドの結合（即ちフィブロネクチン、VCAM及び/又はMAdCAM）が妨害されるようにベータ7のリガンド結合ドメイン中の配列に特異的に結合する。1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はアルファEベータ7インテグリンへのリガンドの結合（即ちE-カドヘリン）が妨害されるようにベータ7のリガンド結合ドメイン中の配列に特異的に結合する。

## 【0055】

1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体はヘテロ2量体化を含むベータ7の2量体化（即ちアルファ4又はアルファEインテグリンサブユニット分子とのベータ7の2量体化）を妨害する。

## 【0056】

一部の場合において、インテグリンの一部としてのベータ7サブユニット、又は、2量体としてのアルファ4ベータ7インテグリン又はアルファEベータ7インテグリンへのリガンド（例えばフィブロネクチン、VCAM、MAdCAM又はアルファE）の結合に干渉しないベータ7拮抗剤抗体を有することが好都合である。従って、1つの実施形態において、ベータ7上のフィブロネクチン、VCAM、MAdCAM又はE-カドヘリン結合部位には結合しないが、代わりに生物学的に活性なインテグリンが形成されないようにベータ7サブユニットとアルファサブユニット（例えばアルファ4又はアルファEインテグリンサブユニット）の間の相互作用を阻害するような抗体を提供する。1つの例においては、本発明の拮抗剤抗体は他の拮抗剤抗体1つ以上とともに使用することができ、その場合、拮抗剤はベータ7インテグリン軸内の異なる過程及び/又は機能にターゲティングされる。即ち、1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体は別のベータ7又はアルファ/ベータインテグリン拮抗剤（例えばアルファ4ベータ7抗体）、例えばモノクローナル抗体、又は、ヒト化抗体、又は、マウス抗体から誘導されるか、又は誘導された

10

20

30

40

50

抗体と同じか、作用上同じの結合特性又は特異性を有するモノクローナル抗体のような抗体により結合されるエピトープとは異なるベータ7上のエピトープに結合する。

【0057】

1つの実施形態において、本発明はそれぞれのインテグリンへのベータ7 - アルファ4又は - アルファEの多量体化並びにリガンド結合を妨害するベータ7拮抗剤抗体を提供する。例えば、アルファ4又はアルファEインテグリンサブユニットとのベータ7の2量体化を阻害する本発明の拮抗剤抗体は、更に、ベータ7又はインテグリン2量体への結合に関してリガンドと競合する能力を有してよい(例えばそれはフィブロネクチン、VCAM及び/又はMAdCAMのベータ7及び/又はアルファ4ベータ7への結合に干渉するか;又は、ベータ7又はアルファEベータ7へのE - カドヘリンの結合に干渉してよい)。

10

【0058】

本発明のベータ7拮抗剤抗体の1つの実施形態において、ベータ7への拮抗剤の結合はリガンド結合活性化細胞接着を阻害する。本発明のベータ7拮抗剤抗体の別の実施形態において、細胞内のベータ7への拮抗剤の結合は、ベータ7含有インテグリンが発現される細胞及び/又は組織への細胞のリクルートメントを阻害する。

【0059】

1つの実施形態において、本発明のベータ7拮抗剤抗体はベータ7の細胞外ドメインのアミノ酸176 ~ 250(場合によりアミノ酸176 ~ 237)の少なくとも一部(Tidswell, M.ら、(1997)J. Immunol. 159: 1497 - 1505)又はその変異体に特異的に結合し、そしてリガンドMAdCAM、VCAM - 1、フィ  
 20  
 プロネクチン及び/又はE - カドヘリンの結合を低減又はブロックする。1つの実施形態において、このようなりガンド結合ブロッキングは、ベータ7含有リガンドを発現する細胞へのリガンドを発現する細胞の付着を妨害、低減及び/又は防止する。1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体は残基176 ~ 237を含むベータ7のアミノ酸配列に特異的に結合する。1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体はベータ7の残基176 ~ 237からなる群より選択される配列の少なくとも1つの一部又は全てにより形成されるコンホーメーションエピトープに特異的に結合する。1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗体はヒトベータ7の残基176 ~ 237の配列又は残基176 ~ 250のアミノ酸配列と少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、  
 30  
 少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性又は類似性を有するアミノ酸配列に特異的に結合する。1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗ベータ7抗体はハイブリドーマATCC HB - 293により生産される抗ベータ7抗体Fib504と同様のエピトープに結合する。

20

30

【0060】

1つの特徴において、本発明は本発明の拮抗剤抗体1つ以上及び担体を含む組成物を提供する。1つの実施形態において、担体は製薬上許容しうるものである。

【0061】

1つの特徴において、本発明は本発明のベータ7拮抗剤抗体をコードする核酸を提供する。

【0062】

1つの特徴において、本発明は本発明の核酸を含むベクターを提供する。

40

【0063】

1つの特徴において、本発明は本発明の核酸又はベクターを含む宿主細胞を提供する。ベクターは何れかの型、例えば、組み換えベクター、例えば発現ベクターであることができる。種々の宿主細胞の何れかを使用できる。1つの実施形態において、宿主細胞は原核生物の細胞、例えばE. coliである。1つの実施形態において宿主細胞は真核生物の細胞、例えば哺乳類細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。

【0064】

1つの特徴において、本発明は本発明の拮抗剤を製造するための方法を提供する。例えば本発明はベータ7拮抗剤抗体(これは本明細書においては完全長及びそのフラグメント

50

を包含する)の製造方法を提供し、その方法はその抗体(又はそのフラグメント)をコードする本発明の組み換えベクターを適当な宿主細胞内で発現させること、及び、その抗体を回収することを含む。

【0065】

1つの特徴において、本発明は容器；及び容器内に含有された組成物を含む製造物品を提供し、ここで組成物は本発明のベータ7拮抗剤抗体1つ以上を含む。1つの実施形態において、組成物は本発明の核酸を含む。1つの実施形態において、拮抗剤抗体を含む組成物は更に、担体を含み、これは一部の実施形態においては製薬上許容しうるものである。1つの実施形態において、本発明の製造物品は更に被験体に組成物(例えば拮抗剤抗体)を投与するための説明書を含む。

10

【0066】

1つの特徴において、本発明は本発明のベータ7拮抗剤抗体1つ以上を含む組成物を含む第1の容器；及び緩衝液を含む第2の容器を含むキットを提供する。1つの実施形態において、緩衝液は製薬上許容しうるものである。1つの実施形態において、拮抗剤抗体を含む組成物は更に担体を含み、これは一部の実施形態においては製薬上許容しうるものである。1つの実施形態において、キットは更に被験体に組成物(例えば拮抗剤抗体)を投与するための説明書を含む。

【0067】

ベータ7インテグリン及びそのリガンドは疾患状態において多様に発現される。[腸上皮上のMAdCAM-1の発現は炎症性腸疾患(UC及びCD)を有する患者の粘膜炎症の部位において増大し、そしてUC及びCD患者の結腸固有層もまたIBS対照と比較して増大したCD3+及びa4b7+細胞を示している(Souza H., ら、Gut 45:856(1999)参照)。MAdCAM-1発現は肝臓疾患の門脈炎症に伴って観察されており、そして炎症中の肝臓へのアルファ4ベータ7+リンパ球のリクルートメントにおいて重要である。(Hillan, K. ら、Liver. 19(6):509-18(1999))。肝臓の血管上のMAdCAM-1はIBD及び原発性硬化性胆管炎を有する患者に由来するa4b7+リンパ球の接着を裏付けている。接着は抗MAdCAM-1、抗アルファ4ベータ7又は抗アルファ4抗体により阻害されている(Grant A.J. ら、Hepatology. 33(5):1065-72(2001))。MAdCAM-1、VCAM及びE-カドヘリンは脳内皮細胞上及び/又は延焼した中枢神経系の微細血管上に発現される。ベータ7インテグリンはCNSの脱髄疾患に寄与している(Kanwar ら、J. Neuroimmunology 103, 146(2000))。アルファ4ベータ7の発現は対照群及びUC患者よりもCDのLPLにおいて有意に高値であった(Oshitani, N. ら、International Journal of Molecule Medicine 12, 715-719(2003))。CD患者由来のIELを慢性的に刺激し、そして末梢よりリクルートした(Meresse, B., ら、Human Immunology, 62, 694-700(2001))。ヒト肝臓病においては、アルファEベータ7T細胞(CD4+及びCD8+)は、肝細胞及び胆管上皮上にE-カドヘリンが発現しているヒト肝臓内に優先的に蓄積する(Shimizu, Y., ら、Journal of Hepatology 39, 918-924(2003))。慢性膵臓炎においては、CD8+CD103+T細胞は腸上皮内リンパ球と同様、慢性膵臓炎において膵臓に浸潤している(Matthias, P., ら、Am J Gastroenterol 193:2141-2147(1998))。アルファEベータ7のアプレギュレーションは特定の上皮の関与とともに全身エリテマトーデス患者において観察されている(Pang ら、Arthritis & Rheumatism 41:1456-1463(1998))。シェーグレン症候群においては、CD8+アルファEベータ7+T細胞は腺房上皮細胞に接着し、アポトーシスを誘導することによりこれを殺傷している(Kroneid ら、Scand J Rheumatol 27:215-218, 1998)。インテグリンアルファ4ベータ7及びアルファEベータ7は皮膚炎症の間のT細胞表皮向性において役割を果たしており、皮

20

30

40

50

膚同種移植片拒絶に寄与している (Sunら、Transplantation 74, 1202, 2002)。Teraki及びShioharaは、乾癬上皮におけるCD8+ T細胞上のaEb7インテグリンの優先的発現を示している (Teraki and Shiohara, Br. J. Dermatology 147. 1118, 2002)。喀痰Tリンパ球は喘息、COPD及び正常被験体において活性化IEL (CD69+ CD103+) である (Leckieら、Thorax 58. 23, 2003)。CD103+ (aEb7+) CTLは臨床的腎臓同種移植片拒絶の間に移植片上皮とともに蓄積する (Hadleyら、Transplantation 72, 1548, 2001) ]。即ち1つの実施形態において、本発明は上記した疾患状態の1つ以上のような疾患を低減又は緩和するためにベータ7インテグリン-リガンド相互作用を阻害するための本発明のベータ7拮抗剤抗体の使用を提供する。1つの実施形態において、本発明の抗体は炎症性腸疾患 (例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎)、炎症性肝疾患、CNSの炎症、慢性膵臓炎、全身エリテマトーデス、シェーグレン症候群、乾癬及び皮膚炎症、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、間質性肺疾患、アレルギー、自己免疫疾患、移植片拒絶、腎臓移植片拒絶、対宿主性移植片病、糖尿病及びがんを包含する炎症性疾患のような疾患の治療及び/又は予防のための医薬の製造において使用される。

10

## 【0068】

1つの特徴において、本発明は、免疫 (例えば自己免疫又は炎症性) 障害、例えば炎症性腸疾患 (例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎) 及びアレルギー反応 (例えば呼吸系、皮膚、関節の障害、アレルギー性喘息、及び、ベータ7含有インテグリンにより媒介されるアレルギー反応により罹患した他の臓器) のような疾患の治療及び/又は予防のための医薬の製造における本発明の核酸の使用を提供する。

20

## 【0069】

1つの特徴において、本発明は、免疫 (例えば自己免疫又は炎症性) 障害、例えば炎症性腸疾患 (例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎) 及びアレルギー反応 (例えば呼吸系、皮膚、関節の障害、アレルギー性喘息、及び、ベータ7含有インテグリンにより媒介されるアレルギー反応により罹患した他の臓器) のような疾患の治療及び/又は予防のための医薬の製造における本発明の発現ベクターの使用を提供する。

## 【0070】

1つの特徴において、本発明は、免疫 (例えば自己免疫又は炎症性) 障害、例えば炎症性腸疾患 (例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎) 及びアレルギー反応 (例えば呼吸系、皮膚、関節の障害、アレルギー性喘息、及び、ベータ7含有インテグリンにより媒介されるアレルギー反応により罹患した他の臓器) のような疾患の治療及び/又は予防のための医薬の製造における本発明の宿主細胞の使用を提供する。

30

## 【0071】

1つの特徴において、本発明は、免疫 (例えば自己免疫又は炎症性) 障害、例えば炎症性腸疾患 (例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎) 及びアレルギー反応 (例えば呼吸系、皮膚、関節の障害、アレルギー性喘息、及び、ベータ7含有インテグリンにより媒介されるアレルギー反応により罹患した他の臓器) のような疾患の治療及び/又は予防のための医薬の製造における本発明の製造物品の使用を提供する。

40

## 【0072】

1つの特徴において、本発明は、免疫 (例えば自己免疫又は炎症性) 障害、例えば炎症性腸疾患 (例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎) 及びアレルギー反応 (例えば呼吸系、皮膚、関節の障害、アレルギー性喘息、及び、ベータ7含有インテグリンにより媒介されるアレルギー反応により罹患した他の臓器) のような疾患の治療及び/又は予防のための医薬の製造における本発明のキットの使用を提供する。

## 【0073】

本発明はベータ7インテグリン媒介細胞-細胞相互作用の過程の調節異常に関わる疾患状態を調節するために有用な方法及び組成物を提供する。ベータ7インテグリンは複数の生物学的及び生理学的な機能、例えば炎症性障害及びアレルギー性反応に関与している。

50

即ち、1つの特徴において、本発明は本発明の抗体を被験体に投与することを含む方法を提供する。

【0074】

1つの特徴においては、本発明はベータ7インテグリン媒介炎症を阻害する方法を提供し、その方法は、本発明の抗体の有効量に細胞又は組織を接触させることによりリンパ球又はB細胞及びベータ7インテグリン発現細胞への結合を阻害することを含む。

【0075】

1つの特徴において、本発明は被験体におけるベータ7インテグリン結合の調節異常に関わる病理学的状態を治療する方法を提供し、その方法は本発明の抗体の有効量を被験体に投与することにより、その状態を治療することを含む。

10

【0076】

1つの特徴において、本発明はベータ7インテグリン（例えばアルファ4ベータ7又はアルファEベータ7インテグリン）を発現する細胞へのベータ7インテグリンリガンドを発現するリンパ球（例えばMAdCAM、VCAM、E-カドヘリン又はフィブロネクチンを発現する細胞）の結合を阻害する方法を提供し、方法は、本発明の抗体をその細胞に接触させることにより細胞の接着を阻害又は防止し、そして炎症反応の低減を誘発することを含む。

【0077】

1つの特徴において、本発明は、ベータ7インテグリンの増大した発現又は活性、又は、ある細胞上のベータ7インテグリンと別の細胞上のベータ7インテグリン受容体との間の増大した相互作用に関わる炎症性障害を治療又は予防するための方法を提供し、その方法は本発明の抗体の有効量をそのような治療に必要な被験体に投与することによりその炎症性障害を効果的に治療又は予防することを含む。1つの実施形態において、その炎症性障害は炎症性腸疾患（IBD）である。別の実施形態においては、その炎症性障害はアレルギー性反応である。

20

【0078】

本発明の方法は何れかの適当な病理学的状況、例えばベータ7インテグリン結合経路の調節異常に関わる細胞及び/又は組織に影響するように使用することができる。ベータ7インテグリンは主に白血球上に発現される（Tidseil, M.ら、(1997)上出）。1つの実施形態において、白血球は本発明の方法においてターゲティングされ、そしてベータ7インテグリンのリガンドを発現する細胞への結合を防止される。例えば、E-カドヘリンを発現する上皮内リンパ球は本発明によれば拮抗剤抗ベータ7抗体によりアルファEベータ7インテグリン発現細胞への結合を防止される。MAdCAM、VCAM-1又はフィブロネクチンを発現する細胞は本発明の拮抗剤抗ベータ7抗体によりアルファ4ベータ7を発現する白血球への結合を防止される。

30

【0079】

本発明の方法は更に別の治療工程を含むことができる。例えば、1つの実施形態において、方法は更に、ターゲティングされた細胞及び/又は組織（例えば腸内壁の内皮細胞）が抗TNF抗体、又は限定しないが例えば5-ASA化合物のような小型分子の治療薬に曝露される工程を含む。

40

本明細書に記載する通り、ベータ7インテグリンは重要な生物学的過程を媒介し、その調節異常は多くの病理学的状態をもたらす。従って、本発明の方法の1つの実施形態において、ターゲティングされる細胞（例えば内皮細胞）は、ベータ7インテグリンのベータ7インテグリンリガンドを発現する細胞（ここで細胞は例えばリンパ球であってよく、そしてリガンドはMAdCAM、VCAM又はE-カドヘリンであってよい）の接着が、本発明の抗ベータ7拮抗剤抗体の非存在下の細胞と比較して、妨害、阻害又は防止されているものである。1つの実施形態において、本発明の方法はリンパ球のホーミングを阻害することにより、ベータ7インテグリン発現部位における炎症を阻害する。例えば、本発明の拮抗剤との接触により、細胞は、ベータ7インテグリンのリガンドを発現する細胞に接着することができなくなる。

50

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

抗ペプタ7結合ポリペプチド又は抗体であって、該ポリペプチド又は抗体は、

(a)下記：

(i)配列A1 - A11を含むHVR - L1、ここでA1 - A11はRASESVDTY  
LH(配列番号1)であるもの、

(ii)配列B1 - B8を含むHVR - L2、ここでB1 - B8はKYASQSI S(配  
列番号2)であるもの、

(iii)配列C1 - C10を含むHVR - L3、ここでC1 - C10はQQGNSLL  
PNT(配列番号3)であるもの、

(iv)配列D1 - D10を含むHVR - H1、ここでD1 - D10はGFFITNNY  
WG(配列番号4)であるもの、

(v)配列E1 - E17を含むHVR - H2、ここでE1 - E17はGYISYSGST  
SYNPSLKS(配列番号5)であるもの；および、

(vi)配列F1 - F11を含むHVR - H3、ここでF1 - F11はMTGSSSGYF  
DF(配列番号6)であるもの、

からなる群より選択される少なくとも1つのHVR配列；

を含む、抗ペプタ7結合ポリペプチド又は抗体。

(項目2)

少なくとも1つの変異体HVRを含む項目1記載のポリペプチド又は抗体であって、該変  
異体HVRが配列番号1、2、3、4、5又は6に示す何れかの配列において、少なくと  
も1つの残基の修飾を含む、ポリペプチド又は抗体。

(項目3)

変異体HVR - L1内のA8がS、D又はTであり、かつA9がLである項目2記載のポ  
リペプチド又は抗体。

(項目4)

HVR - L1が配列番号1又は7又は8又は9を含み、HVR - L2が配列番号2又は6  
7又は68を含み、HVR - L3が配列番号3を含み、HVR - H1が配列番号4を含み  
、HVR - H2が配列番号5を含み、HVR - H3が相対的な位置F2 - F11に対して  
配列番号6又は66を含むか、相対的な位置F1 - F11に対して配列番号63又は64  
又は65を含む項目2記載のポリペプチド又は抗体。

(項目5)

前記ポリペプチド又は抗体がHVR - L1、HVR - L2、HVR - L3、HVR - H1  
、HVR - H2及びHVR - H3からなる群より選択される1、2、3、4、5又は6つ  
の超可変領域(HVR)を含み、ここで：

(i)HVR - L1はアミノ酸配列A1 - A11を含み、ここでA1 - A11はRASE  
SVDTYLH(配列番号1)；RASESVDSL LH(配列番号7)、RASESV  
DTLLH(配列番号8)、又はRASESVDDL LH(配列番号9)又は配列番号1  
、7、8又は9の変異体であり、ここで、アミノ酸A2はA、G、S、T及びVからなる  
群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸A3はS、G、I、K、N、P、Q、R及び  
Tからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸A4はE、V、Q、A、D、G、  
H、I、K、L、N及びRからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸A5はS  
、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T及びVからなる群より選択され、ならび  
に/又は、アミノ酸A6はV、R、I、A、G、K、L、M及びQからなる群より選択さ  
れ、ならびに/又は、アミノ酸A7はD、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P  
、S及びTからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸A8はD、G、N、E、  
T、P及びSからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸A9はL、Y、I及び  
Mからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸A10はL、A、I、M及びVか  
らなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸A11はH、Y、F及びSからなる群  
より選択され；

10

20

30

40

50

( i i ) H V R - L 2 はアミノ酸配列 B 1 - B 8 を含み、ここで B 1 - B 8 は K Y A S Q S I S ( 配列番号 2 )、R Y A S Q S I S ( 配列番号 6 7 ) 又は X Y A S Q S I S ( 配列番号 6 8、ここで X は何れかのアミノ酸を示す ) 又は配列番号 2、6 7 又は 6 8 の変異体であり、ここでアミノ酸 B 1 は K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y 及び X からなる群より選択され ( ここで X は何れかのアミノ酸を示す )、ならびに / 又は、アミノ酸 B 4 は S 及び D からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 B 5 は Q 及び S からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 B 6 は S、D、L 及び R からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 B 7 は I、V、E 及び K からなる群より選択され ;

( i i i ) H V R - L 3 はアミノ酸配列 C 1 - C 9 を含み、ここで C 1 - C 9 は Q Q G N S L P N T ( 配列番号 3 ) 又は配列番号 3 の変異体であり、ここでアミノ酸 C 8 は N、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、M 及び Y からなる群より選択され ;

( i v ) H V R - H 1 はアミノ酸配列 D 1 - D 1 0 を含み、ここで D 1 - D 1 0 は G F F I T N N Y W G ( 配列番号 4 ) であり、

( v ) H V R - H 2 はアミノ酸配列 E 1 - E 1 7 を含み、ここで E 1 - E 1 7 は G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S ( 配列番号 5 ) 又は配列番号 5 の変異体であり、ここでアミノ酸 E 2 は Y、F、V 及び D からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 E 6 は S 及び G からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 E 1 0 は S 及び Y からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 E 1 2 は N、T、A 及び D からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 E 1 3 は P、H、D 及び A からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 E 1 5 は L 及び V からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 E 1 7 は S 及び G からなる群より選択され ; そして、

( v i ) H V R - H 3 はアミノ酸配列 F 2 - F 1 1 を含み、ここで F 2 - F 1 1 は M T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 ) 又は R T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 6 ) であるか ; 又はアミノ酸配列 F 1 - F 1 1 を含み、ここで F 1 - F 1 1 は A M T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 3 )、A R T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 4 ) 又は A Q T G S S G Y F D F ( 配列番号 6 5 ) 又は配列番号 6、6 3、6 4、6 5 又は 6 6 の変異体であり、ここでアミノ酸 F 2 は R、M、A、E、G、Q、S であり、ならびに / 又は、アミノ酸 F 1 1 は F 及び Y からなる群より選択される、

項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 6 )

前記抗体がヒト化されている項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 7 )

前記フレームワーク配列の少なくとも一部がヒトコンセンサスフレームワーク配列である項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 8 )

前記修飾が置換、挿入又は欠失である項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 9 )

H V R - L 1 変異体が以下の位置 : A 2 ( A、G、S、T 又は V ) ;

A 3 ( S、G、I、K、N、P、Q、R 又は T ) ; A 4 ( E、A、D、G、H、I、K、L、N、Q、R 又は V ) ; A 5 ( S、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、V 又は Y ) ; A 6 ( V、A、G、I、K、L、M、Q 又は R ) ; A 7 ( D、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、T 又は V ) ; A 8 ( S、D、E、G、P、T 又は N ) ; A 9 ( L、Y、I 又は M ) ; A 1 0 ( L、A、I、M 又は V ) 及び A 1 1 ( H、F、S 又は Y ) の何れかの組み合わせにおいて 1 ~ 1 0 ( 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 1 0 ) 置換を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 0 )

H V R - L 2 変異体が以下の位置 : B 1 ( K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y、T、H、S、E、C、D、G 又は M )、B 5 ( Q 又は S )、B 6 ( S、R 又は L ) 及び B 7 ( I、T、E、K 又は V ) の何れかの組み合わせにおいて 1 ~ 4 ( 1、2、3 又

10

20

30

40

50



は 4 ) 置換を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 1 )

H V R - L 3 変異体が位置 C 8 ( W、Y、R、S、A、F、H、I、L、M、N、T 又は V ) において少なくとも 1 つの置換を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 2 )

H V R - H 2 変異体が以下の位置 : E 2 ( Y、V、D 又は F )、E 6 ( S 又は G )、E 1 0 ( S 又は Y )、E 1 2 ( N、A、D 又は T )、E 1 3 ( P、D、A 又は H )、E 1 5 ( L 又は V )、E 1 7 ( S 又は G ) の何れかの組み合わせにおいて 1 ~ 7 ( 1、2、3、4、5、6 又は 7 ) 置換を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 3 )

H V R - H 3 変異体が以下の位置 : F 2 ( R、M、A、E、G、Q、R 又は S ) 及び F 1 1 ( F 又は Y ) の何れかの組み合わせにおいて 1 又は 2 置換を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 4 )

配列番号 7 の配列を有する H V R - L 1 を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 5 )

配列番号 8 の配列を有する H V R - L 1 を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 6 )

配列番号 9 の配列を有する H V R - L 1 を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 7 )

フレームワーク位置に少なくとも 1 つの修飾をさらに含み、該少なくとも 1 つの修飾が重鎖位 7 1 又は 7 3 又は 7 8 にある、項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 8 )

7 1 位のアミノ酸が R 又は A であり、そして 7 3 位のアミノ酸が N 又は T であり、そして 7 8 位のアミノ酸が F 又は A 又は L である項目 1 7 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 1 9 )

7 1、7 3 及び / 又は 7 8 位に置換を含む重鎖ヒトサブグループ I I I 重鎖コンセンサスフレームワーク配列を含む項目 1 7 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 2 0 )

前記置換が R 7 1 A、N 7 3 T、L 7 8 A 又は L 7 8 F である項目 1 9 記載の抗体。

( 項目 2 1 )

配列番号 3 の配列を有する H V R - L 3 を含む項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 2 2 )

変異体 H V R - L 1 における A 8 が S である項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 2 3 )

変異体 H V R - L 1 における A 8 が D である項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 2 4 )

変異体 H V R - L 1 における A 9 が L である項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 2 5 )

配列 H V R - H 2 の位置 E 1 - E 1 及び配列 H V R - H 3 の位置 F 1 - F 1 1 の間のフレームワーク配列が H F R 3 - 1 - H F R 3 - 3 1 であり、そして H F R 3 - 6 が A 又は R であり、H F R 3 - 8 が N 又は T であり、そして H F R 3 - 1 3 が L 又は A 又は F である、項目 2 記載のポリペプチド又は抗体。

( 項目 2 6 )

ヒト化抗ベータ 7 抗体又はそのベータ 7 結合フラグメントであって、ここで該抗体又は結合フラグメントのヒトベータ 7 に対する 1 価の親和性が、図 1 A ( 配列番号 1 0 ) 及び / 又は図 1 B ( 配列番号 1 1 ) あるいは図 9 A ( 配列番号 1 2 ) 及び / 又は図 9 B ( 配列番号 1 3 ) に示す軽鎖及び重鎖の可変配列を含む抗体の 1 価の親和性と実質的に同じか、またはそれより大きい、抗体又はその結合フラグメント。

( 項目 2 7 )

10

20

30

40

50

前記親和性が図 1 A (配列番号 1 0) 及び図 1 B (配列番号 1 1) 又は図 9 A (配列番号 1 2) 及び図 9 B (配列番号 1 3) に示す軽鎖及び重鎖の配列を含む抗体よりも、少なくとも 2 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 1 0 0 倍、少なくとも 5 0 0 倍、少なくとも 1 0 0 0 倍、少なくとも 5 0 0 0 倍、少なくとも 1 0 0 0 0 倍高い、項目 2 6 記載の抗体又はその結合フラグメント。

(項目 2 8)

ヒトペータ 7 に対する前記抗体の 1 価の親和性が、図 1 A (配列番号 1 0) 及び図 1 B (配列番号 1 1) 又は図 9 A (配列番号 1 2) 及び図 9 B (配列番号 1 3) に示す軽鎖及び重鎖の配列を含む抗体の 1 価の親和性より少なくとも 3 倍高い、項目 2 7 記載の抗体又は結合フラグメント。

(項目 2 9)

図 1 A (配列番号 1 0) 及び図 1 B (配列番号 1 1) 又は図 9 A (配列番号 1 2) 及び図 9 B (配列番号 1 3) に示す軽鎖及び重鎖の配列を含む抗体が、HB - 2 9 3 の標記を有する American Type Culture Collection Accession Number ATCC 下に寄託されているハイブリドーマ細胞株により生産される項目 2 6 又は 2 7 記載の抗体又はそのフラグメント。

(項目 3 0)

前記結合親和性が K d 値で表示される項目 2 6 記載の抗体又は結合フラグメント。

(項目 3 1)

前記結合親和性が Biacore<sup>TM</sup> 又はラジオイムノアッセイにより測定される項目 2 6 記載の抗体又は結合フラグメント。

(項目 3 2)

ヒトサブグループ I 軽鎖コンセンサスフレームワーク配列を含む項目 1 記載のポリペプチド又は抗体。

(項目 3 3)

重鎖ヒトサブグループ I I I 重鎖コンセンサスフレームワーク配列を含む項目 1 記載のポリペプチド又は抗体。

(項目 3 4)

前記ポリペプチド又は抗体が HVR - L 1、HVR - L 2、HVR - L 3、HVR - H 1、HVR - H 2 及び HVR - H 3 からなる群より選択される 1、2、3、4、5 又は 6 つの超可変領域 (HVR) を含み、ここで：

(i) HVR - L 1 はアミノ酸配列 A 1 - A 1 1 を含み、ここで A 1 - A 1 1 は R A S E S V D T Y L H (配列番号 1) ; R A S E S V D S L L H (配列番号 7)、R A S E S V D T L L H (配列番号 8)、又は R A S E S V D D L L H (配列番号 9) 又は配列番号 1、7、8 又は 9 の変異体であり、ここで、アミノ酸 A 2 は A、G、S、T 及び V からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 3 は S、G、I、K、N、P、Q、R 及び T からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 4 は E、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N 及び R からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 5 は S、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T 及び V からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 6 は V、R、I、A、G、K、L、M 及び Q からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 7 は D、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S 及び T からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 8 は D、G、N、E、T、P 及び S からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 9 は L、Y、I 及び M からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 1 0 は L、A、I、M 及び V からなる群より選択され、ならびに / 又は、アミノ酸 A 1 1 は H、Y、F 及び S からなる群より選択され；

(ii) HVR - L 2 はアミノ酸配列 B 1 - B 8 を含み、ここで B 1 - B 8 は K Y A S Q S I S (配列番号 2)、R Y A S Q S I S (配列番号 6 7) 又は X Y A S Q S I S (配列番号 6 8、ここで X は何れかのアミノ酸を示す) 又は配列番号 2、6 7 又は 6 8 の変異体であり、ここでアミノ酸 B 1 は K、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y 及び X

10

20

30

40

50

からなる群より選択され(ここでXは何れかのアミノ酸を示す)、ならびに/又は、アミノ酸B4はS及びDからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸B5はQ及びSからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸B6はS、D、L及びRからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸B7はI、V、E及びKからなる群より選択され;

(iii) HVR-L3はアミノ酸配列C1-C9を含み、ここでC1-C9はQQGN SLPNT(配列番号3)又は配列番号3の変異体であり、ここでアミノ酸C8はN、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、M及びYからなる群より選択され;

(iv) HVR-H1はアミノ酸配列D1-D10を含み、ここでD1-D10はGFFITNNYWG(配列番号4)であり、

(v) HVR-H2はアミノ酸配列E1-E17を含み、ここでE1-E17はGYISYSGSTSYNPSLK(配列番号5)又は配列番号5の変異体であり、ここでアミノ酸E2はY、F、V及びDからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸E6はS及びGからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸E10はS及びYからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸E12はN、T、A及びDからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸E13はP、H、D及びAからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸E15はL及びVからなる群より選択され、ならびに/又は、アミノ酸E17はS及びGからなる群より選択され;そして、

(vi) HVR-H3はアミノ酸配列F2-F11を含み、ここでF2-F11はMTGSSSGYFDF(配列番号6)又はRTGSSSGYFDF(配列番号66)であるか;又はアミノ酸配列F1-F11を含み、ここでF1-F11はAMTGS SSGYFDF(配列番号63)、ARTGS SSGYFDF(配列番号64)又はAQTGS SSGYFDF(配列番号65)又は配列番号6、63、64、65又は66の変異体であり、ここでアミノ酸F2はR、M、A、E、G、Q、Sであり、ならびに/又は、アミノ酸F11はF及びYからなる群より選択される、

項目26記載の抗体又は結合フラグメント。

(項目35)

重鎖フレームワーク71位がアミノ酸R又はAを含み、及び/あるいは重鎖フレームワーク73位がアミノ酸T又はNを含み、及び/あるいは重鎖フレームワーク78位がアミノ酸F又はA又はLを含み、配列が重鎖フレームワーク71位に含む、項目34記載の抗体又は結合フラグメント。

(項目36)

ヒトベータ7インテグリンサブユニットと第2のインテグリンサブユニット及び/又はリガンドとの相互作用を、該ベータ7インテグリンに項目2の抗体を接触させることにより阻害する方法。

(項目37)

前記第2のインテグリンサブユニットがアルファ4インテグリンサブユニットであり、かつ前記リガンドがMAdCAM、VCAM又はフィブロネクチンである項目36記載の方法。

(項目38)

前記アルファ4インテグリンサブユニットがヒト由来である項目37記載の方法。

(項目39)

前記リガンドがヒト由来である項目38記載の方法。

(項目40)

前記第2のインテグリンサブユニットがアルファEインテグリンサブユニットであり、かつ前記リガンドがE-カドヘリンである項目36記載の方法。

(項目41)

前記アルファEインテグリンサブユニットがヒト由来である項目40記載の方法。

(項目42)

前記リガンドがヒト由来である項目41記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目43)

前記障害により、炎症、喘息、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性結腸炎、糖尿病、臓器移植に起因する炎症、対宿主性移植片病、及び、同種移植片障害に関連する炎症からなる群より選択される障害の症状が低減又は緩和される項目36記載の方法。

(項目44)

項目2のポリペプチド又は抗体及び製薬用担体を含む組成物の有効量を哺乳類に投与することによって、障害を経験している哺乳類におけるベータ7インテグリン媒介細胞接着及び/又はリクルートメントを調節する方法。

(項目45)

前記障害が炎症、喘息、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性結腸炎、糖尿病、臓器移植に起因する炎症、対宿主性移植片病、及び、同種移植片障害に関連する炎症からなる群より選択される項目44記載の方法。

10

(項目46)

前記哺乳類がヒトである項目44記載の方法。

(項目47)

第2の生物薬剤又は化学療法剤を投与する工程を更に包含する、項目44記載の方法。

(項目48)

前記調節により、アルファ4インテグリン、アルファEインテグリン、MAdCam、VCAM、E-カドヘリン及び/又はフィブロネクチンとのベータ7インテグリンの相互作用が阻害される項目44記載の方法。

20

(項目49)

項目1、2、5、26又は34のいずれかに記載の抗ベータ7結合ポリペプチド、抗体又はその結合フラグメント及び製薬用担体を含む組成物。

(項目50)

項目1、2、5、26又は34のいずれかに記載の抗ベータ7結合ポリペプチド、抗体又はその結合フラグメントを含む組成物と、製薬用担体と、該組成物が障害を治療する方法における使用のためのものであることを示すラベルを含む製造物品であって、ここで該障害が炎症、喘息、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性結腸炎、糖尿病、臓器移植に起因する炎症、対宿主性移植片病、及び、同種移植片障害に関連する炎症からなる群より選択される、製造物品。

30

**【図面の簡単な説明】****【0080】**

**【図1A】**図1A及び1Bは以下の可変軽鎖及び重鎖の配列：軽鎖ヒトサブグループカップIコンセンサス配列(図1A、配列番号23)、重鎖ヒトIIIコンセンサス配列(図1B、配列番号24)、ラット抗マウスベータ7抗体(Fib504)可変軽鎖(図1A、配列番号10)、ラット抗マウスベータ7抗体(Fib504)可変重鎖(図1B、配列番号11)、及び、ヒト化抗体変異体：ヒト化hu504Kグラフト可変軽鎖(図1A、配列番号25)、ヒト化hu504Kグラフト可変重鎖(図1B、配列番号26)、変異体hu504.5(ヒト化hu504Kグラフトからのアミノ酸変異は変異体hu504.5、hu504.16及びhu504.32について図1A(軽鎖)及び図1B(重鎖)に示す通り)のアライメントを示す。

40

**【図1B】**図1A及び1Bは以下の可変軽鎖及び重鎖の配列：軽鎖ヒトサブグループカップIコンセンサス配列(図1A、配列番号23)、重鎖ヒトIIIコンセンサス配列(図1B、配列番号24)、ラット抗マウスベータ7抗体(Fib504)可変軽鎖(図1A、配列番号10)、ラット抗マウスベータ7抗体(Fib504)可変重鎖(図1B、配列番号11)、及び、ヒト化抗体変異体：ヒト化hu504Kグラフト可変軽鎖(図1A、配列番号25)、ヒト化hu504Kグラフト可変重鎖(図1B、配列番号26)、変異体hu504.5(ヒト化hu504Kグラフトからのアミノ酸変異は変異体hu504.5、hu504.16及びhu504.32について図1A(軽鎖)及び図1B(重鎖)に示す通り)のアライメントを示す。

50

【図 1 C】ベータ 7 結合抗体をもたらす h u 5 0 4 K グラフトの H V R - H 1 及び H V R - H 2 における別のアミノ酸置換は図 1 C に示す。

【図 2】図 2 A 及び 2 B はヒトコンセンサスサブグループ I I I 配列の軽鎖 (図 2 A、配列番号 2 7) 及び重鎖 (図 2 B、配列番号 2 8) の完全長配列を示す。H V R は下線部である。

【図 3】図 3 A 及び 3 B はラット F i b 5 0 4 超可変領域 (明細書記載) をヒトカップ I コンセンサス配列軽鎖内 (図 3 A、配列番号 2 9) 及びヒトサブグループ I I I コンセンサス配列重鎖内 (図 3 B、配列番号 3 0) にグラフトしたヒト化抗体 5 0 4 グラフトの完全長配列を示す。H V R は下線部である。

【図 4】図 4 A 及び 4 B は h u 5 0 4 K グラフトの軽鎖の 4 9 位が Y 4 9 K 置換となっているヒト化 5 0 4 K グラフトの完全長配列を示す。h u 5 0 4 K グラフト軽鎖は配列番号 3 1 により示され、h u 5 0 4 K グラフト重鎖は配列番号 3 0 により示される。H V R は下線部である。

【図 5】図 5 A 及び 5 B は h u 5 0 4 グラフトの重鎖の 7 1 及び 7 8 位が h u 5 0 4 グラフト配列から A 7 1 R 置換及び A 7 8 F 置換となっている h u 5 0 4 K - R F グラフトの完全長配列を示す。h u 5 0 4 K - R F グラフト軽鎖は配列番号 3 1 により示され、h u 5 0 4 K - R F グラフト重鎖は配列番号 3 2 により示される。H V R は下線部である。

【図 6】図 6 A 及び 6 B は h u 5 0 4 K - R F グラフトの重鎖 (配列番号 3 2) 及び h u 5 0 4 K グラフトの軽鎖における T 3 1 D 及び Y 3 2 L 置換 (配列番号 3 3) を含む h u 5 0 4 . 3 2 変異体の完全長配列を示す。H V R は下線部である。

【図 7】図 7 A - 図 7 B は以下の配列識別子を用いた本発明の実施における使用のための例示されるアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す。可変軽鎖 (V L) コンセンサスフレームワーク (図 7 A、B) ヒト V L カップサブグループ I コンセンサスフレームワーク (配列番号 1 4) ヒト V L カップサブグループ I コンセンサスフレームワークマイナス伸長 H V R - L 2 (配列番号 1 5) ヒト V L カップサブグループ I I コンセンサスフレームワーク (配列番号 1 6) ヒト V L カップサブグループ I I I コンセンサスフレームワーク (配列番号 1 7) ヒト V L カップサブグループ I V コンセンサスフレームワーク (配列番号 1 8) 斜線部は軽鎖 H V R を示す (L 1、L 2 及び L 3 で表示)。

【図 8 A】図 8 A - 図 8 B は以下の配列識別子を用いた本発明の実施における使用のための例示されるアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す。可変重鎖 (V H) コンセンサスフレームワーク (図 8 A、B) ヒト V H サブグループ I コンセンサスフレームワークマイナス K a b a t C D R (配列番号 1 9) ヒト V H サブグループ I コンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号 2 0 - 2 2) ヒト V H サブグループ I I コンセンサスフレームワークマイナス K a b a t C D R (配列番号 4 8) ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号 4 9 - 5 1) ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワークマイナス K a b a t C D R (配列番号 5 2) ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号 5 3 - 5 5) ヒト V H アクセプターフレームワークマイナス K a b a t C D R (配列番号 5 6) ヒト V H アクセプターフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号 5 7 - 5 8) ヒト V H アクセプター 2 フレームワークマイナス K a b a t C D R (配列番号 5 9) ヒト V H アクセプター 2 フレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号 6 0 - 6 2)

【図 8 B】図 8 A - 図 8 B は以下の配列識別子を用いた本発明の実施における使用のための例示されるアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す。可変重鎖 (V H) コンセンサスフレームワーク (図 8 A、B) ヒト V H サブグループ I コンセンサスフレームワークマイナス K a b a t C D R (配列番号 1 9) ヒト V H サブグループ I コンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号 2 0 - 2 2) ヒト V H サブグループ I I コンセンサスフレームワークマイナス K a b a t C D R (配列番号 4 8) ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号 4 9 - 5 1) ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワークマイナス K a b a t

10

20

30

40

50

C D R ( 配列番号 5 2 ) ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 ( 配列番号 5 3 - 5 5 ) ヒト V H アクセプターフレームワークマイナス K a b a t C D R ( 配列番号 5 6 ) ヒト V H アクセプターフレームワークマイナス伸長超可変領域 ( 配列番号 5 7 - 5 8 ) ヒト V H アクセプター 2 フレームワークマイナス K a b a t C D R ( 配列番号 5 9 ) ヒト V H アクセプター 2 フレームワークマイナス伸長超可変領域 ( 配列番号 6 0 - 6 2 )

【図 9】図 9 A 及び 9 B はハイブリドーマ A T C C H B - 2 9 3 により生産されるラット抗マウスインテグリンベータ 7 F i b 5 0 4 抗体の可変鎖のアミノ酸配列を示す。H V R は下線部である。可変軽鎖は図 9 A ( 配列番号 1 2 ) に示し、そして可変重鎖は図 9 B ( 配列番号 1 3 ) に示す。

【図 1 0】図 1 0 A は種々のコンセンサス配列 ( h u サブグループ I - I I I ) の重鎖におけるアミノ酸位置を示す。H e r c e p t i n ( 登録商標 ) 抗 H E R 2 抗体の開発のために使用したコンセンサス配列、ラット F i b 5 0 4 及び h u 5 0 4 - R L フレームワークは本明細書の実施例に記載する。図 1 0 B は実施例 1 に記載する「R L」又は「R F」フレームワーク修飾の関数としての h u 5 0 4 グラフト及び h u 5 0 4 K グラフト抗体へのアルファ 4 ベータ 7 の相対的結合を示す棒グラフである。

【図 1 1 A - 1】図 1 1 A - 1 1 C。図 1 1 A は h u 5 0 4 . 1 6 変異体においてアミノ酸置換の限定された範囲を与えることにより実施した親和性成熟に起因する H V R の変化を表にしたものである。結果は本明細書の実施例 2 に記載した h u 5 0 4 . 1 6 変異体における個別に修飾された H V R を有するライブラリから得ている。箱内のアミノ酸の略記はベータ 7 結合抗体 ( ファージ選択抗体 ) においてより頻繁に観察されたアミノ酸である。

【図 1 1 A - 2】図 1 1 A - 1 1 C。図 1 1 A は h u 5 0 4 . 1 6 変異体においてアミノ酸置換の限定された範囲を与えることにより実施した親和性成熟に起因する H V R の変化を表にしたものである。結果は本明細書の実施例 2 に記載した h u 5 0 4 . 1 6 変異体における個別に修飾された H V R を有するライブラリから得ている。箱内のアミノ酸の略記はベータ 7 結合抗体 ( ファージ選択抗体 ) においてより頻繁に観察されたアミノ酸である。

【図 1 1 B】図 1 1 A - 1 1 C。図 1 1 B 及び 1 1 C は実施例 2 に記載した突然変異誘発及び選択により検出可能な h u 5 0 4 . 1 6 変異体 ( 軽鎖、図 1 1 B ; 重鎖、図 1 1 C ) におけるアミノ酸置換の数と型を示す図 1 1 A の結果の棒グラフである。

【図 1 1 C】図 1 1 A - 1 1 C。図 1 1 B 及び 1 1 C は実施例 2 に記載した突然変異誘発及び選択により検出可能な h u 5 0 4 . 1 6 変異体 ( 軽鎖、図 1 1 B ; 重鎖、図 1 1 C ) におけるアミノ酸置換の数と型を示す図 1 1 A の結果の棒グラフである。

【図 1 2】図 1 2 は実施例 2 に記載した h u 5 0 4 . 3 2 変異体の H V R における可能なアミノ酸置換の広範な範囲を与えることにより実施したアフィニティー突然変異の結果を表にしたものである。箱部は実施例 2 の突然変異誘発及び選択方法によりベータ 7 結合抗体として検出された抗体において最も頻繁に検出されたアミノ酸を示す。

【図 1 3 A】図 1 3 A および 1 3 B は抗マウス F i b 5 0 4 ( A T C C - 2 9 3 ) 及びヒトコンセンサス ( 左コラム ) の H V R 配列を示す。実施例に記載した試験により各 H V R について観察されたアミノ酸置換 ( ソフトアミノ酸ランダム化、広範なアミノ酸置換スキャン、及び限定的アミノ酸置換スキャンにより観察されたアミノ酸置換 ) の例 ( 限定しない ) を右側に示す ( 本発明の変異体に適用可能なヒト化のために H V R を修飾する有用な方法は 2 0 0 4 年 2 月 1 9 日出願の米国暫定出願 6 0 / 5 4 5 , 8 4 0 に記載されている ) 。

【図 1 3 B】図 1 3 A および 1 3 B は抗マウス F i b 5 0 4 ( A T C C - 2 9 3 ) 及びヒトコンセンサス ( 左コラム ) の H V R 配列を示す。実施例に記載した試験により各 H V R について観察されたアミノ酸置換 ( ソフトアミノ酸ランダム化、広範なアミノ酸置換スキャン、及び限定的アミノ酸置換スキャンにより観察されたアミノ酸置換 ) の例 ( 限定しない ) を右側に示す ( 本発明の変異体に適用可能なヒト化のために H V R を修飾する有用な

10

20

30

40

50

方法は2004年2月19日出願の米国暫定出願60/545,840に記載されている)。

【図14】図14は実施例3に記載する抗体濃度の関数としてのMAdCAMへのFib504及び変異体抗体の結合の例示的グラフ表示である。抗体に関するIC<sub>50</sub>及びIC<sub>90</sub>値を測定した。

【図15A】図15Aおよび15Bは抗体の6HVRに関するKabataナンバリングシステム及び相対的ナンバリングシステム(A-F)に従った位置に関する504.32R抗ベータ7抗体に関わる軽鎖及び重鎖のHVRアミノ酸配列を示す。重鎖FR3領域の71、73及び78位のアミノ酸も示す。有用なアミノ酸置換はまたHVR又は重鎖FR3領域における位置の多くについても列挙する。

【図15B】図15Aおよび15Bは抗体の6HVRに関するKabataナンバリングシステム及び相対的ナンバリングシステム(A-F)に従った位置に関する504.32R抗ベータ7抗体に関わる軽鎖及び重鎖のHVRアミノ酸配列を示す。重鎖FR3領域の71、73及び78位のアミノ酸も示す。有用なアミノ酸置換はまたHVR又は重鎖FR3領域における位置の多くについても列挙する。

【図16】図16は炎症性腸疾患を経験しているマウスの結腸への放射標識T細胞のホーミングをブロックする504.32M及び504.32R抗体の相対的能力の棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0081】

(発明を実施するための形態)

本発明はベータ7シグナリング経路の阻害剤を発見及び/又は使用するための方法、組成物、キット及び製造物品を提供する。

【0082】

これらの方法、組成物、キット及び製造物品の詳細を本明細書に記載する。

【0083】

(一般的手法)

本発明の実施は、特段の記載が無い限り、当該分野で知られた分子生物学(例えば組み換え手法)、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来的手法を使用する。このような手法は文献、例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrookら、1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubelら、eds., 1987及び定期改訂版); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullisら、ed., 1994); “A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard V., 1988); “Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbasら、2001)に詳述されている。

【0084】

(定義)

「ベータ7サブユニット」又は「7サブユニット」とはヒト7インテグリンサブユニットを意味する(Erleら、(1991) J. Biol. Chem. 266: 11009-11016)。ベータ7サブユニットはアルファ4インテグリンサブユニット、例えばヒト4サブユニットと会合する(Kilger and Holzmann(1995) J. Mol. Biol. 73: 347-354)。アルファ4ベータ7インテグリンは成熟リンパ球の大部分、並びに、一部集団の胸腺細胞、骨髄細胞及び肥満細胞において発現される。(Kilshaw and Murrant(1991) Eur. J. Im

10

20

30

40

50

munol. 21: 2591 - 2597; Gurishら、(1992) 149: 1964 - 1972; 及び Shaw, S. K. and Brenner, M. B. (1995) Semin. Immunol. 7: 335)。ベータ7サブユニットはまたアルファEサブユニット、例えばヒトアルファEインテグリンサブユニットとも会合する(Ceppek, K. L., ら、(1993) J. Immunol. 150: 3459)。アルファEベータ7インテグリンは腸上皮内リンパ球(iIEL)上に発現される(Ceppek, K. L. (1993) 上出)。本発明のヒト化抗ベータ7抗体に結合するベータ7サブユニットは天然に存在するものであり、そして可溶性であるか、細胞表面に局在化する。

【0085】

「アルファEサブユニット」又は「アルファEインテグリンサブユニット」又は「Eサブユニット」又は「CD103」とは上皮内リンパ球上のベータ7インテグリンに会合することがわかっているインテグリンサブユニットを意味し、このアルファEベータ7インテグリンはE-カドヘリンを発現する腸上皮へのiIELの結合を媒介する(Ceppek, K. L., ら、(1993) J. Immunol. 150: 3459; Shaw, S. K. and Brenner, M. B. (1995) Semin. Immunol. 7: 335)。

【0086】

「MAdCAM」又は「MAdCAM-1」は本発明の観点においては互換的に使用され、そして蛋白粘膜炎細胞接着分子1を指し、これは短い原形質テール部及び免疫グロブリン様ドメインよりなる細胞外配列を含む1本鎖ポリペプチドである。マウス、ヒト及びマカクのMAdCAM-1に関するcDNAがクローニングされている(Briskin, ら、(1993) Nature, 363: 461 - 464; Shyjanら、(1996) J. Immunol. 156: 2851 - 2857)。

【0087】

「VCAM-1」又は「血管細胞接着分子-1」、「CD106」とは、活性化された内皮上に発現されるアルファ4ベータ7及びアルファ4ベータ1のリガンドを指し、そして炎症中の白血球の結合及び遊出のような内皮白血球相互作用において重要である。

【0088】

「E-カドヘリン」とはカドヘリンのファミリーのメンバーであり、E-カドヘリンは上皮細胞上に発現される。E-カドヘリンはアルファEベータ7インテグリンのリガンドであり、腸上皮へのiIEL発現アルファEベータ7の結合を媒介するが、リンパ球ホーミングにおけるその機能は不明である(E-カドヘリンの発現はTGF-ベータ1によりアップレギュレートされる)。

【0089】

「フィブロネクチン」とは組織修復、胚形成、血液凝固及び細胞の遊走/接着に関連している。これはECM(細胞外マトリックス)におけるリンカーとして作用し、血漿中には2量体(血漿中フィブロネクチン)として存在する。血漿中の型は肝細胞により合成されるのに対し、ECM型は線維芽細胞、軟骨細胞、内皮細胞、マクロファージ並びに特定の上皮細胞により生産される。この観点において、それは、アルファ4ベータ7インテグリンと相互作用し、リンパ球のホーミング又は接着の特徴を媒介する。フィブロネクチンのECM型はコラーゲン又はプロテオグリカン基質に細胞をアンカリングすることにより一般的な細胞接着分子として作用する。フィブロネクチンはまた細胞外マトリックスの種々の成分に、そして細胞表面上の膜結合フィブロネクチン受容体に結合することによりECMとの細胞相互作用を組織化する働きを有する。最後に、フィブロネクチンは胚形成の間の細胞遊走の事象において重要である。

【0090】

「胃腸炎症障害」は粘膜中に炎症及び/又は潰瘍を誘発する慢性障害の1群である。これらの障害は例えば炎症性腸疾患(例えばクローン病、潰瘍性結腸炎、分類不能大腸炎及び感染性結腸炎)、粘膜炎(例えば口腔粘膜炎、胃腸粘膜炎、鼻粘膜炎及び直腸炎)、壊死性腸炎及び食道炎を包含する。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 9 1 】

「炎症性腸疾患」又は「IBD」は本明細書においては互換的に使用し、炎症及び/又は潰瘍を誘発する腸の疾患を指し、そしてクローン病及び潰瘍性結腸炎を包含する。

## 【 0 0 9 2 】

「クローン病 ( C D ) 」又は「潰瘍性結腸炎 ( U C ) 」は、未知の病因の慢性炎症性腸疾患である。クローン病は、潰瘍性結腸炎とは異なり、腸の如何なる部分にも生じ得るものである。最も顕著な特徴としてのクローン病は腸壁の顆粒状の赤紫色の浮腫性の肥厚である。炎症の発生に従い、これらの肉芽腫からその外周境界が消失し、周囲の組織と一体化する場合が多い。下痢及び腸閉塞が主要な臨床特徴である。潰瘍性結腸炎と同様、クローン病の過程は持続性又は回帰性、軽度又は重度となるが、ただし結腸炎とは異なり、クローン病は腸の罹患区分の切除によって治癒されない。クローン病の患者の大部分はある時点において手術を必要とするが、その後の回帰は一般的であり、継続的な医療処置が通常となる。

10

## 【 0 0 9 3 】

クローン病は口腔から肛門に至る消化管の何れかの部分が関与するものであるが、典型的には回結腸、小腸及び結腸 - 肛門直腸の領域に生じる。組織病理学的には、疾患は断続的な肉芽腫、陰窩膿瘍、裂傷及びアフタ性潰瘍により顕在化する。炎症の浸潤は混在性であり、リンパ球 ( T 及び B 細胞の両方 ) 、プラズマ細胞、マクロファージ及び好中球よりなる。 I g M 及び I g G 分泌プラズマ細胞、マクロファージ及び好中球の不均衡な増大を伴う。

20

## 【 0 0 9 4 】

抗炎症剤スルファサラジン及び 5 - アミノサリチル酸 ( 5 - A S A ) は軽度に活動性の結腸のクローン病を治療するために有用であり、そして疾患の寛解を維持するために一般的に処方されている。メトロイダゾール及びシプロフロキサシンはスルファサラジンと薬効において同様であり、そして肛門周囲疾患を治療するために特に有用であると考えられる。さらに深刻な場合には、コルチコステロイドは活動性の再燃の治療に効果があり、さらに寛解を維持することが可能である。アザチオプリン及び 6 - メルカプトプリンもまたコルチコステロイドの長期投与を必要とする患者において良好な結果をもたらしている。これらの薬剤は長期の予防においても役割を果たすことが可能である。残念なことに、一部の患者においては作用が開始される前に極めて長期の遅延 ( 6 ヶ月まで ) がある場合がある。

30

## 【 0 0 9 5 】

下痢止め薬もまた一部の患者において兆候的寛解をもたらす。栄養療法又は単元的食餌が患者の栄養状態を改善し、そして急性の疾患の兆候的改善を誘導する場合があるが、持続性の臨床的寛解を誘導するわけではない。抗生物質は二次的な小規模の腸内細菌の過剰増殖を治療する場合、及び、化膿性の合併症を治療する場合に使用されている。

## 【 0 0 9 6 】

「潰瘍性結腸炎 ( U C ) 」は大腸に生じる。疾患の過程は持続性又は回帰性、軽度又は重度となる。最早期の幹部はリーベルキューン陰窩の基底部分における膿瘍の形成を伴った炎症性の浸潤である。これらの膨張し崩壊した陰窩の癒着状態は積層する粘膜をその血液供給から分断し、潰瘍をもたらす。疾患の症状は、痙攣、下腹部痛、直腸出血及び糞粒子の乏しい血液、膿汁及び粘膜より主になる頻繁な軟便を包含する。急性、重度又は慢性、非寛解性の潰瘍性結腸炎では全結腸摘出が必要となる場合がある。

40

## 【 0 0 9 7 】

U C の臨床特徴は極めて変動的であり、そして発症は潜行性又は突然であり、そして下痢、テネスムス及び回帰性の直腸出血を包含する場合がある。全結腸に急激な発症があれば、中毒性巨大結腸、致命的な緊急事態が起こる場合がある。腸外の顕在的特長は関節炎、膿皮壊疽、ブドウ膜炎及び結節性紅斑を包含する。

## 【 0 0 9 8 】

U C の治療は軽度の症例ではスルファサラジン及び関連のサリシレート含有薬剤、そして

50

重度の症例ではコルチコステロイド剤を使用する。サリシレート又はコルチコステロイドの局所投与は場合によっては、特に疾患が遠位の腸に限局されている場合は有効であり、そして全身使用と比較して低減された副作用を有する。鉄及び抗下痢剤の投与のような補助的処置が場合により適応される。アザチオプリン、6-メルカプトプリン及びメトトレキセートは場合により、難治性のコルチコステロイド依存症例において処方される場合がある。

#### 【0099】

アミノ酸残基/位置の「修飾」とは、本明細書においては、出発アミノ酸配列と比較し他場合の一次アミノ酸配列の変化を指し、その場合、その変化はそのアミノ酸残基/位置が関与する配列の改変に起因している。例えば、典型的な修飾は残基（又はその位置における）の別のアミノ酸による置換（例えば保存的又は非保存的置換）、その残基/位置に隣接するアミノ酸1つ以上（一般的に5又は3未満）の挿入、及び、その残基/位置の欠失を包含する。「アミノ酸置換」又はその変異は、異なるアミノ酸残基による所定の（出発の）アミノ酸配列内の既存のアミノ酸残基の置き換えを指す。一般的に、そして、好ましくは、修飾により出発（又は「野生型」）のアミノ酸を含むポリペプチドと比較して変異体ポリペプチドの少なくとも1つ物理生物化学的活性が改変される。例えば、抗体の場合、改変される物理生物化学的活性は、標的分子に対する結合親和性、結合能力及び/又は結合作用であることができる。

10

#### 【0100】

「アミノ酸」という用語は本明細書の範囲内においては、その最も広範な意味において使用され、そして天然に存在するL-アミノ酸又は残基を包含する意味を有する。天然に存在するアミノ酸に関して一般的に使用される1文字及び3文字の略記法を本明細書において使用する（Lehninger, A. L., Biochemistry, 2nd ed., pp. 71-92, Worth Publishers, New York, New York, 1975）。用語はD-アミノ酸並びに化学修飾されたアミノ酸、例えばアミノ酸類縁体、蛋白に通常は取り込まれない天然に存在するアミノ酸、例えばノルロイシン及びアミノ酸に特徴的であることが当該分野で知られている特性を有する化学合成された化合物を包含する。例えば、天然のPhe又はProと同じペプチド化合物のコンホーメーション制限を可能にするフェニルアラニン又はプロリンの類縁体又は模倣体もアミノ酸の定義に包含される。このような類縁体及び模倣体は本明細書においては、アミノ酸の「機能的等価物」と称する。アミノ酸の他の例は参照により本明細書に組み込まれるRoberts and Vellaccio, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Gross and Meierhofer, Eds., Vol. 5, p. 341 (Academic Press, Inc., New York, New York, 1983)に記載されている。一文字を使用して天然に存在するアミノ酸の1つを標記する場合は、その標記は関連する文献に一般的に掲載されているものと同様である（例えば、Alberts, B.ら、Molecular Biology of the Cell, 3rd ed., Garland Publishing, Inc. 1994, p. 57参照）。

20

30

#### 【0101】

「単離された」抗体とは、その天然の環境の成分から発見され、そして分離及び/又は回収されたものである。その天然の環境の夾雑物成分は抗体の診断又は治療上の使用に干渉する可能性があり、そして、酵素、ホルモン及び他の蛋白性又は非蛋白性の溶質を包含する。好ましい実施形態においては抗体の精製は（1）Lowry法で測定した場合に抗体95重量%超、最も好ましくは99重量%超まで、（2）スピニングカップシーケンサーの使用によりN末端又は内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るために十分な程度まで、又は（3）クーマシーブルー又は好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件化のSDS-PAGEで均質となるまで行う。単離された抗体は、抗体の天然の環境の少なくとも1つの成分も存在しなくなるため、組み換え細胞内のインサイチュの抗体を包含する。しかしながら通常は単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により製造する

40

50

。

## 【0102】

「Kabatにおける可変ドメイン残基ナンバリング」又は「Kabatにおけるアミノ酸位置ナンバリング」という用語及びその変形例は、Kabatら、Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)における抗体の編集の重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインに関して使用されているナンバリングシステムを指す。このナンバリングシステムを用いれば、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はCDRの短鎖化又はその内部への挿入に相当する過少な、又は付加的なアミノ酸を含有してよい。例えば、重鎖可変ドメインはH2の残基52の後に単一のアミノ酸インサート(Kabatによれば残基52a)及び重鎖FR残基82の後に挿入された残基(Kabatによれば残基82a、82b及び82c等)を含んでよい。残基のKabatナンバリングは、所定の抗体について、「標準的な」Kabat番号配列を有する抗体の配列の相同性の領域におけるアライメントにより決定してよい。

10

## 【0103】

「実質的に同様」又は「実質的に同じ」という用語は、本明細書においては、2つの数値(一般的には1つは本発明の抗体に関わるものであり、もう1つは参照物/比較物の抗体に関わるもの)の間の差が、その数値(例えばKd値)が尺度となる生物学的特徴の観点内で、殆ど又は全く生物学的及び/又は統計学的に有意でないと当業者が考えるほど十分高い程度の2つの数値間の類似性を指す。このような2つの数値の差は好ましくは、参照物/比較物抗体の数値の関数として、約50%未満、好ましくは約40%未満、好ましくは約30%未満、好ましくは約20%未満、好ましくは約10%未満である。

20

## 【0104】

「結合親和性」とは一般的に分子(例えば抗体)の単一の結合部位とその結合相手(例えば抗原)との間の非共有結合性の相互作用の合計の強度を指す。特段の記載が無い限り本明細書においては、「結合親和性」とは結合対(例えば抗体と抗原)の間の1:1の相互作用を反映している内因性の結合親和性を指す。分子Xのその相手Yに対する親和性は一般的に解離定数(Kd)により表すことができる。親和性は本明細書に記載するもののような当該分野で知られた一般的な方法により測定できる。低親和性抗体は一般的に緩徐に抗原に結合し、そして容易に解離する傾向にあるのに対し、高親和性抗体は一般的に急速に抗原に結合し、より長時間結合状態で残存する傾向がある。結合親和性を測定する種々の方法が当該分野で知られており、その何れも本発明の目的のために使用できる。特定の例示される実施形態は後に記載する。

30

## 【0105】

1つの実施形態において、「Kd」又は「Kd値」とは、本発明によれば、目的の抗体のFab型とその抗原を用いながら、抗原に対するFabの溶液結合親和性(RIA)を測定する後述の試験により説明される通り、未標識の抗原の段階力価物の存在下( $^{125}$ I)標識抗原の最小濃度でFabを平衡化させ、次に、抗Fab抗体コーティングプレートを用いて結合抗原をキャプチャーすることにより測定する(Chenら、(1999)J. Mol. Biol. 293: 865-881)。試験の条件を確立するために、マイクロプレート(Dynex)を50mM炭酸ナトリウム(pH9.6)中キャプチャー用抗Fab抗体(Cappel Labs)5ug/mlで一夜コーティングし、そしてその後、室温で2~5時間(約23)PBS中2%(w/v)ウシ血清アルブミンでブロッキングした。非吸着プレート(Nunc#269620)中、100pM又は26pM [ $^{125}$ I]-抗原を目的のFabの連続希釈物と混合する(例えばPrestara、(1997)Cancer Res. 57: 4593-4599の抗VEGF抗体、Fab-12の試験と合致)。次に目的のFabを一夜インキュベートするが、インキュベートは確実に平衡が達成されるようにより長時間(例えば65時間)継続してよい。その後

40

50

、混合物を室温インキュベーション（例えば1時間）のためにキャプチャープレートに移す。次に溶液を取り出し、プレートをPBS中0.1% Tween-20で8回洗浄する。プレートが乾燥した時点で、シンチラント（MicroScint-20; Packard）150  $\mu$ l/ウェルを添加し、プレートをTopcountガンマカウンター（Packard）で10分間計数する。最大結合の20%以下を与える各Fabの濃度を競合的結合試験で使用するために選択する。別の実施形態によれば、Kd又はKd値は~10 応答単位（RU）において固定化された抗原CM5チップを用いて25 においてBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を用いた表面プラズモン共鳴試験により測定する。概すればカルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIAcore, Inc.）を入手元の取扱説明書に従って塩酸N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。抗原を5  $\mu$ g/ml（~0.2  $\mu$ M）まで10 mM酢酸ナトリウムpH 4.8で希釈した後に5  $\mu$ l/分の流量で注入し、約10 応答単位（RU）のカップリング蛋白を達成する。抗原注入後、1 Mエタノールアミンを注入して未反応の基をブロッキングする。速度論的測定のために、Fabの2倍連続希釈物（0.78 nM~500 nM）を0.05% Tween 20含有PBS（PBST）中で25 流量約25  $\mu$ g/分で注入する。会合速度（ $k_{on}$ ）及び解離速度（ $k_{off}$ ）は会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることにより単純な1対1のロングミュア結合モデル（BIAcore Evaluation Softwareバージョン3.2）を用いて計算する。平衡解離定数（Kd）は比 $k_{off}/k_{on}$ として計算する。例えばChen, Y., ら、（1999）J. Mol Biol 293: 865-881を参照できる。上記した表面プラズモン共鳴試験による $on$ の速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を超過する場合は、 $on$ 速度は、攪拌赤色キュベットを有するストップフロー装着分光光度計（Aviv Instrument）又は8000シリーズSLM-Aminco分光光度計（Thermo Spectronic）のような分光計において測定した場合の抗原の漸増濃度の存在下PBS、pH 7.2中20 nM抗抗原抗体（Fab型）の25 における蛍光発光強度の増大又は低減を測定する蛍光クエンチングの手法（励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、16 nmバンドパス）により測定することができる。

#### 【0106】

本発明による「 $on$ 速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 $k_{on}$ 」はまた~10 応答単位（RU）において固定化された抗原CM5チップを用いて25 においてBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を用いた上記表面プラズモン共鳴試験により測定する。概すればカルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIAcore, Inc.）を入手元の取扱説明書に従って塩酸N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。抗原を5  $\mu$ g/ml（~0.2  $\mu$ M）まで10 mM酢酸ナトリウムpH 4.8で希釈した後に5  $\mu$ l/分の流量で注入し、約10 応答単位（RU）のカップリング蛋白を達成する。抗原注入後、1 Mエタノールアミンを注入して未反応の基をブロッキングする。速度論的測定のために、Fabの2倍連続希釈物（0.78 nM~500 nM）を0.05% Tween 20含有PBS（PBST）中で25 流量約25  $\mu$ g/分で注入する。会合速度（ $k_{on}$ ）及び解離速度（ $k_{off}$ ）は会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることにより単純な1対1のロングミュア結合モデル（BIAcore Evaluation Softwareバージョン3.2）を用いて計算する。平衡解離定数（Kd）は比 $k_{off}/k_{on}$ として計算する。例えばChen, Y., ら、（1999）J. Mol Biol 293: 865-881を参照できる。しかしながら上記した表面プラズモン共鳴試験による $on$ の速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を超過する場合は、 $on$ 速度は、攪拌キュベットを有するストップフロー装着分光光度計（Aviv Instrument）又は8000シリーズSLM-Aminco分光光度

10

20

30

40

50

計 (ThermoSpectronic) のような分光計において測定した場合の抗原の漸増濃度の存在下 PBS、pH 7.2 中 20 nM 抗抗原抗体 (Fab 型) の 25 における蛍光発光強度の増大又は低減を測定する蛍光クエンチングの手法 (励起 = 295 nm、発行 = 340 nm、16 nm バンドパス) により測定することができる。本発明による「 $K_d$ 」又は「 $K_d$  値」は、1つの実施形態においては、抗体の Fab 型と抗原分子を用いながら、抗原に対する Fab の溶液結合親和性 (RIA) を測定する後述の試験により説明される通り、未標識の抗原の段階力価物の存在下 ( $^{125}I$ ) 標識抗原の最小濃度で Fab を平衡化させ、次に、抗 Fab 抗体コーティングプレートを用いて結合抗原をキャプチャーすることにより測定する (Chen, ら、(1999) J. Mol. Biol. 293: 865 - 881)。試験の条件を確立するために、マイクロプレート (Dynex) を 50 mM 炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中キャプチャー用抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 5  $\mu$ g/ml で一夜コーティングし、そしてその後、室温で 2 ~ 5 時間 (約 23) PBS 中 2% (w/v) ウシ血清アルブミンでブロッキングした。非吸着プレート (Nunc # 269620) 中、100 pM 又は 26 pM [ $^{125}I$ ] - 抗原を目的の Fab の連続希釈物と混合する (Prestar, (1997) Cancer Res. 57: 4593 - 4599 の抗 VEGF 抗体、Fab - 12 の試験と合致)。次に目的の Fab を一夜インキュベートするが、インキュベートは確実に平衡が達成されるようにより長時間 (例えば 65 時間) 継続してよい。その後、混合物を 1 時間室温インキュベーションのためにキャプチャープレートに移す。次に溶液を取り出し、プレート w PBS 中 0.1% Tween - 20 で 8 回洗浄する。プレートが乾燥した時点で、シンチラント (MicroScint - 20; Packard) 150  $\mu$ l / ウェルを添加し、プレートを Topcount ガンマカウンター (Packard) で 10 分間計数する。最大結合の 20% 以下を与える各 Fab の濃度を競合的結合試験で使用するために選択する。別の実施形態によれば、 $K_d$  又は  $K_d$  値は ~ 10 応答単位 (RU) において固定化された抗原 CM5 チップを用いて 25 において BIAcore<sup>TM</sup> - 2000 又は BIAcore<sup>TM</sup> - 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を用いた表面プラズモン共鳴試験により測定する。概すればカルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ (CM5、BIAcore, Inc.) を入手元の取扱説明書に従って塩酸 N - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド (EDC) 及び N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) で活性化する。抗原を 5  $\mu$ g/ml (~ 0.2  $\mu$ M) まで 10 mM 酢酸ナトリウム pH 4.8 で希釈した後に 5  $\mu$ l / 分の流量で注入し、約 10 応答単位 (RU) のカップリング蛋白を達成する。抗原注入後、1 M エタノールアミンを注入して未反応の基をブロッキングする。速度論的測定のために、Fab の 2 倍連続希釈物 (0.78 nM ~ 500 nM) を 0.05% Tween 20 含有 PBS (PBST) 中で 25 流量約 25  $\mu$ g / 分で注入する。会合速度 ( $k_{on}$ ) 及び解離速度 ( $k_{off}$ ) は会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることにより単純な 1 対 1 のロングミュア結合モデル (BIAcore Evaluation Software バージョン 3.2) を用いて計算する。平衡解離定数 ( $K_d$ ) は比  $k_{off} / k_{on}$  として計算する。例えば Chen, Y., ら、(1999) J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 を参照できる。上記した表面プラズモン共鳴試験による  $on$  の速度が  $10^6 M^{-1} S^{-1}$  を超過する場合は、 $on$  速度は、攪拌赤色キュベットを有するストップフロー装着分光光度計 (Aviv Instrument) 又は 8000 シリーズ SLM - Aminco 分光光度計 (ThermoSpectronic) のような分光計において測定した場合の抗原の漸増濃度の存在下 PBS、pH 7.2 中 20 nM 抗抗原抗体 (Fab 型) の 25 における蛍光発光強度の増大又は低減を測定する蛍光クエンチングの手法 (励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、16 nm バンドパス) により測定することができる。

#### 【0107】

1つの実施形態において、本発明による「 $on$  速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 $k_{on}$ 」はまた ~ 10 応答単位 (RU) において固定化された抗原 CM5 チッ

ブを用いて25においてBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた上記表面プラズモン共鳴試験により測定する。概すればカルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5、BIAcore, Inc.)を入手元の取扱説明書に従って塩酸N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で活性化する。抗原を5ug/ml(~0.2uM)まで10mM酢酸ナトリウムpH4.8で希釈した後に5ul/分の流量で注入し、約10応答単位(RU)のカップリング蛋白を達成する。抗原注入後、1Mエタノールアミンを注入して未反応の基をブロックする。速度論的測定のために、Fabの2倍連続希釈物(0.78nM~500nM)を0.05%Tween20含有PBS(PBST)中で25流量約25ul/分で注入する。会合速度( $k_{on}$ )及び解離速度( $k_{off}$ )は会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることにより単純な1対1のロングミュア結合モデル(BIAcore Evaluation Softwareバージョン3.2)を用いて計算する。平衡解離定数(Kd)は比 $k_{off}/k_{on}$ として計算する。例えばChen, Y.,ら、(1999)J. Mol Biol 293:865-881を参照できる。しかしながら上記した表面プラズモン共鳴試験による $k_{on}$ の速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を超過する場合は、 $k_{on}$ 速度は、攪拌キュベットを有するストップフロー装着分光光度計(Aviv Instrument)又は8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)のような分光計において測定した場合の抗原の漸増濃度の存在下PBS、pH7.2中20nM抗抗原抗体(Fab型)の25における蛍光発光強度の増大又は低減を測定する蛍光クエンチングの手法(励起=295nm、発光=340nm、16nmバンドパス)により測定することができる。

#### 【0108】

「実質的に低減された」又は「実質的に異なる」という表現は、本明細書においては、2つの数値(一般的には1つは本発明の抗体に関わるものであり、もう1つは参照物/比較物の抗体に関わるもの)の間の差が、その数値(例えばKd値、HAM A応答)が尺度となる生物学的特徴の観点内で、統計学的に有意であると当業者が考えるほど十分高い程度の2つの数値間の類似性を指す。このような2つの数値の差は好ましくは、参照物/比較物抗体の数値の関数として、約10%超、好ましくは約20%超、好ましくは約30%超、好ましくは約40%超、好ましくは約50%超である。

#### 【0109】

ペプチド又はポリペプチドの配列に関して「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列をアラインし、そして必要に応じてギャップを導入することにより最大パーセント配列同一性を達成した後の、そして何れかの保存的置換も配列同一性の部分とはみなす内場合の、特定のペプチド又はポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を測定する目的のためのアライメントは例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNA STAR)ソフトウェアのような市販されているコンピュータソフトウェアを用いながら、当該分野で知られた種々の方法において達成することができる。アライメントを測定するための適切なパラメーター、例えば比較される配列の完全長にわたる最大アライメントを達成するために必要な何れかのアルゴリズムは当業者が決定できる。しかしながら本明細書の目的のためには、%アミノ酸同一性の値は配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して得られるものであり、その場合、ALIGN-2プログラムのための完全なソースコードは以下の表Aに示す通りである。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはGenentech, Inc.により著作されたものであり、以下の表Aに示すソースコードは米国著作権登録番号TXU510087の下にそれが登録されている米国著作権局(Washington D.C., 20559)内にユーザードキュメンテーションとともに提出されている。ALIGNB-2プログラムはGenentech, Inc., South San Franc

isco, Californiaを通じて公的に入手するか、又は、以下の図8内に示すソースコードからコンパイルしてよい。ALIGN-2プログラムはUNIX（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX（登録商標）V4.0D上での使用のためにコンパイルしなければならない。全ての配列比較パラメータはALIGN-2プログラムにより設定され、そして変化しない。

【0110】

ALIGN-2をアミノ酸配列比較のために使用する状況においては、所定のアミノ酸Aの、所定のアミノ酸Bに対する又はそれとの又はそれに対向する%アミノ酸配列同一性（これは所定のアミノ酸Bに対する又はそれとの又はそれに対向する所定の%アミノ酸配列同一性を有するか含む所定のアミノ酸配列Aと表現することもできる）は以下の通り計算する。

10

【0111】

割合X/Yの100倍

ここで、Xは配列アライメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプログラムアライメントにおいて、同一マッチと評点されたアミノ酸残基の数であり、そしてYはB中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さはアミノ酸配列Bの長さと同じでない場合は、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性はAに対するBの%アミノ酸配列同一性と等しくならない。

【0112】

特段の記載が無い限り、本明細書において使用する全ての%アミノ酸配列同一性の値はALIGN-2コンピュータプログラムを用いながら直前のパラグラフにおいて記載した通りに得た。

20

【0113】

【化1】

表 A

/\*

\*

\* C-C increased from 12 to 15

\* Z is average of EQ

\* B is average of ND

\* match with stop is \_M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0

\*/

#define \_M -8 /\* value of a match with a stop \*/

int \_day[26][26] = {

/\* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z \*/

/\* A \*/ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, \_M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},

/\* B \*/ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, \_M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},

/\* C \*/ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, \_M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},

/\* D \*/ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, \_M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},

/\* E \*/ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, \_M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},

/\* F \*/ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, \_M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},

/\* G \*/ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, \_M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},

30

40

【0114】

50

## 【化 2】

```

/* H */ {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */ {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */ { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */ { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */ {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */ { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */ {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */ { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};

```

10

20

/\*

30

\*/

#include &lt;stdio.h&gt;

#include &lt;ctype.h&gt;

#define MAXJMP 16 /\* max jumps in a diag \*/

#define MAXGAP 24 /\* don't continue to penalize gaps larger than this \*/

#define JMPS 1024 /\* max jmps in an path \*/

40

#define MX 4 /\* save if there's at least MX-1 bases since last jmp \*/

#define DMAT 3 /\* value of matching bases \*/

#define DMIS 0 /\* penalty for mismatched bases \*/

#define DINS0 8 /\* penalty for a gap \*/

#define DINS1 1 /\* penalty per base \*/

#define PINS0 8 /\* penalty for a gap \*/

## 【 0 1 1 5】

50



【 化 3 】

```

#define PINS1      4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int           score;      /* score at last jmp */
    long          offset;     /* offset of prev block */
    short         ijmp;       /* current jmp index */
    struct jmp    jp;         /* list of jmps */
};

struct path {
    int           spc;        /* number of leading spaces */
    short         n[JMPs];    /* size of jmp (gap) */
    int           x[JMPs];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char           *ofile;      /* output file name */
char           *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char           *prog;       /* prog name for err msgs */
char           *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
int            dmax;        /* best diag: nw() */
int            dmax0;       /* final diag */
int            dna;         /* set if dna: main() */
int            endgaps;     /* set if penalizing end gaps */
int            gapx, gapy;   /* total gaps in seqs */
int            len0, len1;   /* seq lens */
int            ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int            smax;        /* max score: nw() */
int            *xbm;        /* bitmap for matching */
long           offset;     /* current offset in jmp file */
struct diag    *dx;        /* holds diagonals */
struct path    pp[2];      /* holds path for seqs */

```

10

20

30

40

【 0 1 1 6 】

【化 4】

```

char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_calloc();

```

10

```

/* Needleman-Wunsch alignment program

```

```

*

```

```

* usage: progs file1 file2

```

```

* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.

```

```

* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity

```

```

* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored

```

```

* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)

```

20

```

* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA

```

```

* Output is in the file "align.out"

```

```

*

```

```

* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.

```

```

* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650

```

```

*/

```

```

#include "nw.h"

```

```

#include "day.h"

```

30

```

static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

```

```

static  _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

```

40

```

main(ac, av)

```

```

    main

```

```

    int    ac;

```

```

    char  *av[];

```

【 0 1 1 7 】

50

【 化 5 】

```

{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)?_dbval : _pbval;

    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw();                /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();         /* get the actual jmps */
    print();            /* print stats, alignment */

    cleanup(0);         /* unlink any tmp files */
}

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{

```

【 0 1 1 8 】

【化6】

```

char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
int       *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
int       ndelx, delx;     /* keep track of delx */
int       *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
int       mis;           /* score for each type */
int       ins0, ins1;     /* insertion penalties */
register   id;           /* diagonal index */
register   ij;           /* jmp index */
register   *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
register   xx, yy;       /* index into seqs */

```

10

```
dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
```

```
ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
```

```
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
```

```
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
```

```
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
```

```
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
```

```
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
```

```
smax = -10000;
```

```
if (endgaps) {
```

```
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
```

```
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
```

```
        ndely[yy] = yy;
```

```
    }
```

```
    col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
```

```
}
```

```
else
```

```
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
```

```
        dely[yy] = -ins0;
```

```
/* fill in match matrix
```

```
*/
```

```
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
```

```
    /* initialize first entry in col
```

```
    */
```

20

30

40

50

【0119】

【 化 7 】

```

if (endgaps) {
    if (xx == 1)
        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
    else
        col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
    ndelx = xx;
}
else {
    col1[0] = 0;
    delx = -ins0;
    ndelx = 0;
}

...nw

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
    * favor new del over ongong del
    * ignore MAXGAP if weighting endgaps
    */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);

```

【 0 1 2 0 】

50

【 化 8 】

```

        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongong del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

...nw

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
}

```

【 0 1 2 1 】

50

【化 9】

```

ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
    dx[id].ijmp++;
    if (++ij >= MAXJMP) {
        writejumps(id);
        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }
}
dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
dx[id].jp.x[ij] = xx;
dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
    dx[id].ijmp++;
    if (++ij >= MAXJMP) {
        writejumps(id);
        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }
}
dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
dx[id].jp.x[ij] = xx;
dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
}

```

【 0 1 2 2 】

50

【化 1 0】

```

        if (col1[yy] > smax) {
            smax = col1[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

/*
*
* print() -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat() -- trace back best path, count matches: print()
* pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
* dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
* nums() -- put out a number line: dumpblock()
* putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
* stars() -- put a line of stars: dumpblock()
* stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
*/

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */

```

【 0 1 2 3】

50



【 化 1 1 】

```
#define P_SPC 3      /* space between name or num and seq */
```

```
extern _day[26][26];
```

```
int olen;          /* set output line length */
```

```
FILE *fx;         /* output file */
```

```
print()
```

**print**

10

```
{
```

```
    int    lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */
```

```
    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
```

```
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
```

```
        cleanup(1);
```

```
    }
```

```
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
```

20

```
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
```

```
    olen = 60;
```

```
    lx = len0;
```

```
    ly = len1;
```

```
    firstgap = lastgap = 0;
```

```
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
```

```
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
```

```
        ly -= pp[0].spc;
```

30

```
    }
```

```
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
```

```
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
```

```
        lx -= pp[1].spc;
```

```
    }
```

```
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
```

```
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
```

```
        lx -= lastgap;
```

40

```
    }
```

```
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
```

```
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
```

```
        ly -= lastgap;
```

```
    }
```

```
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
```

【 0 1 2 4 】

50

【化 1 2】

```

    pr_align();
}

```

```

/*
* trace back the best path, count matches
*/

```

```

static

```

```

getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)

```

```

getmat

```

```

    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;     /* leading trailing overlap */

```

```

{

```

```

    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;

```

```

    char    outx[32];

```

```

    double    pct;

```

```

    register    n0, n1;

```

```

    register char *p0, *p1;

```

```

    /* get total matches, score

```

```

    */

```

```

    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;

```

```

    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;

```

```

    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;

```

```

    n0 = pp[1].spc + 1;

```

```

    n1 = pp[0].spc + 1;

```

```

    nm = 0;

```

```

    while ( *p0 && *p1 ) {

```

```

        if (siz0) {

```

```

            p1++;

```

```

            n1++;

```

```

            siz0--;

```

```

        }

```

```

        else if (siz1) {

```

```

            p0++;

```

【 0 1 2 5】

50

【化 1 3】

```

        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

```

10

20

```

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

30

40

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
...getmat
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}

```

【 0 1 2 6】

【化 1 4】

```

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DENS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static nm;          /* matches in core -- for checking */
static lmax;        /* lengths of stripped file names */
static ij[2];       /* jmp index for a path */
static nc[2];       /* number at start of current line */
static ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

```

/\*

\* print alignment of described in struct path pp[]

\*/

【 0 1 2 7】

【 化 1 5 】

**static****pr\_align()****pr\_align**

{

**int** nn; /\* char count \*/**int** more;**register** i;

10

**for** (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {

nn = stripname(nameX[i]);

**if** (nn > lmax)

lmax = nn;

nc[i] = 1;

ni[i] = 1;

siz[i] = ij[i] = 0;

ps[i] = seqX[i];

po[i] = out[i]; }

20

**for** (nm = nm = 0, more = 1; more;) {**...pr\_align****for** (i = more = 0; i < 2; i++) {

/\*

\* do we have more of this sequence?

\*/

**if** (!\*ps[i])**continue;**

more++;

**if** (pp[i].spc) { /\* leading space \*/

\*po[i]++ = ' ';

pp[i].spc--;

}

**else if** (siz[i]) { /\* in a gap \*/

\*po[i]++ = '-';

siz[i]--;

}

30

40

【 0 1 2 8 】

50

【化 1 6】

```

else {          /* we're putting a seq element
                */
    *po[i] = *ps[i];
    if (islower(*ps[i]))
        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
    po[i]++;
    ps[i]++;
    /*
     * are we at next gap for this seq?
     */
    if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
        /*
         * we need to merge all gaps
         * at this location
         */
        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
            siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
    }
    ni[i]++;
}
}
if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0;
}
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
dumpblock

```

【 0 1 2 9】

50

【 化 1 7 】

```

{
    register    i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

...dumpblock

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
{
    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
}

```

【 0 1 3 0 】

50

【化 1 8】

```

    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
    int ix;
{
    int i;
    register char *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ';'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
}

```

【 0 1 3 1】

50



【化 1 9】

```

    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

    /* these count from 1:
    * ni[] is current element (from 1)
    * nc[] is number at start of current line
    */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
* put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
*/
static
stars()
{
    int i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)

```

【 0 1 3 2】

50

【化 2 0】

```

        cx = '!';
    else
        cx = '!';
    }
    else
        cx = '!';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

10

20

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                stripname
{
    char *pn; /* file name (may be path) */
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

30

40

【 0 1 3 3】

【化 2 1】

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i) cleanup
    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len) getseq
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{

```

【 0 1 3 4】

50

【化 2 2】

```

char          line[1024], *pseq;
register char  *px, *py;
int           natgc, tlen;
FILE         *fp;

if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
    exit(1);
}
tlen = natgc = 0;
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++)
        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++;
}
if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
    exit(1);
}
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

...getseq

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))

```

【 0 1 3 5】

50

【化 2 3】

```

        *py++ = toupper(*px);
    if (index("ATGCU",*(py-1)))
        natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
char *msg;      /* program, calling routine */      20
int nx, sz;     /* number and size of elements */

{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
*/
readjmps()                                          readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

```

【 0 1 3 6 】

50

【化 2 4】

```

if (fj) {
    (void) fclose(fj);
    if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
        cleanup(1);
    }
}
for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
    while (1) {
        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
            ;

                                                    ...readjumps
        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
    }
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) {
        /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
    }
}

```

【0 1 3 7】

【化 2 5】

```

        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) {          /* gap in first seq */          10
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {          30
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)          40
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

【 0 1 3 8】

50

## 【化 2 6】

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
    int    ix;
{
    char    *mktemp();
    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

10

20

30

40

50

「ベクター」という用語は本明細書においては、自身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指す。1つの型のベクターは「プラスミド」であり、これは更に別のDNAセグメントがライゲーションされていてよい環状の2本鎖DNAループを指す。別の型のベクターはウィルスベクターであり、その場合更に別のDNAセグメントがウィルスゲノム内にライゲーションされていてよい。特定のベクターは自身が導入されている宿主細胞内において自己複製することができる（例えば複製の細菌起点を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば非エピソード哺乳類ベクター）は宿主細胞内への導入により宿主細胞のゲノム内に組み込まれることができ、これにより宿主細胞ゲノムとともに複製される。更にまた特定のベクターは自身が作動可能に連結されている遺伝子の発現を指向することができる。このようなベクターは本明細書においては、「組み換え発現ベクター」（又は単に「組み換えベクター」と称する。一般的に、組み換えDNA手法において利用される発現ベクターはプラスミドの形態である場合が多い。本明細書においては、「プラスミド」及び「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般的に使用されている形態であるため、互換的に使用してよい。

## 【0139】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」とは、本明細書においては、何れかの長さのヌクレオチドの重合体を指し、DNA及びRNAを包含する。ヌクレオチドはデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又は、その類縁体、又はDNA又はRNAポリメラーゼにより、又は合成反応により重合体に取り込まれることができる何れかの基質であることができる。ポリヌクレオチドは修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びその類縁体を含んでよい。存在する場合は、ヌクレオチド構造に対する修飾は重合体の組み立ての前又は後に付与してよい。ヌクレオチドの



配列は非ヌクレオチド成分により中断されていてよい。ポリヌクレオチドは合成後に更に例えば標識とのコンジュゲーションにより修飾されてよい。他の型の修飾は、例えば天然に存在するヌクレオチド1つ以上の類縁体による「キャップ」置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結による（例えばメチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カーバメート等）、及び、荷電連結（例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）によるもの、ペンダント部分を含有するもの、例えば蛋白（例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジン等）、インターカレーターを有するもの（例えばアクリジン、ソラレン等）、キレート形成剤を含有するもの（例えば金属、放射活性金属、ホウ素、酸化性金属等）、アルキル化剤を含有するもの、修飾された連結部を有するもの（例えばアルファ芳香族核酸等）、並びに、未修飾形態のポリヌクレオチドを包含する。更にまた、糖に通常存在するヒドロキシル基の何れかは、例えばホスホネート基、ホスフェート基により置き換えられているか、標準的な保護基により保護されているか、又は、別のヌクレオチドへの追加的連結部を作成するために活性化されていてよく、或いは、固体又は半固体の支持体にコンジュゲートされていてよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化されるか、又は、アミン又は炭素原子1~20個の有機キャッピング基部分により置換されていることができる。他のヒドロキシルはまた標準的保護基に誘導体化されていてよい。ポリヌクレオチドはまた当該分野で一般的に知られたリボース又はデオキシリボース糖の類縁体形態、例えば2'-O-メチル-、2'-O-アシル、2'-フルオロ-又は2'-アジド-リボース、炭素環糖類縁体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース又はリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環状類縁体及び非塩基性類縁体、例えばメチルリボシドを含有してよい。1つ以上のホスホジエステル連結部が別の連結基により置き換えられていてよい。これらの代替的連結基は、例えばホスフェートがP(O)S(チオエート)、P(S)S(ジチオエート)、(O)NR<sub>2</sub>(アミデート)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH<sub>2</sub>(ホルムアセタール)で置き換えられている実施形態を包含し、ここで各R又はR'は独立して、H又は場合によりエーテル(-O-)結合を含有する置換又は未置換のアルキル(1~20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルキルである。ポリヌクレオチド中の全連結部が同一である必要はない。前記はRNA及びDNAを包含する本明細書に記載する全てのポリヌクレオチドに適用する。

10

20

30

#### 【0140】

「オリゴヌクレオチド」とは本明細書においては、必然ではないが一般的に約200ヌクレオチド長未満の短鎖の一般的には1本鎖の一般的には合成されたポリヌクレオチドを一般的に指す。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」という用語は相互に排他的ではない。ポリヌクレオチドに関して上記したものは等しく、そして完全にオリゴヌクレオチドに適用できる。

#### 【0141】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は最も広範な意味において互換的に使用され、そしてモノクローナル抗体（例えば完全長又は未損傷のモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性抗体（例えば所望の生物学的活性を示す限りにおいて二重特異性抗体）を包含し、そして特定の抗体フラグメント（本明細書においてより詳述する）も包含してよい。抗体はヒト、ヒト化及び/又は親和性成熟のものであることができる。

40

#### 【0142】

「抗体フラグメント」は未損傷の抗体の一部分のみを含み、その部分は好ましくは未損傷の抗体中に存在する場合にその部分に通常関わる機能の少なくとも1つ、好ましくは大部分又は全てを保持している。1つの実施形態において、抗体フラグメントは未損傷の抗体の抗原結合部位を含み、そしてこれにより、抗原に結合する能力を保持している。別の実施形態においては、抗体フラグメント、例えばFc領域を含むものは、未損傷の抗体中に存在する場合にFc領域に通常関わる生物学的機能、例えばFcRn結合、抗体半減期

50

調節、A D C C 機能及び補体結合等の少なくとも1つを保持する。1つの実施形態において、抗体フラグメントは未損傷の抗体と実質的に同様のインビボ半減期を有する1価の抗体である。例えばそのような抗体フラグメントはフラグメントにインビボ安定性を付与することができるFc配列に連結した結合アームを抗原上に含んでよい。

#### 【0143】

「モノクローナル抗体」という用語は本明細書においては、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、即ち、集団を構成する個々の抗体は少量において存在する可能性のある可能な天然に存在する突然変異を除き、同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原に対して指向されている。更に又、種々の決定基(エピトープ)に対して指向されている種々の抗体を典型的には包含するポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向されている。

10

#### 【0144】

本明細書に記載するモノクローナル抗体は特に、重鎖及び/又は軽鎖は特定の種に由来するか、特定の抗体のクラス又はサブクラスに属する抗体内の相当する配列に同一又は相同であるが、鎖の残余部分は、別の種に由来するか、別の抗体のクラス又はサブクラスに属する抗体内の相当する配列に同一又は相同である「キメラ」抗体、並びにそのような抗体のフラグメントを、それらが所望の生物学的活性を示す限り、包含する(米国特許4,816,567;及びMorrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855(1984))。

#### 【0145】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形態は非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有するキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域に由来する残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような非ヒト種(レシピエント抗体)の超可変領域由来の残基により置き換えられているヒト免疫グロブリンである(レシピエント抗体)。一部の例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)の残基は相当する非ヒト残基により置き換えられている。更に又、ヒト化抗体はレシピエント抗体内にもドナー抗体内にも存在しない残基を含んでよい。このような修飾は抗体の性能を更に精鋭化させるために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのそれに相当し、そしてFRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のそれである少なくとも1つ、そして典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになる。ヒト化抗体は場合により、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリンの定常領域(Fc)の少なくとも一部分を含むことになる。詳細についてはJonesら、Nature 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature 332:323-329(1988);及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)を参照できる。更に又以下の文献: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115(1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038(1995); Hurler and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433(1994)及びそこに引用されている参考文献を参照できる。

20

30

40

#### 【0146】

「抗原」は抗体が選択的に結合する所定の抗原である。標的抗原はポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン又は他の天然に存在する又は合成の化合物であってよい。好ましくは、標的抗原はポリペプチドである。「アクセプターヒトフレームワーク」とは、本明細書の目的のためには、ヒト免疫グロブリンフレームワークから、又は、ヒトコンセンサスフレームワークから誘導されたVL又はVHフレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から誘導された」アクセプターヒトフレームワークはそれと同じアミノ酸配列を含んでよく、又は、既存のアミノ酸配列の変化を含有してよい。既存のアミノ酸変

50

化が存在する場合は、好ましくは5以下、好ましくは4以下又は3以下の既存のアミノ酸変化が存在する。既存のアミノ酸変化がVHに存在する場合は、好ましくはそのような変化は71H、73Hおよび78H位のわずか3、2又は1つにのみあり；例えば、そのような位置にあるアミノ酸残基は71A、73Tおよび78Aであってよい。1つの実施形態において、VLアクセプターヒトフレームワークは配列においてVLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に同一である。

【0147】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は一部のヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列において最も一般的に存在するアミノ酸残基を示すフレームワークである。一般的にその一部のヒト免疫グロブリンVL又はVH配列は可変ドメイン配列のサブグループに由来する。一般的に配列のサブグループはKabatra、のサブグループである。1つの実施形態において、VLについては、サブグループはKabatra、の場合のようにサブグループカッパIである。1つの実施形態において、VHについては、サブグループはKabatra、の場合のようにサブグループIIIである。

10

【0148】

「VLサブグループIコンセンサスフレームワーク」はKabatra、の可変軽鎖カッパサブグループIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含む。1つの実施形態において、VLサブグループIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は以下の配列：

【0149】

【化27】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (配列番号 34)-L1-WYQQKPGKAPKLLI (配列番号 35)-

L2-GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (配列番号 36)-L3-FGQGTKVEIKR (

配列番号37)

の各々の少なくとも一部分又は全てを含む。

【0150】

「VHサブグループIコンセンサスフレームワーク」はKabatra、の可変重鎖サブグループIIIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含む。1つの実施形態において、VHサブグループIIIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は以下の配列：

30

【0151】

【化28】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号 38)-H1-

WVRQAPGKGLEWV (配列番号 39)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA

(配列番号 40)-H3-WGQGTLVTVSS (配列番号 41).

の各々の少なくとも一部分又は全てを含む。

【0152】

「未修飾のヒトフレームワーク」はアクセプターヒトフレームワークと同じアミノ酸配列を有するヒトフレームワークであり、例えばアクセプターヒトフレームワークにおけるヒトから非ヒトへのアミノ酸置換を有さないものである。

40

【0153】

「改変された超可変領域」とは本発明の目的のためには、1つ以上(例えば1~約16)のアミノ酸置換をそこに含む超可変領域である。

【0154】

「未修飾超可変領域」とは本発明の目的のためには、誘導元の非ヒト抗体と同じアミノ酸配列を有する超可変領域であり、即ち1つ以上のアミノ酸置換をそこに含まないものである。

【0155】

50

「超可変領域」、「HVR」又は「HV」という用語は、本明細書においては、配列内で超可変であり、及び/又は、構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般的に、抗体は6超可変領域；3つをVH(H1、H2、H3)内に、そして3つをVL(L1、L2、L3)内に含む。多くの超可変領域の定義が使用されており、本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域(CDR)は配列の可変性に基づいており、そして、最も一般的に使用されている(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは代わりに構造ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbMの超可変領域はKabatのCDRとChothiaの構造ループの間の折衷を示し、そしてOxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアにより使用されている。「接触」超可変領域は使用可能な複合体結晶構造の分析に基づいている。これらの超可変領域の各々に由来する残基を以下に示す。

【0156】

【表1】

表 1

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 Kabat ナンバリング	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1 Chothia ナンバリング	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

超可変領域は以下の通り、即ち：VL内の24-36又は24-34(L1)、46-56又は49-56又は50-56又は52-56(L2)及び89-97(L3)、及びVH内の26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102又は95-102(H3)の「伸長超可変領域」を含んでよい。可変ドメイン残基はこれらの定義の各々につき上記Kabat等の定義に従ってナンバリングされている。

【0157】

「フレームワーク」又は「FR」残基とは、本明細書において定義する超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0158】

「ヒト抗体」はヒトにより生産される抗体に相当するか、及び/又は、本明細書に開示するヒト抗体を製造するための手法の何れかを用いて作成されたアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は特に非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

【0159】

「親和性成熟」抗体は、1つ以上の改変をそのCDR1つ以上内に有するものであり、

これによりそのような改変を保有しない親抗体と比較して抗原に対する抗体の親和性が向上しているものである。好ましい親和性成熟抗体は標的抗原に対してナノモル、或いは更にピコモルレベルの親和性を有することになる。親和性成熟抗体は当該分野で知られた操作法により製造される。Marksら、Bio/Technology 10:779-783(1992)はVH及びVLドメインシャフリングによる親和性成熟を記載している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発はBarbasら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813(1994); Schierら、Gene 169:147-155(1995); Yeltonら、J. Immunol. 155:1994-2004(1995); Jacksonら、J. Immunol. 154(7):3310-9(1995); 及びHawkinsら、, J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)により記載されている。

10

## 【0160】

「ブロック」抗体又は「拮抗剤」抗体はそれが結合する抗原の生物学的活性を阻害又は低減するものである。好ましいブロック抗体又は拮抗剤抗体は抗原の生物学的活性を実質的又は完全に阻害する。

## 【0161】

「アゴニスト抗体」とは本明細書においては、目的のポリペプチドの機能的活性の少なくとも1つを模倣する抗体である。

## 【0162】

「障害」とは本発明の物質/分子又は方法による治療から利益を被る何れかの状態である。これには問題となる障害に哺乳類を罹患し易くしている病理学的状態を包含する慢性及び急性の障害又は疾患が包含される。本明細書において治療されるべき障害の非限定的な例は、悪性又は良性の腫瘍；非白血病性及びリンパ球性の悪性疾患；ニューロン、神経膠、星状細胞、視床下部及び他の腺、マクロファージ、上皮、間質性及び胞胚腔の障害；及び炎症性、免疫学的及び他の血管形成関連の障害を包含する。

20

## 【0163】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳類の免疫系の要素が哺乳類における罹病を誘発、媒介又は他の態様において寄与するような疾患を意味する。同様に包含されるものは免疫応答の刺激又は介入が疾患の進行に対して寛解作用を有するような疾患である。この用語に包含されるものは免疫媒介炎症性疾患、非免疫媒介炎症性疾患、感染性疾患、免疫不全疾患、新生物形成等である。

30

## 【0164】

本発明に従って治療することができる部分的に免疫又はT細胞媒介である免疫関連及び炎症性疾患の例は、全身エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節炎、脊椎関節障害、全身硬化症（硬皮症）、特発性炎症性ミオパシー（皮膚筋炎、多発性筋炎）シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少、発作性夜間血色素尿症）、自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症）、甲状腺炎（グレーブス病、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、申請糖尿病、免疫媒介腎疾患（糸球体腎炎、尿管間質性腎炎）、中枢及び末梢神経系の脱髄性疾患、例えば多発性硬化症、特発性脱髄性多発性神経障害又はギヤンパレー症候群及び慢性脱髄性多発性神経障害、肝胆疾患、例えば感染性肝炎（A、B、C、D、E型肝炎及び他の非肝臓親和性のウイルス）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫症及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性結腸炎；クローン病）、グルテン感受性腸症及びホウイップル病、自己免疫又は免疫媒介性の皮膚疾患、例えば水疱性皮膚疾患、多発性紅斑及び接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫学的疾患、例えば好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、移植関連の疾患、例えば移植片拒絶及び対宿主性移植片病、感染性疾患、例えばウイルス製疾患、例えばAIDS（HIV感染）、A、B、C、D及びE型肝炎等、細菌感染症、カビ感染症、原虫感染症及び寄生虫感染症を包含する。

40

50

## 【0165】

本明細書においては互換的に使用される「自己免疫障害」又は「自己免疫疾患」とは、個体自身の組織から生じる、及び、これに対して指向される、非悪性の疾患又は障害である。本明細書に記載する自己免疫疾患は特に悪性又は癌性の疾患又は状態を除外し、特にB細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、ヘアリー細胞白血病及び慢性骨髄芽球性白血病を除外する。自己免疫疾患又は障害の例は炎症性応答、例えば炎症性皮膚疾患、例えば感染及び皮膚炎（例えばアトピー性皮膚炎）；全身硬皮症及び硬化症；炎症性腸疾患に関わる応答（例えばクローン病及び潰瘍性結腸炎）；呼吸窮迫症候群（例えば成人呼吸窮迫症候群、ARDS）；痴呆症；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；結腸炎；糸球体腎炎；アレルギー性状態、例えば湿疹及び喘息及び他のT細胞浸潤関与の状態及び慢性炎症性応答；アテローム性動脈硬化症；白血球接着不全；慢性関節リウマチ；全身エリテマトーデス（SLE）；真性糖尿病（例えばI型糖尿病又はインスリン依存性真性糖尿病）；多発性硬化症；レイノー症候群；自己免疫性甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェーグレン症候群；早発性糖尿病；及び典型的には結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症及び血管炎において観察されるサイトカイン及びTリンパ球により媒介される急性及び遅発性の過敏症に関連する免疫応答；悪性貧血（アディソン病）；白血球漏出の関わる疾患；中枢神経系（CNS）炎症性障害；多臓器傷害症候群；溶血性貧血（例えばクリオグロブリン血又はクームス陽性貧血）；重症筋無力症；抗原-抗体複合体媒介疾患；抗糸球体既定膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブス病；ランバート イートン筋衰弱症候群；類天疱瘡水疱；天疱瘡；自己免疫性多発性内分泌腺症；ライター病；スティッフマン症候群；ベーチェット病；巨細胞性動脈炎；免疫複合体腎炎；IgA腎症；IgM多発性神経障害；免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）又は自己免疫性血小板減少症等を包含する。

10

20

## 【0166】

「胃腸炎症傷害」という用語は炎症及び/又は潰瘍を粘膜に誘発する一群の慢性障害である。用語はそのまま、炎症性腸疾患（例えばクローン病、潰瘍性結腸炎、分類不能大腸炎及び感染性結腸炎）、粘膜炎（例えば口腔粘膜炎、胃腸粘膜炎、鼻粘膜炎及び直腸炎）、壊死性腸炎及び食道炎を包含する。

## 【0167】

「細胞増殖性障害」及び「増殖性障害」という用語はある程度の異常な細胞増殖を伴う障害を指す。1つの実施形態において、細胞増殖性障害は癌である。

30

## 【0168】

「腫瘍」とは、本明細書においては、悪性又は良性に関わらず全ての新生物性の細胞の成育及び全ての前癌性および癌性の細胞及び組織を指す。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」及び「腫瘍」は本明細書において言及する限り相互に排除されない。

## 【0169】

「癌」及び「癌性」という用語は典型的には調節できない細胞の成育/増殖を特徴とする哺乳類における生理学的状態を指すか描写するものである。癌の例は、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫及び白血病を包含する。このような癌のより特定の例は、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫瘍、頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は至急の癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌腫及び種々の型の頭部及び頸部の癌を包含する。

40

## 【0170】

血管形成の調節異常は、多くの障害をもたらし得、これらは本発明の組成物及び方法により治療できる。これらの障害は非新生物性及び新生物性の状態の両方を包含する。新生物は例えば上記したものを包含する。非新生物性の障害は例えば望ましくない、又は、異常な肥大、関節炎、慢性関節リウマチ（RA）、乾癬、乾癬性プラーク、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、アテローム性動脈硬化性プラーク、糖尿病性及び他の増

50

殖性の網膜症、例えば未熟児網膜症、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢関連黄斑変性、糖尿病性斑状浮腫、角膜血管新生、角膜グラフト血管新生、角膜グラフト拒絶、網膜/脈絡膜血管新生、角の血管新生(皮膚紅潮)、眼の血管新生性疾患、血管再狭窄、動脈静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管腺腫、甲状腺肥大(グレーブス病を含む)、角膜及び他の組織の移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺傷害/ARDS、敗血症、一次肺高血圧症、悪性肺滲出、脳水腫(例えば急性卒中/閉鎖性頭部傷害/外傷に関連)、滑膜炎症、RAにおけるパンヌス形成、骨化性筋炎、肥大性骨形成、骨関節炎(OA)、難治性腹水、多嚢胞性卵巣症、子宮内膜炎、体液サードスペース疾患(膵炎、コンパートメント症候群、熱傷、腸疾患)、子宮線維症、早産、慢性炎症、例えばIBD(クローン病及び潰瘍性結腸炎)、腎臓同種移植片拒絶、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、望ましくない、又は、異常な組織増大(非癌)、血友病性関節、肥大癍痕、毛髪増殖阻害、オースラー ウェーバー症候群、化膿性肉芽腫、水晶体後線維増殖、硬皮症、トラコーマ、血管接着、滑膜炎、皮膚炎、子癩前症、腹水、心内膜液浸出(例えば心内膜炎に関連するもの)及び胸水を包含する。

10

20

30

40

50

#### 【0171】

本明細書においては、「治療」とは治療すべき個体又は細胞の本来の過程を改変させる試みにおける臨床介入を指し、予防的に、又は臨床病理過程の間の何れかに実施できる。治療の望ましい作用は、疾患の発症又は再発の防止、症状の寛解、何れかの直接又は間接的な疾患帰結の軽減、転移の防止、疾患進行速度の低減、疾患状況の緩和又は沈静化、及び、予後の軽快又は改善を包含する。一部の実施形態においては、本発明の抗体は疾患又は障害の発症を遅延するために使用される。

#### 【0172】

「有効量」とは所望の治療又は予防上の結果を達成するために、必要な用量及び時間において、有効である量を指す。

#### 【0173】

本発明の物質/分子、アゴニスト又は拮抗剤の「治療有効量」は個体の疾患状況、年齢、性別及び体重、及び、物質/分子、アゴニスト又は拮抗剤が個体において所望の応答を誘発する能力のような要因に従って変動する。治療有効量は又、物質/分子、アゴニスト又は拮抗剤の何れかの毒性又は有害な作用よりも治療上有益な作用が勝っているものである。「予防有効量」は所望の予防結果を達成するために、必要な用量及び時間において、有効である量を指す。必然ではないが典型的には、予防用量は疾患の前又は早期の段階において被験体において使用されるため、予防有効量は治療有効量よりも低値となる。

#### 【0174】

「細胞毒性剤」という用語は本明細書においては、細胞の機能を阻害又は防止、及び/又は細胞の破壊を誘発する物質を指す。用語は放射性同位体(例えば $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 及び $Lu$ の放射性同位体)、化学療法剤、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド(ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシン又は他のインタカレーション剤、酵素及びそのフラグメント、例えば核溶解酵素、抗生物質及び毒素、例えば小分子毒素又は細菌、カビ、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素並びにそのフラグメント及び/又は変異体、及び、以下に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を包含する。他の細胞毒性剤は以下に記載する。殺腫瘍性の薬剤は腫瘍細胞の破壊を誘発する。

#### 【0175】

「化学療法剤」とは癌の治療において有用な化学物質である。化学療法剤の例はアルキル化剤類、例えばチオテパ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミド;アルキルスルホネート類、例えばブスルファン、イムプロスルファン及びピボスルファン;アジリジン類、例えばベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ及びウレドパ;エチレンイミン類及びメチラメラミン類、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホアミド、トリエチレンチオホスホアミド及びトリメチロールオメラミン;アセトゲニ

ン類（特にブラタシン及びブラタシノン）；デルタ - 9 - テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；ベータ - ラバコン；ラバコール；コルヒチン類；ベツリン酸；カンプトテシン（例えば合成類縁体トポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT - 11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン及び9 - アミノカンプトテシン）；プリオスタチン；カリスタチン；CC - 1065（例えばアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成類縁体）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テミボシド；クリプトフィシン類（特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（例えば合成類縁体、KW - 2189及びCB1 - TM1）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；窒素マスタード類、例えばクロランブシル、クロマファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素類、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムヌスチン；抗生物質、例えばエネジン抗生物質（例えばカリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマII及びカリケアマイシオメガII（例えばAgnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183 - 186 (1994)参照）；ジネマイシン、例えばジネマイシンA；クスペラマイシン；並びにネオカルジノスタチン発色団及び関連の色素蛋白エネジン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オーソラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登録商標）ドキシソルピシン（例えばモルホリノドキシソルピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシン及びデオキシドキシソルピシン）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン類、例えばマイトマイシンC、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5 - フルオロウラシル（5 - FU）；葉酸類縁体、例えばデノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセート；プリン類縁体、例えばフルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類縁体、例えばアンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、デキシフルリジン、エノシタピン、フロクスリジン；アンドロゲン類、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗アドレナル類、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補給剤、例えばフロリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノエプリン酸；エニルラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトラキセート；デホファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルホミチン；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシノイド類、例えばマイタンシン及びアンサミトシン類；マイトグアゾン；マイトキサトロン；モビダンモル；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメト；ピアルピシン；ロソキサントロン；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖類複合体（JHS Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキササン；リゾキシシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT - 2毒素、ベラクリンA、ロリジンA及びアングエイジン）；ウレタン；ピンデシン（ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；マイトプロニトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara - C」）；チオテパ；タキソイド類、例えばTAXOL（登録商標）パクリタキセル（Bristol - Myers Squibb Oncology

10

20

30

40

50



, Princeton, NJ)、ABRAXANE<sup>TM</sup> Cremophor - 非含有、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) 及び TAXOTERE (登録商標) ドキセタキセル (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); クロランブシル; ゲムシタピン (GEMZAR (登録商標)); 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキセート; 白金類縁体、例えばシスプラチン及びカルボプラチン; ビンブラスチン (VELBAN (登録商標)); 白金; エトポシド (VP-16); イソフォスファミド; マイトキサントロン; ピンクリスチン (ONCOVIN (登録商標)); オキサリプラチン; ロイコポピン; ビノレルピン (NAVELBINE (登録商標)); ノヴァントロン; エダトレキセート; ダウノマイシン; アミノプテリン; イバンドロネート; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000; ジフルオロメチロルニチン (DMFO); レチノイド類、例えばレチン酸; カペシタラビン (XELODA (登録商標)); 上記物質の何れかの製薬上許容しうる塩、酸又は誘導体; 並びに上記物質の二者以上の組み合わせ、例えば CHOP、即ちシクロホスファミド、ドキソルピシン、ピンクリスチン及びプレドニソロンの複合療法の略称、及び FOLFOX、即ち 5-FU 及びロイコポピンと組み合わせたオキサリプラチン (ELOXATIN<sup>TM</sup>) を用いた治療用法の略称等、を包含する。

10

#### 【0176】

この定義に同様に包含されるものは癌の生育を促進することが可能であるホルモンの作用を調節、低減、ブロック又は阻害する作用を有し、そして、全身投与又は身体全体投与の形態となる場合が多い抗ホルモン剤である。それらはそれら自体がホルモンであってよい。例示されるものは、抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM)、例えばタモキシフェン (例えば NOLVADEX (登録商標) タモキシフェン)、EVIISTA (登録商標) ラロキシフェン、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン及び FARESTON (登録商標) トレミフェン; 抗プロゲステロン類; エストロゲン受容体ダウンレギュレート剤 (ERD); 卵巣を阻害又はシャットダウンする機能を有する薬剤、例えば黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニスト、例えば LUPRON (登録商標) 及び ELIGARD (登録商標) 酢酸ロイプロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン; 他の抗アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びピカルタミド; 及び副腎におけるエストロゲン生産を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば 4(5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、MEGASE (登録商標) 酢酸メゲステロール、AROMASIN (登録商標) エキセメスタン、ホルメスタニー、ファドゾロール、RIVISOR (登録商標) ポロゾール、FEMARA (登録商標) レトロゾール及び ARIMIDEX (登録商標) アラストロゾールを包含する。更に又、化学療法剤のこのような定義にはビスホスホネート類、例えばクロドロネート (例えば BONEFOS (登録商標) 又は OSTAC (登録商標))、DIDROCAL (登録商標) エチドロネート、NE-58095、ZOMETHA (登録商標) ゴレドロン酸/ゴレドロンネート、FOSAMAX (登録商標) アレンドロネート、AREDIA (登録商標) パミドロネート、SKELID (登録商標) チルドロネート又は ACTONEL (登録商標) リセドロネート; 並びにトロキサシタピン (1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類縁体); アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えば PKC-アルファ、Raf、H-Ras 及び表皮成長因子受容体 (EGF-R) のような異常な細胞増殖に關与するとされるシグナリング経路内の遺伝子の発現を阻害するもの; ワクチン類、例えば THERATOPE (登録商標) ワクチン及び遺伝子療法ワクチン類、例えば ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン及び VAXID (登録商標) ワクチン; LURTOTECAN (登録商標) トポイソメラーゼ 1 阻害剤; ABARELIX (登録商標) rmRH; ラパチニブジトシレート (Erbb-2 及び EGFR 二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤、別名 GW572016); 及び上記物質の何れかの製薬上許容しうる塩、酸又は誘導体も包含される。

20

30

40

50

## 【0177】

「生育阻害剤」とは、本明細書において使用する場合は、インビトロ又はインビボのいずれかにおいてその生育がベータ7活性化に依存している細胞の成育を阻害する化合物又は組成物を指す。即ち、生育阻害剤はS期におけるベータ7依存性細胞のパーセンテージを実質的に低減するものであってよい。生育阻害剤の例は細胞周期の進行を（S期以外の位置において）ブロックする薬剤、例えばG1停止及びM期停止を誘導する薬剤を包含する。伝統的なM期ブロッカーはビンカ類（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン類及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシンエトポシド及びプレオマイシンを包含する。G1を停止させる薬剤はまたS期停止にまで作用を派生させるものがあり、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル及びara-Cが挙げられる。更に詳細な説明はThe Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1の表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drug」、Murakamiら、(WB Saunders: Philadelphia, 1995), p. 13に記載されている。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は共にイチイの木から誘導される抗癌剤である。ヨーロッパイチイから誘導されたドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer）はパクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成類縁体である。パクリタキセル及びドセタキセルはチューブリン2量体からの微小管の組み立てを促進し、そして脱重合を防止することにより微小管を安定化させ、これが細胞における有糸分裂を阻害する。

10

20

## 【0178】

「ドキソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビシンの完全な化学名は(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオンである。

30

## 【0179】

本発明の拮抗剤抗ベータ7抗体を用いた複合療法に用いられる化合物は、抗体（例えば他の抗ベータ7拮抗剤抗体（Fib21、22、27、30、(Tidswell, M. (1997)上出）又はそのヒト化誘導体）、抗4抗体（例えばANTEGEN（登録商標））、抗TNF（REMICADE（登録商標））又は非蛋白化合物、例えば5-ASA化合物ASACOL（登録商標）、PENTASA<sup>TM</sup>、ROWASA<sup>TM</sup>、COLAZAL<sup>TM</sup>及び他の化合物、例えばPurinethol及びステロイド、例えばプレドニソンを包含する。ある実施形態においては、本発明は本発明の拮抗剤抗ベータ7抗体の単独、又は、炎症の治療の同じく有用である第2の化合物との組み合わせによる、ヒト患者のような患者を治療する方法を包含する。1つの実施形態において、第2の化合物はFib21、22、27、30又はそのヒト化誘導体）、抗アルファ4抗体、ANTEGEN（登録商標）、抗TNF、REMICADE（登録商標）、5-ASA化合物、ASACOL（登録商標）、PENTASA<sup>TM</sup>、ROWASA<sup>TM</sup>、COLAZAL<sup>TM</sup>、Purinethol及びステロイド及びプレドニソンからなる群より選択される。本発明の1つの実施形態において、本発明の拮抗剤抗ベータ7抗体の投与は第2の化合物の用量を実質的に低減する。1つの実施形態において、第2の薬剤の用量における上記低減は少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%である。本発明の1つの実施形態において、本発明の抗体及び第2の化合物の低減された用量の組み合わせは第2の化合物単独の投与と実質的に同か更に良好な程度にまで患者における症状を寛解する。

40

50

## 【0180】

(HAMA 応答を低減又は消失させる変異体抗体の作成)

HAMA (ヒト抗マウス (ヒト抗ラット又はヒト抗ヒトにも適用) 応答の低減又は消失は適当な治療薬の臨床開発の重要な側面である。例えば Khaxzaeliら、J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffersら、Transplantation (1986), 41:572; Shawlerら、J. Immunol. (1985), 135:1530; Searsら、J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Millerら、Blood (1983), 62:988; Hakimira、J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmannら、Nature (1988), 332:323; Jung Hansら、Cancer Res. (1990), 50:1495を参照できる。本明細書に記載する通り、本発明はHAMA 応答が低減又は消失するようにヒト化された抗体を提供する。これらの抗体の変異体もまた一部は後に詳述する当該分野で知られた日常的方法を用いて得ることができる。

10

## 【0181】

例えば本明細書に記載した抗体に由来するアミノ酸配列はフレームワーク及び/又は超可変配列の多様化のための出発 (親) 配列として機能できる。出発超可変配列が連結する選択されたフレームワーク配列は本明細書においてはアクセプターヒトフレームワークと称する。アクセプターヒトフレームワークはヒト免疫グロブリン (そのVL及び/又はVH領域) 由来であるかこれから誘導してよいが、好ましくはアクセプターヒトフレームワークはヒトコンセンサスフレームワーク由来であるかこれから誘導され、その理由はそのようなフレームワークはヒト患者における免疫原性が最小限又は皆無であることがわかっているためである。

20

## 【0182】

アクセプターがヒト免疫グロブリンから誘導される場合は、場合により、ヒトフレームワーク配列のコレクション中の種々のヒトフレームワーク配列にドナーフレームワーク配列をアラインさせることによりドナーフレームワーク配列への自身の相同性に基づいて選択されたヒトフレームワーク配列を選択し、そして、アクセプターとして最も相同性の高いフレームワーク配列を選択してよい。

30

## 【0183】

1つの実施形態において、ヒトコンセンサスフレームワークは本明細書においては、VHサブグループIII及び/又はVLカッパサブグループIコンセンサスフレームワーク配列由来であるか、又は、それより誘導される。

## 【0184】

即ち、VHアクセプターヒトフレームワークは以下：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号38) を含むFR1、  
WVRQAPGKGLEWV (配列番号39) を含むFR2、

RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLR AEDTAVYYCA (配列番号42) を含むF34、個々でX1はA又はR、X2はT又はN、そしてX3はA、L又はF

40

WGQGTLVTVSS (配列番号41) を含むFR4、

のフレームワーク配列の1つ、2つ、3つ又は全てを含んでよい。

VHコンセンサスフレームワークの例は、下記：

ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワークマイナスKabata CDR (配列番号19)；

ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号20-22)；

ヒトVHサブグループIIコンセンサスフレームワークマイナスKabata CDR (配列番号48)；

ヒトVHサブグループIIコンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番

50

号49-51) ; ヒトVHサブグループIIIコンセンサスフレームワークマイナスKabab CDR (配列番号52) ;

ヒトVHサブグループIIIコンセンサスフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号53-55) ;

ヒトVHアクセプターフレームワークマイナスKabab CDR (配列番号56) ;

ヒトVHアクセプターフレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号57-58) ;

ヒトVHアクセプター2フレームワークマイナスKabab CDR (配列番号59) ;

又は

ヒトVHアクセプター2フレームワークマイナス伸長超可変領域 (配列番号60-62) を包含する。

10

#### 【0185】

1つの実施形態において、VHアクセプターヒトフレームワークは以下：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (配列番号38) を含むFR1、

WVRQAPGKGLEWV (配列番号39) を含むFR2、

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (配列番号43)、

RFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (配列番号44) を含むFR3、

RFTISRDTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCA (配列番号45)、

RFTISADTSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCA (配列番号46)、

WGQGTLLVTVSS (配列番号41) を含むFR4、

20

のフレームワーク配列の1つ、2つ、3つ又は全てを含んでよい。

#### 【0186】

VLアクセプターヒトフレームワークは以下：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (配列番号34) を含むFR1、

WYQQKPKAPKLLI (配列番号35) を含むFR2、

GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号36) を含むFR3、

FGQGTKVEIKR (配列番号37) を含むFR4、

のフレームワーク配列の1つ、2つ、3つ又は全てを含んでよい。

VLコンセンサスフレームワークの例は、下記：

30

ヒトVLカッパサブグループIコンセンサスフレームワーク (配列番号14) ;

ヒトVLカッパサブグループIコンセンサスフレームワーク (伸長HVR-L2) (配列番号15) ;

ヒトVLカッパサブグループIIIコンセンサスフレームワーク (配列番号16) ;

ヒトVLカッパサブグループIIIコンセンサスフレームワーク (配列番号17) ; 又は、

ヒトVLカッパサブグループIVコンセンサスフレームワーク (配列番号18)、

を包含する。

#### 【0187】

アクセプターは配列において選択されたヒトフレームワーク配列に同一であってもよいが、それがヒト免疫グロブリン又はヒトコンセンサスフレームワーク由来であるかについては、本発明は、ヒト免疫グロブリン配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と相対比較した場合の既存のアミノ酸の置換をアクセプター配列が含んでいてよいことを意図している。これらの既存の置換は好ましくは最小限；通常はヒト免疫グロブリン配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と相対比較して4、3、2又は1アミノ酸置換の相違のみである。

40

#### 【0188】

非ヒト抗体の超可変領域残基はVL及び/又はVHアクセプターヒトフレームワーク内に取り込まれる。例えば、Kabab CDR残基、Chothia超可変ループ残基。Abm残基及び/又は接触残基に相当する残基を取り込んでよい。或いは、伸長超可変領

50

域残基、24 - 34 (L1)、49 - 56 (L2) 及び 89 - 97 (L3)、26 - 35 (H1)、50 - 65 又は 49 - 65 (H2) 及び 93 - 102、94 - 102 又は 95 - 102 (H3) も取り込まれる。

#### 【0189】

超可変領域残基の「取り込み」を本明細書において論じるが、当然ながらこれは種々の方法で達成することができ、例えば、所望のアミノ酸配列をコードする核酸は、自身のフレームワーク領域がアクセプターヒトフレームワーク領域に変化するようにマウス可変ドメイン配列をコードする核酸を突然変異させることによるか、又は、超可変ドメインの残基が非ヒト残基に変化するようにヒト可変ドメイン配列をコードする核酸を突然変異させることによるか、又は、所望の配列をコードする核酸を合成することによる等して作成することができる。

10

#### 【0190】

本明細書の例においては、超可変領域グラフト変異体は各超可変領域に対する別個のオリゴヌクレオチドを用いながら、ヒトアクセプター配列をコードする核酸の Kunkel 突然変異誘発により作成した。Kunkelら、Methods Enzymol. 154: 367 - 382 (1987)。適切な変化は適切な超可変領域抗原相互作用を補正して再構築するための日常的な手法を用いてフレームワーク及び/又は超可変領域内に導入することができる。

#### 【0191】

ファージ(ミド)ディスプレイ(本明細書においては一部の観点においてファージディスプレイと称する)は、配列無作為化により作成されたライブラリ内に多くの異なる潜在的変異体抗体を作成し、そして、スクリーニングするための好都合で迅速な方法として使用できる。しかしながら、改変された抗体を作成してスクリーニングするための他の方法も当業者は使用できる。

20

#### 【0192】

ファージ(ミド)ディスプレイの技術は抗原のようなリガンドに結合する新規な蛋白を作成し、そして選択するための強力な手段を提供している。ファージ(ミド)ディスプレイの技術を用いることにより、高い親和性を有する標的分子に結合する配列を発見するために急速にソーティングすることができる蛋白変異体の大型ライブラリの作成が可能になる。変異体ポリペプチドをコードする核酸は一般的に、遺伝子 III 蛋白又は遺伝子 VII 蛋白のようなウイルス被膜蛋白をコードする核酸に融合される。蛋白又はポリペプチドをコードする核酸配列が遺伝子 III 蛋白の一部をコードする核酸配列に融合されている1価のファージミドディスプレイが開発されている(Bass, S., Proteins, 8: 309 (1990); Lowman and Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3: 205 (1991))。1価のファージミドディスプレイ系においては、遺伝子融合は低水準で発現され、そして野生型の遺伝子 III 蛋白はもまた粒子の感染性が保持されるように発現される。ペプチドライブラリを作成し、そのライブラリをスクリーニングする方法は多くの特許において開示されている(例えば米国特許 5,723,286、米国特許 5,432,018、5,580,717 ウィルス被膜蛋白をコードする核酸、例えば 5,427,908 及び米国特許 5,498,530)。

30

40

#### 【0193】

抗体又は抗原結合ポリペプチドのライブラリは無作為 DNA 配列の挿入による単一遺伝子の改変によるか、又は、関連遺伝子のファミリーのクローニングによるなど、多くの方法において作成されている。ファージ(ミド)ディスプレイを用いて抗体又は抗原結合フラグメントを提示するための方法は米国特許 5,750,373、5,733,743、5,837,242、5,969,108、6,172,197、5,580,717 及び 5,658,727 に記載されている。次に所望の特性を有する抗体又は抗原結合蛋白の発現があるか、ライブラリをスクリーニングする。

#### 【0194】

50

鋳型核酸内に選択されたアミノ酸を置換させる方法は当該分野で確立されており、その一部は本明細書に記載するとおりである。例えば、超可変領域残基はKunkel法を用いて置換することができる。例えば、Kunkelら、Methods Enzymol. 154:367-382(1987)を参照できる。

【0195】

オリゴヌクレオチドの配列は改変すべき超可変領域残基に対して設計されたコドンセット1つ以上を包含する。コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするために使用される種々のヌクレオチドトリプレット配列のセットである。コドンセットは、IUBコードに従って以下に示す通り、特定のヌクレオチド又はヌクレオチドの等モル混合物を指定する文字を用いて表示することができる。

10

【0196】

(IUBコード)

G グアニン

A アデニン

T チミン

C シトシン

R (A又はG)

Y (C又はT)

M (A又はC)

K (G又はT)

S (C又はG)

W (A又はT)

H (A又はC又はT)

B (C又はG又はT)

V (A又はC又はG)

D (A又はG又はT) H

N (A又はC又はG又はT)。

20

【0197】

例えば、コドンセットDVKにおいて、DはヌクレオチドA又はG又はTであることができ；VはA又はG又はCであることができ；そしてKはG又はTであることができる。このコドンセットは18種の異なるコドンを示すことができ、そしてアミノ酸Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly及びCysをコードすることができる。

30

【0198】

オリゴヌクレオチド又はプライマーセットは標準的な方法を用いて合成できる。あるセットのオリゴヌクレオチドは例えばコドンセットにより与えられる全ての可能な組み合わせのヌクレオチドトリプレットを示し、そしてアミノ酸の所望のグループをコードする配列を含有する固相合成により合成することができる。特定の位置において選択されたヌクレオチド「縮重度」を有するオリゴヌクレオチドの合成は当該分野でよく知られている。特定のコドンセットを有するヌクレオチドのこのようなセットは市販の核酸合成装置(例えばApplied Biosystems, Foster City, CAより入手可能)を用いて合成することができるか、又は、市販品を購入できる(例えばLife Technologies, Rockville, MDより入手)。従って、特定のコドンセットを有する合成されたオリゴヌクレオチドのセットは典型的には異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを包含し、その差異は全体的配列内のコドンセットにより確立される。オリゴヌクレオチドは、本発明に従って使用する場合は、可変ドメイン核酸鋳型へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、そしてクローニング目的のための制限酵素部位を包含することもできる。

40

【0199】

1つの方法においては、変異体アミノ酸をコードする核酸配列はオリゴヌクレオチド媒

50

介突然変異誘発により作成できる。この手法は Z o l l e r ら、N u c l e i c A c i d s R e s . 1 0 : 6 4 8 7 - 6 5 0 4 ( 1 9 8 7 ) に記載されている通り当該分野でよく知られている。概すれば、DNA 鋳型に所望のコドンセットをコードするオリゴヌクレオチドセットをハイブリダイズさせることにより変異体アミノ酸をコードする核酸配列を作成し、個々で、鋳型は可変領域核酸鋳型配列を含有するプラスミドの 1 本鎖形態である。ハイブリダイゼーションの後、DNA ポリメラーゼを用いて、オリゴヌクレオチドプライマーを取り込むことになり、そしてオリゴヌクレオチドセットにより提供されるコドンセットを含有することになる鋳型の完全な第 2 の相補鎖を合成する。

#### 【0200】

一般的に少なくとも 2 5 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを使用する。最適なオリゴヌクレオチドは突然変異のためのコーディングヌクレオチドの何れかの側面上の鋳型に完全に相補的である 1 2 ~ 1 5 ヌクレオチドを有する。これによりオリゴヌクレオチドは 1 本鎖 DNA 鋳型分子に適切にハイブリダイズするようになる。オリゴヌクレオチドは例えば C r e a ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 7 5 : 5 7 6 5 ( 1 9 7 8 ) に記載のもののような当該分野で知られた手法を用いて容易に合成される。

#### 【0201】

DNA 鋳型は、バクテリオファージ M 1 3 ベクター（市販品の M 1 3 m p 1 8 及び M 1 3 m p 1 9 ベクターが適している）から誘導されるベクター、又は、V i e r a ら、M e t h . E n z y m o l . , 1 5 3 : 3 ( 1 9 8 7 ) により記載されている複製の 1 本鎖ファージ起点を含有するベクターにより生成される。即ち、突然変異すべき DNA をこれらのベクターの 1 つに挿入することにより 1 本鎖鋳型を作成することができる。1 本鎖鋳型の製造は上記 S a m b r o o k 等のセクション 4 . 2 1 ~ 4 . 4 1 に記載されている。

#### 【0202】

ネイティブの DNA 配列を改変するためには、オリゴヌクレオチドを適当なハイブリダイゼーション条件化に 1 本鎖鋳型にハイブリダイズさせる。DNA 重合酵素、通常は T 7 DNA ポリメラーゼ又は DNA ポリメラーゼ I の K l e n o w フラグメントを次に添加することにより、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを用いながら鋳型の相補鎖を合成する。このようにして、DNA の一方の鎖が遺伝子 1 の突然変異した型をコードし、そして他方の鎖（元の鋳型）が遺伝子 1 のネイティブの未改変の配列をコードするようなヘテロ 2 本鎖分子が形成される。次にこのヘテロ 2 本鎖分子を適当な宿主細胞、通常は原核生物、例えば E . c o l i J M 1 0 1 内に形質転換する。細胞を成育させた後、それらをアガロースプレートにプレーティングし、3 2 - ホスフェートで放射標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いてスクリーニングすることにより突然変異した DNA を含有する細菌コロニーを発見する。

#### 【0203】

上記した方法はプラスミドの両方の鎖が突然変異を含有するホモ 2 本鎖分子が形成されるように修飾してよい。修飾は以下の通り行う。1 本鎖オリゴヌクレオチドを上記した通り 1 本鎖鋳型にアニーリングする。3 種のデオキシリボヌクレオチド、即ちデオキシリボアデノシン ( d A T P )、デオキシリボグアノシン ( d G T P ) 及びデオキシリボチミジン ( d T T ) を d C T P - ( a S ) と称される修飾チオデオキシリボシトシン ( A m e r s h a m から入手可能) と組み合わせる。この混合物を鋳型 - オリゴヌクレオチド複合体に添加する。この混合物に DNA ポリメラーゼを添加すると、突然変異した塩基以外は鋳型と同一の DNA 鎖が形成される。更に又、DNA のこの新しい鎖は d C T P の代わりに d C T P - ( a S ) を含有しており、このため、制限エンドヌクレアーゼによる消化から保護される。2 本鎖のヘテロ 2 本鎖の鋳型鎖が適切な制限酵素でニック処理された後、鋳型鎖を E x o I I I ヌクレアーゼ又は他の適切なヌクレアーゼにより、突然変異誘発すべき部位を含有する領域を過ぎた部分で消化することができる。次に反応を停止して部分的にのみ 1 本鎖となった分子を得る。次に 4 種全てのデオキシリボヌクレオチドトリホスフェート、A T P 及び DNA リガーゼの存在下 DNA ポリメラーゼを用いて完全な 2 本鎖の DNA ホモ 2 本鎖を形成する。このホモ 2 本鎖分子を次に適当な宿主細胞に形質転換する

10

20

30

40

50

。

## 【0204】

上記した通り、オリゴヌクレオチドセットの配列は鑄型核酸にハイブリダイズするために十分な長さのものであり、そして又、必然ではないが、制限部位を含有してよい。DNA鑄型はバクテリオファージM13ベクターから誘導されるベクター、又は、Vieraら、Meth. Enzymol., 153:3(1987)により記載されている複製の1本鎖ファージ起点を含有するベクターにより生成される。即ち、突然変異すべきDNAをこれらのベクターの1つに挿入することにより1本鎖鑄型を作成することができる。1本鎖鑄型の製造は上記Sambrook等のセクション4.21~4.41に記載されている。

10

## 【0205】

別の方法によれば、ライブラリは各々のセットが異なる配列のオリゴヌクレオチドの複数を有する、上流及び下流のオリゴヌクレオチドセットを与えることにより形成することができ、異なる配列はオリゴヌクレオチドの配列内に与えられるコドンセットにより確立される。可変ドメイン鑄型核酸配列に沿った上流及び下流のオリゴヌクレオチドセットをポリメラーゼ連鎖反応において使用することによりPCR産物の「ライブラリ」を形成することができる。PCR産物は、それらが確立された分子生物学の技術を用いて他の関連又は未関連の核酸配列、例えばウイルス被膜蛋白及び2量体化ドメインと融合できることから、「核酸カセット」と称することができる。

20

## 【0206】

PCRプライマーの配列は超可変領域内の溶媒に接触可能であり、かつ非常に多様な位置に対して設計されたコドンセット1つ以上を包含する。上記した通り、コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするために使用される異なるヌクレオチドトリプレット配列のセットである。

## 【0207】

適切なスクリーニング/選択工程を介して選択された所望の基準に合致する抗体のセレクトانتは、標準的な組み換え手法を用いて単離し、そしてクローニングすることができる。

## 【0208】

(ベクター、宿主細胞及び組み換え方法)

本発明の抗体の組み換え製造のためには、それをコードする核酸を単離し、そして複製可能なベクターに挿入してその後のクローニング(DNAの増幅)に付すか、又は、発現に付す。抗体をコードするDNAは従来の操作法(例えば抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる等)を用いながら容易に単離して配列決定される。多くのベクターが使用可能である。ベクターの選択は部分的には使用する宿主細胞による。一般的に、好ましい宿主細胞は原核生物又は真核生物(一般的に哺乳類)起源の何れかのものである。

30

## 【0209】

(原核生物の宿主細胞を用いた抗体の作成)

(ベクターの構築)

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は標準的な組み換え手法を用いて得ることができる。ハイブリドーマ細胞のような抗体生産細胞から所望のポリヌクレオチド配列を単離して配列決定する。或いは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成装置又はPCR手法を用いて合成することができる。得られた後、ポリペプチドをコードする配列を原核生物宿主内で複製し、異種ポリヌクレオチドを発現することができる組み換えベクター内に挿入する。当該分野で入手可能であり知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用できる。適切なベクターの選択はベクターに挿入すべき核酸の大きさ、及び、ベクターで形質転換すべき特定の宿主細胞により主に決定されることになる。各ベクターは、その機能(異種ポリヌクレオチドの増幅又は発現又は両方)及びそれが入る特定の宿主細胞とのその適合性に依じて、種々の成分を含有する。ベクター成

40

50



分は一般的に、例えば複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位 (RBS)、シグナル配列、異種核酸インサート及び転写終止配列を包含する。

【0210】

一般的にレプリコン及び宿主細胞と適合する種から誘導される制御配列を含有するベクターをその宿主と組み合わせて使用する。ベクターは通常は複製部位、並びに、形質転換された細胞における表現型選択をもたらすことができるマーキング配列を担持している。例えば *E. coli* は典型的には *E. coli* 種から誘導されるプラスミドである pBR322 を用いて形質転換される。pBR322 はアンピシリン (Amp) 及びテトラサイクリン (Tet) 耐性をコードする遺伝子を含有しており、従って、形質転換された細胞を発見するための簡便な手段を提供する。pBR322、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージはまた、内因性蛋白の発現のために微生物により使用されることができるプロモーターを含有するか、含有するように修飾されている。特定の抗体の発現のために使用される pBR322 誘導体の例は Carter 等の米国特許 5,648,237 に詳細に記載されている。

10

【0211】

更に又、レプリコン及び宿主微生物と適合する制御配列を含有するファージベクターをそれらの宿主と組み合わせて形質転換ベクターとして使用することができる。例えば、GEM-TM-11 のようなバクテリオファージは、*E. coli* LE392 のような感受性宿主細胞を形質転換するために使用できる組み換えベクターを作成するときに利用してよい。

20

【0212】

本発明の発現ベクターはポリペプチド成分の各々をコードする2つ以上のプロモーター-シストロン対を含んでよい。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流 (5') に位置する未翻訳調節配列である。原核生物のプロモーターは典型的には2つのクラス、即ち誘導及び構成プロモーターに属する。誘導プロモーターは例えば栄養の有無又は温度変化のような培養条件の変化に应答してその制御下にシストロンの転写の増大した水準を開始するプロモーターである。

【0213】

種々の潜在的な宿主細胞により認識される多数のプロモーターがよく知られている。選択されたプロモーターは、制限酵素消化を介して原料DNAからプロモーターを取り出すこと、及び、本発明のベクター内への単離されたプロモーター配列を挿入することにより、軽鎖又は重鎖をコードするシストロンDNAに作動可能に連結することができる。ネイティブのプロモーター配列及び多くの異種のプロモーターの両方が標的遺伝子の直接の増幅及び/又は発現を指向するために使用してよい。一部の実施形態においては、異種のプロモーターは、ネイティブ標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的により高値の転写および発現された標的遺伝子のより高値の収率を可能にすることから、これらが利用されている。

30

【0214】

原核生物を用いる場合の使用に適するプロモーターは PhoA プロモーター、-ガラクトマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン (trp) プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えば tac 又は trc プロモーターを包含する。しかしながら、細菌内で機能する他のプロモーター (例えば他の既知の細菌又はファージのプロモーター) が同様に適している。そのヌクレオチド配列は公開されており、これにより当業者であればそれらを、何れかの必要な制限部位を供給するためにリンカー又はアダプターを用いながら標的の軽鎖及び重鎖 (Siebenlistら、(1980) Cell 20:269) をコードするシストロンに作動可能にライゲーションすることが可能である。

40

【0215】

本発明の1つの特徴において、組み換えベクター内の各シストロンは膜を通過する発現されたポリペプチドの転座を指向する分泌シグナル配列成分を含む。一般的にシグナル配

50

列はベクターの成分であってよく、又は、ベクター内に挿入される標的ポリペプチドDNAの部分であってよい。本発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞により認識されプロセッシングされる（即ちシグナルペプチダーゼにより切断される）ものでなければならない。異種ポリペプチドに対してネイティブであるシグナルペプチドを認識又はプロセッシングしない原核生物宿主細胞の場合は、シグナル配列は例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp又は熱安定性エンテロトキシンII（STII）リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA及びMBPからなる群より選択される原核生物シグナル配列により置換される。本発明の1つの実施形態において、発現系の両シストロンにおいて使用されるシグナル配列はSTIIシグナル配列又はその変異体である。

10

**【0216】**

別の特徴においては、本発明の免疫グロブリンの製造は宿主細胞の原形質内において起こることができ、従って各シストロン内の分泌シグナル配列の存在を必要としない。その点に関し、免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖は原形質内において発現され、折り畳まれ、そして組み立てられて機能的免疫グロブリンを形成する。特定の宿主細胞（例えばE.coli trixB<sup>-</sup>株）はジスルフィド結合の形成に好都合な原形質条件を提供し、これにより、発現された蛋白サブユニットの適切な折り畳み及び組み立てを可能にする。Proband Pluckthun Gene, 159:203 (1995)。

**【0217】**

本発明は、分泌され適切に組み立てられた本発明の抗体の収率を最大限にするために発現されたポリペプチド成分の定量的比を調節する発現系を提供する。そのような調節は少なくとも部分的にはポリペプチド成分に関する翻訳強度を同時に調節することにより達成される。

20

**【0218】**

翻訳強度を調節するための1つの手法はSimmons等の米国特許5,840,523に開示されている。それはシストロン内の翻訳開始領域（TIR）の変異体を利用する。あるTIRに関して、一連のアミノ酸又は核酸配列変異体のある範囲の翻訳強度で作成することができ、特定の鎖の所望の発現水準のためにこの因子を調節する好都合な手段が提供される。TIR変異体は、ヌクレオチド配列のサイレントな変化が好ましいものの、アミノ酸配列を改変する可能性があるコドンの変化をもたらす従来突然変異誘発手法により作成することができる。TIRの改変は例えばShine-Dalgarno配列の数又は間隔の改変、並びに、シグナル配列の改変を包含する。突然変異体シグナル配列を形成するための1つの方法はシグナル配列のアミノ酸配列を変化させないコーディング配列の始点における「コドンバック」の形成である（即ち変化はサイレントである）。これは各コドンの第3のヌクレオチド位置を変化させることにより達成することができ；更に又、一部のアミノ酸、例えばロイシン、セリン及びアルギニンは、データバンク作成に複雑性を与えることができる複数の第1及び第2の位置を有する。この突然変異誘発方法はYansuraら、(1992)METHODS:A Companion to Methocsin Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

30

**【0219】**

好ましくは、ベクターのセットを、そこに含まれる各シストロンに対してある範囲のTIR強度となるように形成する。この限定されたセットは、各鎖の発現水準の比較並びに種々のTIR強度の組み合わせの下の所望の抗体産物の収率をもたらす。TIR強度はSimmons等の米国特許5,840,523に詳細に記載されている通り、受容体遺伝子の発現水準を定量することにより測定できる。翻訳強度比較に基づいて、所望の個々のTIRを選択して本発明の発現ベクターコンストラクトと組み合わせる。

40

**【0220】**

本発明の抗体を発現するために適する原核生物宿主細胞は例えばグラム陰性又はグラム陽性の生物のような原始細菌及び真正細菌を包含する。有用な細菌の例はエシェリシア（例えばE.coli）、バチルス（例えばB.サブチルス）、腸内細菌、シュードモナス

50

種（例えばP・アエルギノーサ）、サルモネラ・チフィムリウム、セラチア・マルクレブシエラ、プロテウス、シゲラ、リゾビア、ピトレオシラ又はパラコッカスを包含する。1つの実施形態において、グラム陰性菌体を使用する。1つの実施形態において、E.coli菌体の本発明の宿主として使用する。E.coli菌株の例は、菌株W3110（Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC 寄託番号 27, 325）及びその誘導体、例えば遺伝子型W3110 fhuA (tonA) ptr3 lacI q lacL 8 ompT (nmpc-fepE) degP 41 kan<sup>R</sup>を有する菌株33D3を包含する（米国特許5,639,635）。他の菌株及びその誘導体、例えばE.coli 294（ATCC 31,446）、E.coli B、E.coli 1776（ATCC 31,537）及びE.coli RV308（ATCC 31,608）もまた適している。これらの例は例示的なものであり、限定するものではない。所定の遺伝子型を有する上記した細菌の何れかの誘導体を構築するための方法は当該分野で知られており、そして例えばBassら、Proteins, 8:309-314（1990）に記載されている。細菌の菌体内のレプリコンの複製能力を考慮しながら適切な細菌を選択することが一般的に必要である。例えば、E.coli、セラチア又はサルモネラ種はpBR322、pBR325、pACYC177又はpKN410のようなよく知られたプラスミドを用いてレプリコンを供給する場合には、宿主として使用するのに適している。典型的には、宿主細胞は最小量の蛋白分解酵素を分泌しなければならず、そして細胞培養物には追加的なプロテアーゼ阻害剤を配合することが望ましい。

#### 【0221】

（抗体の製造）

宿主細胞は上記した発現ベクターで形質転換し、そしてプロモーターの誘導、形質転換体の選択又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適宜調整された従来の栄養培地中で培養する。

#### 【0222】

形質転換とは、DNAが染色体外エレメントとして、又は、染色体組込物により複製可能であるように原核生物の宿主内にDNAを導入することを意味する。使用する宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適する標準的な手法を用いて行う。塩化カルシウムを使用するカルシウム処理は一般的にはかなりの細胞壁バリアを含有する細菌細胞に対して使用されている。形質転換の別の方法はポリエチレングリコール/DMSOを使用する。更に別の手法はエレクトロポレーションである。

#### 【0223】

本発明のポリペプチドを製造するために使用する原核生物の細胞は当該分野で知られ、そして選択された宿主細胞の培養に適する培地中で成育させる。適当な培地の例はルリア培地（LB）+必要な栄養補給物である。一部の実施形態においては、培地は又発現ベクターを含有する原核生物の細胞の成育を選択的に可能にするために、発現ベクターの構築に基づいて選ばれた選択物質を含有してよい。例えば、アンピシリンをアンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の成育のための培地に添加してよい。

#### 【0224】

炭素、窒素及び無機物リン酸塩の補給源に加えて何れかの必要な補給物も単独で導入するか、又は他の補給物又は培地との混合物として、例えば複合窒素源として、適切な濃度において含んでよい。場合により、培地はグルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリスリトール及びジチオスレイトールからなる群より選択される1つ以上の還元剤を含有してよい。

#### 【0225】

原核生物宿主細胞は適当な温度で培養する。E.coliの生育のためには、例えば好ましい温度は約20～約39の範囲、より好ましくは約25～約37、更に好ましくは約30である。培地のpHは主に宿主生物に応じて約5～約9の範囲である。E

10

20

30

40

50

. coli の場合、pH は好ましくは約 6.8 ~ 約 7.4、更に好ましくは約 7.0 である。

#### 【0226】

誘導プロモーターを本発明の発現ベクター中において使用する場合、蛋白の発現はプロモーターの活性化に適する条件下に誘導する。本発明の1つの特徴において、PhoA プロモーターをポリペプチドの転写を制御するために使用する。従って、形質転換された宿主細胞は導入のためのホスフェート制限培地中で培養する。好ましくは、ホスフェート制限培地は C. R. A. P 培地である（例えば Simmons ら、J. Immunol. Methods (2002), 263: 133-147 参照）。種々の他のインデューサーも当該分野で知られる通り、使用されるベクターコンストラクトに応じて使用してよい。

10

#### 【0227】

1つの実施形態において、本発明の発現されたポリペプチドは宿主細胞のペリプラズム内に分泌させ、それより回収する。蛋白の回収では、典型的には細胞の破壊を、一般的には浸透圧ショック、超音波又は細部溶解のような手段により行う。細胞が破壊された後に細胞の破砕物又は全細胞を遠心分離又は濾過により分離してよい。蛋白は例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーにより更に精製してよい。或いは、蛋白を培地中に移しそこで単離することもできる。生成した蛋白を更に精製するために、細胞を培地から除去し、培養上澄みを濾過し、濃縮してよい。発現されたポリペプチドは更に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 及びウエスタンブロットのような一般的に知られた方法を用いて単離及び同定することができる。

20

#### 【0228】

本発明の1つの特徴において、抗体の製造は醗酵法により大量に実施される。種々の大規模供給バッチ醗酵手順が組み換え蛋白の製造のために使用できる。大規模醗酵は少なくとも 1000 リットルの容量、好ましくは約 1,000 ~ 100,000 リットルの容量を有する。これらの醗酵器は酸素と栄養物、特にグルコース（好ましい炭素原子/エネルギー源）を分散させるために攪拌羽根車を使用する。小規模醗酵とは一般的に約 100 リットル以下の容量であり、約 1 リットル ~ 約 100 リットルの範囲であることができる醗酵器内の醗酵を指す。

#### 【0229】

醗酵過程においては、蛋白発現の誘導は典型的には細胞が所望の密度、例えば細胞が早期定常期である約 180 ~ 220 の OD<sub>550</sub> となるまで適当な条件下に生育させた後に開始する。当該分野で知られる通り、そして、上記した通り、使用されるベクターコンストラクトに応じて種々のインデューサーを使用してよい。細胞は誘導の前に短時間生育させてよい。細胞は通常は約 12 ~ 50 時間誘導するが、より長時間又は短時間も使用してよい。

30

#### 【0230】

本発明のポリペプチドの製造収率及び品質を向上させるためには、種々の醗酵条件を変更できる。例えば、分泌された抗体ポリペプチドの適切な組み立て及び折り畳みを向上させるためには、追加的なベクター過剰発現シャペロン蛋白、例えば Dsb 蛋白 (DsbA、DsbB、DsbC、DsbD 及び / 又は DsbG) 又は FkpA (シャペロン活性を有するペプチジルプロピルシストランス-イソメラーゼ) を使用して宿主原核生物細胞を同時形質転換することができる。シャペロン蛋白は宿主細胞内で生産された異種蛋白の適切な折り畳み及び溶解性を促進することがわかっている。Chen ら、(1999) J

40

Bio Chem 274: 19601-19605; Georgiou 等の米国特許 6,083,715; Georgiou 等の米国特許 6,027,888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie ら、(2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210。

#### 【0231】

50

発現された異種蛋白（特に蛋白分解的に感受性であるもの）の蛋白分解を最小限にするためには、蛋白分解酵素を欠損する特定の宿主系統を本発明のために使用できる。例えば、宿主細胞株はプロテアーゼ I I I、Omp T、Deg P、Tsp、プロテアーゼ I、プロテアーゼ Mi、プロテアーゼ V、プロテアーゼ V I 及びその組み合わせのような知られた細菌性プロテアーゼをコードする遺伝子内で遺伝子突然変異が起こるように修飾してよい。一部の E. coli プロテアーゼ欠損の系統が使用可能であり、例えば Jolyら、(1998)、上出；Georgiou等の米国特許 5,264,365；Georgiou等の米国特許 5,508,192；Haraら、Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996) に記載されている。

#### 【0232】

1つの実施形態において、蛋白分解酵素を欠損し、そしてシャペロン蛋白1つ以上を過剰発現するプラスミドで形質転換されている E. coli 菌株が本発明の発現系における宿主細胞として使用される。

#### 【0233】

(抗体の精製)

1つの実施形態においては、本発明において製造された抗体蛋白を更に精製してその後の試験及び使用のためにより均質とされた調製物を得る。当該分野で知られた標準的な蛋白精製方法を使用することができる。以下の操作法、即ち、免疫アフィニティー又はイオン交換カラム上の分画、エタノール沈降法、逆相 HPLC、シリカゲル上又はカチオン交換樹脂、例えば DEAE 上のクロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈降法及び例えばセファデックス G-75 を用いたゲル濾過等が精製操作法の例である。

#### 【0234】

1つの特徴において、固相上に固定化されたプロテイン A を本発明の完全長抗体産物の免疫アフィニティー精製のために使用する。プロテイン A は抗体の Fc 領域に高親和性で結合するスタフィロコッカス・アウレウス由来の 41 kD の細胞壁蛋白である。Lindmarkら、(1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテイン A を固定化する固相は好ましくはガラス又はシリカの表面を含むカラム、より好ましくは制御された細孔を有するガラスカラム又はケイ酸カラムである。一部の適用例においては、カラムは、夾雑物の非特異的結合を防止するために、試薬、例えばグリセロールでコーティングされている。

#### 【0235】

精製の第1工程として、上記した細胞培養物から誘導された調製物をプロテイン A 固定化固相上に適用し、プロテイン A への目的の抗体の特異的結合を行う。次に固相を洗浄して固相に非特異的に結合した夾雑物を除去する。最後に溶出により固相から目的の抗体を回収する。

#### 【0236】

(真核生物宿主細胞を用いた抗体の作成)

ベクター成分は限定的ではないが一般的にはシグナル配列、複製起点、マーカー遺伝子1つ以上、エンハンサーエレメント、プロモーター及び転写終止配列の1つ以上を含む。

#### 【0237】

(i) シグナル配列成分

真核細胞宿主細胞において使用するためのベクターもまた目的の成熟蛋白又はポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有するシグナル配列又は他のポリペプチドを含有してよい。好ましく選択される異種のシグナル配列は宿主細胞により認識されプロセッシングされる(即ちシグナルペプチダーゼにより切断される)ものである。哺乳類細胞発現においては、哺乳類シグナル配列、並びに、ウイルス分泌リーダー、例えば単純疱疹 gD シグナルが使用できる。

#### 【0238】

このような前駆体領域の DNA は、抗体をコードする DNA に読み枠内でライゲーション

10

20

30

40

50

ンされる。

【0239】

(ii)複製起点

一般的に複製起点成分は哺乳類発現ベクターには必要ではない。例えばSV40起点は典型的には、それが早期プロモーターを含有しているためにのみ使用してよい。

【0240】

(iii)選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは選択遺伝子、即ち選択可能なマーカーとも称されるものを含有してよい。典型的な選択遺伝子は(a)抗生物質又は他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート又はテトラサイクリンに対する耐性を付与するか  
10 (b)該当する場合は栄養要求性欠損を補充するか、又は(c)複合培地からは得られない重要な栄養を補給する蛋白をコードする。

【0241】

選択スキームの一例は宿主細胞の生育を停止させる薬剤を利用する。異種遺伝子で良好に形質転換された細胞は薬剤耐性を付与する蛋白を生産し、そしてこのため、選択環境において生存することができる。このような優性選択の例は薬剤ネオマイシン、マイコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

【0242】

哺乳類細胞に対する適当な選択可能なマーカーの別の例は、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-I及び-II、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンカルボキシラーゼ等のような、抗体核酸を取り込む能力  
20 を有する細胞の発見を可能にするものである。

【0243】

例えばDHFR選択遺伝子で形質転換された細胞は、DHFRの競合的拮抗剤であるメトトレキセート(Mtx)を含有する培地中で全形質転換体を培養することによりまず発見される。野生型DHFRを使用する場合の適切な宿主細胞は、DHFR活性を欠損したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株である(例えばATCC CRL-9096)。

【0244】

或いは、抗体、野生型DHFR蛋白及び他の選択可能なマーカー、例えばアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)をコードするDNA配列で形質転換又は同時形質転換された宿主細胞(特に内因性DHFRを含有する野生型宿主)はアミノグリコシド抗生物質、例えばカナマイシン、ネオマイシン又はG418のような選択可能なマーカーに関する選択剤を含有する培地中における細胞生育により選択できる。米国特許4,965,199を参照。  
30

【0245】

(iv)プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物により認識されるプロモーターを含有しそして抗体ポリペプチド核酸に作動可能に連結している。プロモーター配列は真核生物について知られている。実質的に全ての真核生物遺伝子が転写が開始される部位から約25~30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始から70~80塩基上流に存在する別の配列はCNCAAT領域であり、個々でNは何れかのヌクレオチドである。大部分の真核生物遺伝子の3'末端は、コーディング配列の3'末端へのポリAテールの付加のためのシグナルであるAATAAA配列である。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに挿入するのに適する。  
40

【0246】

哺乳類宿主細胞内のベクターからの抗体ポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウィルス、鶏痘ウィルス、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシバビローマウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びシミアンウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから、異種哺乳類プロモ  
50

ーター、例えばアクチンプロモーター、又は免疫グロブリンプロモーターから、熱ショックプロモーターから得られたプロモーターにより、これらのプロモーターが宿主細胞系と適合する限りにおいて、制御される。

#### 【0247】

SV40ウィルスの早期及び後期プロモーターは、好都合には、複製のSV40ウィルス起点を同様に含有するSV40制限フラグメントとして得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは好都合にはHindIII制限フラグメントとして得られる。ベクターとしてウシパピロームウィルスを使用する哺乳類宿主内でDNAを発現するための系は米国特許4,419,446に開示されている。この系の修飾は米国特許4,601,978に記載されている。更に又、単純疱疹ウィルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下のマウス細胞におけるヒト-インターフェロンcDNAの発現に関しては、Reyesら、Nature 297:598-601(1982)を参照できる。或いは、ラウス肉腫ウィルス長末端リピートをプロモーターとして使用できる。

10

#### 【0248】

##### (v) エンハンサーエレメント成分

高等真核生物による本発明の抗体ポリペプチドをコードするDNAの転写はベクター内にエンハンサー配列を挿入することにより増大する場合が多い。哺乳類遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら典型的には真核細胞ウィルス由来のエンハンサーを使用することにある。例示されるものは複製起点の後期側のSV40エンハンサー(bp100~270)、サイトメガロウィルス早期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及び、アデノウィルスエンハンサーを包含する。真核生物プロモーターの活性化のための増強エレメントに関してはYaniv, Nature 297:17-18(1982)も参照できる。エンハンサーは抗体-ポリペプチドをコードする配列に対して5'又は3'側の位置においてベクター内にスプライシングしてよいが、好ましくはプロモーターから5'側の部位に位置する。

20

#### 【0249】

##### (vi) 転写終止成分

真核生物宿主細胞内で使用される発現ベクターは典型的には転写の終止のため、及び、mRNAの安定化のために必要な配列も含有する。このような配列は真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの一般的には5'側、そして場合により3'側の未翻訳領域が得られる。これらの領域は抗体をコードするmRNAの未翻訳部分におけるポリアデニル化フラグメントとして転写されたヌクレオチドセグメントを含有する。1つの有用な転写終止成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026及びそこに開示されている発現ベクターを参照できる。

30

#### 【0250】

##### (vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

ベクター内でDNAをクローニング又は発現するための適当な宿主細胞はここでは本明細書に記載した高等真核生物の細胞、例えば脊椎動物の宿主細胞を包含する。培養物(組織培養)中の脊椎動物の細胞の増殖は典型的な操作法になっている。有用な哺乳類宿主細胞株の例はSV40で形質転換されたサル腎臓CV1系統(COS-7、ATCC CRL1651);ヒト胚性腎臓系統(293又は懸濁培養物中での生育のためにサブクローニングされた293細胞、Grahamら、J. Gen. Virol. 36:59(1977));ベビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/ - DHFR(CHO、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980));マウスセルトリー細胞(TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980));モンキー腎臓細胞(CV1 ATCC CCL70);アフリカグリーンモンキー腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587);ヒト頸癌細胞(HELA, ATCC CCL2);イヌ科腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL34);バッファローラット

40

50

肝臓細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442) ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL75); ヒト肝臓細胞 (HepG2, HB8065); マウス乳癌 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞 (Matherら、Annals NY Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); MRC5細胞; FS4細胞; 及びヒト肝細胞癌系統 (HepG2) である。

#### 【0251】

宿主細胞は抗体製造のための上記した発現又はクローニングベクターで形質転換し、そしてプロモーターの誘導、形質転換体の選択又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に修飾された従来の栄養培地中で培養する。

#### 【0252】

##### (viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を製造するために使用する宿主細胞は種々の培地中で培養してよい。Ham's F10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、最小必須培地 (MEM)、Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 及びダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM, Sigma) のような市販の培地が宿主細胞を培養するために適している。更に又 Hamら、Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnesら、Anal. Biochem. 102: 255 (1980)、米国特許 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 又は 5,122,469; WO90/03430; WO87/00195; 又は米国特許 Re. 30,985 に記載の培地の何れも宿主細胞のための培地として使用してよい。これらの培地の何れも必要に応じてホルモン類及び/又は他の成長因子 (例えばインスリン、トランスフェリン又は表皮成長因子)、塩類 (例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、緩衝剤 (例えば HEPES)、ヌクレオチド (例えばアデノシン及びチミジン)、抗体 (例えば GENTAMYCIN<sup>TM</sup> 剤)、微量元素 (マイクロモル範囲の終濃度で通常存在する無機の化合物として定義される) 及びグルコース又は等価なエネルギー源を補給してよい。何れかの他の必要な補給物もまた当業者の知るとおり適切な濃度で含有させてよい。培養条件、例えば温度、pH等は発現のために選択された宿主細胞とともに以前に使用したものであり、そして当業者には容易に想到されるものである。

#### 【0253】

##### (ix) 抗体の精製

組み換え手法を用いる場合、抗体は細胞内に生産させるか、又は、培地に直接分泌させることができる。抗体が細胞内に生産される場合は、第1工程として、宿主細胞又は溶解断片である粒状の破砕物を例えば遠心分離又は限外濾過により除去する。抗体を培地に分泌させる場合は、そのような発現系の上澄みを一般的にはまず市販の蛋白濃縮フィルター、例えば Amicon 又は Millipore Pellicon 限外濾過ユニットを用いて濃縮する。プロテアーゼ阻害剤、例えば PMSF を上記工程の何れかにおいて使用することにより蛋白分解を阻害してよく、そして、抗生物質を添加して偶発的な夾雑菌の生育を防止してよい。

#### 【0254】

細胞から調製された抗体組成物は例えばヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することができ、ここではアフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製手法である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの妥当性は抗体内に存在する何れかの免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプによるものである。プロテインAはヒト 1、2 又は 4 の重鎖に基づく抗体を精製するために使用できる (Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは全てのマウスのアイソタイプ及びヒト 3 に対して推奨される (Gussら、EMBO J. 5; 15671575 (1986))。アフィニティリガンドを結合させるマトリックスは最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリックスも使用できる。機械的に安定なマトリックス、

10

20

30

40

50



例えば制御された細孔を有するガラス又はポリ(スチレンジビニル)ベンゼンはアガロースで達成できるものよりも早い流量及び短い処理時間を可能にする。抗体がC<sub>H</sub>3ドメインを含む場合は、Bakerbond ABX<sup>TM</sup>樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製のために適している。蛋白精製のための他の手法、例えばイオン交換カラム上の分画、エタノール沈降法、逆相HPLC、シリカゲル上のクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE<sup>TM</sup>上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(例えばポリアスパラギン酸カラム)上のクロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、SDS-PAGE及び硫酸アンモニウム沈降法もまた回収すべき抗体に応じて使用される。

#### 【0255】

何れかの予備的精製工程の後、目的の抗体及び夾雑物を含む混合物を、好ましくは低塩濃度(例えば約0~0.25M塩)において実施される約2.5~4.5のpHの溶出を用いた低pHの疎水性相互作用クロマトグラフィーに付す。

#### 【0256】

(活性試験)

本発明の抗体は当該分野で知られた種々の試験により、その物理的/化学的特性及び生物学的機能について特性化することができる。

#### 【0257】

精製された免疫グロブリンは更に、一連の試験、例えばN末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズエクスクルージョン高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量スペクトル分析、イオン交換クロマトグラフィー及びパepsin消化により特性化することができる。

#### 【0258】

本発明の特定の実施形態においては、ここで生産された免疫グロブリンはその生物学的活性について分析される。一部の実施形態においては、本発明の免疫グロブリンはその抗原結合活性について試験される。当該分野で知られ、本発明において使用できる抗原結合試験の例は、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着試験)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降試験、蛍光イムノアッセイ及びプロテインAイムノアッセイのような手法をもちいた何れかの直接又は競合的な結合試験を包含する。例示される抗原結合試験は実施例のセクションにおいて後述する。

#### 【0259】

1つの実施形態において、本発明は一部ではあるが全てではないエフェクター機能を保有する改変された抗体を意図しており、これにより、インビボの抗体の半減期が重要であるが、なお特定のエフェクター機能(例えば補体及びADCC)は不必要であるか有害であるような多くの適用のための望ましい候補となっている。特定の実施形態においては、所望の特性のみが維持されていることを確実にするため、生産された免疫グロブリンのFc活性を測定する。インビトロ及び/又はインビボの細胞毒性試験を実施することによりCDC及び/又はADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合試験を実施することにより抗体がFcR結合を欠失している(従ってADCC活性も欠失していると考えられる)がFcRn結合能力は保持していることを確保することができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞はFcRIIのみを発現するのに大使、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現はRavetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92(1991)の464ページ上の表3に総括されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロの試験の例は米国特許5,500,362又は5,821,337に記載されている。このような試験のための有用なエフェクター細胞は末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を包含する。或いは、或いは追加的に、目的分子のADCC活性はインビボで、例えばClynesら、PNAS(USA)95:652-656(1988)に開示されているもののような動物モデル中で評価してよい。Clq結合試験もまた抗体がClqに結

10

20

30

40

50

合することができない、即ちCDC活性を欠失していることを確認するために実施してよい。補体活性化を評価するためには、例えばGazzano-Santorola、J. Immunol. Methods 202:163(1996)に記載されているCDC試験を実施してよい。FcRn結合及びインビボのクリアランス/半減期の測定は例えば実施例のセクションに記載するような当該分野で知られた方法を用いて実施することができる。

#### 【0260】

##### (ヒト化抗体)

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化するための種々の方法が当該分野で知られている。例えば、ヒト化抗体は非ヒトである原料からそこに導入されたアミノ酸残基1つ以上を有することができる。これらの非ヒトアミノ酸残基は頻繁には「インポート」残基と称され、これは典型的には「インポート」可変ドメインに由来する。ヒト化は本質的にはヒト抗体の相当する配列の超可変領域配列を置換することにより、Winter等の方法に従って実施することができる(Jonesら、(1986)Nature 321:522-525; Riechmannら、(1988)Nature 332:323-327; Verhoeyenら、(1988)Science 239:1534-1536)に従って実施することができる。従ってそのような「ヒト化」抗体は、未損傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない部分が非ヒト種の相当する配列により置換されているキメラ抗体(米国特許4,816,567)である。実際、ヒト化抗体は典型的には、一部の超可変領域残基及びおそらくは一部のFR残基がげっ歯類抗体における類似の部位に由来する残基により置換されているヒト抗体である。

10

20

#### 【0261】

ヒト化抗体の作成において使用すべき軽鎖及び重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は抗原性を低減するためには極めて重要である。いわゆる「ベストフィット」法に従えば、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリに対してスクリーニングする。次にげっ歯類のものに最も近かったヒト配列がヒト化抗体のためのヒトフレームワークとして許容される(Simsら、(1993)J. Immunol. 151:2296; Chothiaら、(1987)J. Mol. Biol. 196:901)。別の方法は軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列から誘導した特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを数種の異なるヒト化抗体に対して使用してよい(Carterら、(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Prestaraら、(1993)J. Immunol., 151:2623)。

30

#### 【0262】

抗原に対する高い親和性及び他の望ましい生物学的特性を保持しながら抗体をヒト化させることが更に重要である。この目標を達成するためには、1つの方法によれば、親配列及び種々の概念的ヒト化産物の分析の過程により、親及びヒト化配列の三次元モデルを用いながら、ヒト化抗体を製造する。三次元の免疫グロブリンモデルは市販されており、当業者のよく知るものである。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元コンホーション構造を説明して表示するコンピュータプログラムが使用できる。これらのディスプレイを精査することにより、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の推定される役割の分析、即ち候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響する残基の分析が可能になる。このようにして、FR残基を選択肢、レシピエント及びインポート配列から、標的抗原に対する増大した親和性のような所望の抗体特性が達成されるように組み合わせることができる。一般的に超可変領域残基は、抗原結合への影響においては直接、そして最も大きく関与している。

40

#### 【0263】

##### (抗体変異体)

1つの特徴において、本発明はFc領域を含むFcポリペプチドの界面において修飾を含む抗体フラグメントを提供し、その場合、修飾はヘテロ2量体化を刺激及び/又は促進

50

する。これらの修飾は第1のFcポリペプチドへの隆起部及び第2のFcポリペプチドへの陥没部の導入を含み、ここで隆起部は陥没部に位置付けすることが可能であり、これにより第1及び第2のFcポリペプチドの複合体形成が促進される。これらの修飾を有する抗体の形成方法は当該分野で知られており、例えば米国特許5,731,168に記載されている。

#### 【0264】

一部の実施形態においては、本明細書に記載した抗体のアミノ酸配列の修飾が意図される。例えば抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を向上させることが望まれる場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は抗体核酸に適切なヌクレオチドの変化を導入することによるか、又は、ペプチド合成により製造される。このような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失及び/又は挿入及び/又は置換を包含する。欠失、挿入及び置換の何れかの組み合わせが最終コンストラクトに到達するまで行ってよいが、ただし最終コンストラクトは所望の特性を保有しなければならない。アミノ酸の改変は配列が作成される時点で目的の抗体のアミノ酸配列に導入してよい。

10

#### 【0265】

突然変異誘発のために好ましい位置である抗体の特定の残基又は領域の発見のための有用な方法はCunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085により記載される通り「アラニンスキャニング突然変異誘発」と称される。ここでは、残基又は標的残基の群を発見(例えばarg、asp、his、lys及びglnのような荷電残基)し、そして中性又は逆に荷電したアミノ酸(最も好ましくはアラニン又はポリアラニン)で置き換えることにより抗原とのアミノ酸の相互作用に影響を与える。次に置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置を、置換の位置において、又はそのための、追加的又は別の変異体を導入することにより精査する。即ち、アミノ酸配列変異を導入するための部位が予め決定されるが、突然変異そのものの性質は予め決定されなくてよい。例えば、所定の部位における突然変異の性能を分析するためには、alaスキャニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域において実施し、そして発現された免疫グロブリンで所望の活性を有するものをスクリーニングする。

20

#### 【0266】

アミノ酸配列の挿入は、1残基~100以上の残基を含有するポリペプチドの長さの範囲のアミノ及び/又はカルボキシ末端の融合、並びに、単一又は複数のアミノ酸残基の配列内の挿入を包含する。末端挿入の例はN末端メチオニル残基を有する抗体又は細胞毒性ポリペプチドに融合した抗体を包含する。抗体分子の他の挿入による変異体は、血清中の抗体の半減期を増大させる酵素(例えばADEPT)又はポリペプチドに対する抗体のN又はC末端への融合を包含する。

30

#### 【0267】

変異体の別の型はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は異なる残基で置き換えられた抗体分子内のアミノ酸残基少なくとも1つを有する。置換突然変異誘発の最大の関心部位は超可変領域を包含するが、FR改変もまた意図される。保存的な置換は「好ましい置換」と題して表2に示すものである。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合は、表2において「例示される置換」と命名されたもの、又はアミノ酸のクラスに関して後述するような、より実質的な変化を導入して産物をスクリーニングしてよい。

40

#### 【0268】

【表 2】

表 2

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

抗体の生物学的特性における実質的な修飾は ( a ) 例えばシート又はらせん状のコンホーメーションとしての、置換の領域におけるポリペプチドの骨格の構造、( b ) 標的部位における分子の電荷又は疎水性、又は、( c ) 側鎖の高、を維持することに対するその作用において有意に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸はその側鎖の特性における類似性に従って、下記の通りグループ分けしてよい ( A . L . Lehning , Biochemistry , second ed . , pp . 73 - 75 , Worth Publishers , New York ( 1975 ) ) 。

40

( 1 ) 非極性 : Ala ( A ) 、 Val ( V ) 、 Leu ( L ) 、 Ile ( I ) 、 Pro ( P ) 、 Phe ( F ) 、 Trp ( W ) 、 Met ( M )

( 2 ) 非荷電極性 : Gly ( G ) 、 Ser ( S ) 、 Thr ( T ) 、 Cys ( C ) 、 Tyr ( Y ) 、 Asn ( N ) 、 Gln ( Q )

( 3 ) 酸性 : Asp ( D ) 、 Glu ( E )

( 4 ) 塩基性 : Lys ( K ) 、 Arg ( R ) 、 His ( H ) 。

【 0 2 6 9 】

或いは、天然に存在する残基を共通側鎖の特性に基づいて、下記の通りグループ分けし

50

てよい。

(1) 疎水性：N o r l o i s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；

(2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；

(3) 酸性：A s p、G l u；

(4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；

(5) 鎖の方向に影響する残基：G l y、P r o；

(6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

#### 【0270】

非保存的置換はこれらのクラスの一方のメンバーを別のクラスと交換することを包含する。このように置換された残基はまた保存的置換の部位内に、より好ましくは残余（非保存）部位内に導入されてもよい。

10

#### 【0271】

置換変異体の1つの型では、親抗体（例えばヒト化又はヒト抗体）の超可変領域残基の1つ以上が置換される。一般的に、得られた変異体でその後の開発のために選択されるものはそれらが形成される元となった親抗体と相対比較して向上した生物学的特性を有することになる。そのような置換変異体を形成するための好都合な方法では、ファージディスプレイを用いたアフィニティ成熟化を行う。概すれば、幾つかの超可変領域部位（例えば6～7部位）を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を形成する。このようにして形成された抗体を、フィラメントファージ粒子から、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III産物への融合物として提示する。ファージディスプレイされた変異体を次に、本明細書に開示したその生物学的活性（例えば結合親和性）に関してスクリーニングする。修飾に関する候補超可変領域部位を発見するためには、アラニンスクリーニング突然変異誘発を実施することにより抗原結合に大きく寄与している超可変領域残基を発見することができる。或いは、又は追加的に、抗体と抗原の間の接触点を発見するために抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することが有益である場合がある。このような接触残基及び近隣の残基は本発明において考案した手法により置換のための候補である。このような変異体を形成した後、変異体のパネルを本明細書に記載するとおりスクリーニングに付し、そして該当する試験1つ以上において優れた特性を有していた抗体を選択してその後の開発に付す。

20

#### 【0272】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は当該分野で知られた種々の方法により製造される。これらの方法は、例えば天然原料（天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合）からの単離、又は、オリゴヌクレオチド媒介（又は部位指向性）突然変異誘発、PCR突然変異誘発及び以前に作成された抗体変異体又は非変異体型のカセット突然変異誘発による作成を包含する。

30

#### 【0273】

本発明の免疫グロブリンポリペプチドのFc領域内にアミノ酸修飾1つ以上を導入することにより、Fc領域変異体を形成することが望ましい場合がある。Fc領域変異体はヒンジシステインを包含するアミノ酸位置1つ以上においてアミノ酸修飾（例えば置換）を含むヒトFc領域配列（例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4Fc領域）を含んでよい。

40

#### 【0274】

本明細書の記載及び当該分野の教示に従って、一部の実施形態においては、本発明の方法で使用する抗体は例えばFc領域において野生型の対応する抗体と比較して改変1つ以上を含んでよいことを意図している。これらの抗体はしかしなお、その対応野生型と比較して治療利用性のために必要な実質的に同じ特性を保持している。例えば改変された（即ち向上した、又は低減した）C1q結合及び/又は補体依存細胞毒性（CDC）をもたらすように、例えばWO99/51642に記載する通り、特定の改変をFc領域において行うことができる。同様にFc領域変異体の別の例に関わるDuncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988)；米国特許5,648,260；

50

米国特許 5,624,821; 及び WO 94/29351 も参照できる。

【0275】

(免疫コンジュゲート)

本発明はまた細胞毒性剤、例えば化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素(例えば細菌、カビ、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素又はそのフラグメント)又は放射性同位体(例えば放射性コンジュゲート)にコンジュゲートした抗体を含む免疫コンジュゲート又は抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)に関する。

【0276】

細胞毒性又は細胞生育阻害性の薬剤、即ち癌治療において腫瘍細胞を殺傷する薬剤(Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172; 米国特許 4,975,278)の局所送達のための抗体-薬剤コンジュゲートの使用は、理論的には、腫瘍への薬剤部分のターゲティングされた送達及びそこにおける細胞内蓄積を可能にし、その場合、これらのコンジュゲート薬剤の全身投与は正常細胞並びに排除しようとする腫瘍細胞に許容できない水準の毒性をもたらす可能性がある(Baldwinら、(1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pincheraら、(ed. s), pp. 475-506)。このため最小限の毒性で最大の薬効とすることが求められている。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はともにこれらの方策において有用であることが報告されている(Rowlandら、(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。これらの方法において使用されている薬剤はダウノルビシン、ドキソルビシン、メトトレキサート及びビンデシンである(Rowlandら、(1986) 上出)。抗体-毒素コンジュゲートにおいて使用される毒素は細菌性毒素、例えばジフテリア毒素、植物性毒素、例えばリシン、小分子毒素、例えばゲルダナマイシン(Mandlerら、(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandlerら、(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandlerら、(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、マイタンシノイド(EP1391213; Liuら、(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)及びカリケアマイシン(Lodeら、(1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinmanら、(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)を包含する。毒素は、チュプリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を包含する機序によりその細胞毒性及び細胞増殖阻害作用を示す。一部の細胞毒性剤は大型の抗体又は蛋白の受容体リガンドにコンジュゲートされると不活性化されるか、活性が低下する傾向を示す。

【0277】

ZEVARIN(登録商標)(イブリツモマブチウキセタン、Biogen/Idex)はチオ尿素リンカーキレーターにより結合された正常及び悪性のBリンパ球の表面上に存在するCD20抗原に対して指向されたマウスIgG1カッパモノクローナル抗体と<sup>111</sup>In又は<sup>90</sup>Y放射性同位体よりなる抗体-放射性同位体コンジュゲートである(Wisemanら、(2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wisemanら、(2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzigら、(2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzigら、(2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。ZEVARINはB細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)に対して活性を有す

10

20

30

40

50

るが、投与により重度及び長期間の血球減少症が大部分の患者において起こる。カリケアマイシンに連結された huCD33 抗体よりなる抗体薬剤コンジュゲートである MYLOTARG<sup>TM</sup> (ゲムツズマブオゾガマイシン、Wyeth Pharmaceuticals) は注射による急性骨髄性白血病の治療のために 2000 年に認可されている (Drugs of the Future (2000) 25 (7) : 686 ; 米国特許 4970198 ; 5079233 ; 5585089 ; 5606040 ; 5693762 ; 5739116 ; 5767285 ; 5773001)。マイタンシノイド薬剤部分 DM1 にジスルフィドリンカー-SPP を介して連結された huCD242 抗体よりなる抗体薬剤コンジュゲートである カンツズマブメトラシン (Immunogen, Inc.) は結腸癌、膵臓癌、胃癌及びその他のような CanAg を発現する癌の治療のための第 I I 相治験段階に入っている。マイタンシノイド薬剤部分 DM1 に連結された抗前立腺特異性膜抗原 (PSMA) モノクローナル抗体よりなる抗体薬剤コンジュゲートである MLN-2704 (Millennium Pharm, BZL Biologics, Immunogen Inc.) は前立腺癌の潜在的治療のために開発中である。オーリスタチンペプチド、オーリスタチン E (AE)、モノメチルオーリスタチン E (MMAE) 及びドラスタチンの合成類縁体はキメラモノクローナル抗体 cBR96 (癌腫上の Lewis Y に特異的) 及び cAC10 (血液悪性疾患上の CD30 に特異的) (Doronina ら、(2003) Nature Biotechnology 21 (7) : 778 - 784 ; 及び Francisco, ら、(2003) Blood, 102, 1458 - 1465) にコンジュゲートされており、そして治療薬開発中である。薬剤コンジュゲート細胞毒性剤としての使用のための他の化合物は、例えばオーリスタチン E (AE)、MMAF (薬剤の C 末端においてフェニルアラニンを含むオーリスタチン E (MMAE) の変異体) 及び AEVB (オーリスタチン E パレリルベンジルヒドラゾン、AE の C 末端を介した酸不安定性のリンカー) を包含する。抗体に薬剤を結合させるための有用なコンジュゲートリンカーは例えば MC (まれイミドカプロイル)、ValCit (バリン-シトルリン、プロテアーゼ切断性リンカーにおけるジペプチド部位)、シトルリン (2-アミノ-5-ウレイドペンタン酸)、PAB (p-アミノベンジルカルバモイル、リンカーの「自己犠牲型」部分)、Me (リンカーペプチド結合がカテプシン B によりその切断を防止するように修飾されている N-メチル-バリンシトルリン)、MC (PEG) 6-OH (抗体システインに結合したマレイミドカプロイル-ポリエチレングリコール)、SPP (N-スクシンイミジル 4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート) 及び SMCC (N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート) を包含する。これら及び他の有用な薬剤コンジュゲート及びその製造は例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる Doronina, S.O. ら、Nature Biotechnology 21 : 778 - 794 (2003) に開示されている。特に好ましいリンカー分子は例えば N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート (SPDP) (例えば Carlsson ら、Biochem. J., 173, 723 - 737 (1978) 参照)、N-スクシンイミジル 4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート (SPDB) (例えば米国特許 4,563,304 参照)、N-スクシンイミジル 4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート (SPP) (例えば CAS 登録番号 341498-08-6 参照)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC) (例えば Yoshitake ら、Eur. J. Biochem., 101, 395 - 399 (1979) 参照) 及び N-スクシンイミジル 4-メチル-4-[2-(5-ニトロピリジル)ジチオ]ペンタノエート (SMNP) (例えば米国特許 4,563,304 参照) を包含する。

#### 【0278】

このような免疫コンジュゲートの形成において有用な化学療法剤は上記の通りである。使用できる酵素的に活性な毒素及びそのフラグメントはジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、エキソトキシン A 鎖 (シュードモナス・アエルギノーサ由来)、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデシン A 鎖、アルファ-サルシン、Aleurite

s Fordii 蛋白、ジアンシン蛋白、Phytolaca americana 蛋白 (PAPI、PAPII 及び PAP-S)、momordica charantia 阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonaria officinalis 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテセンを包含する。種々の放射性核種が放射性コンジュゲート抗体の製造のために使用できる。例は  $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$  及び  $^{186}\text{Re}$  を包含する。抗体及び細胞毒性剤のコンジュゲートは種々の 2 官能性蛋白カップリング剤、例えば N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルチオ) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの 2 官能性誘導体 (例えばジメチルアジピミデート HCL)、活性エステル (例えばジスクシンイミジルズベレート)、アルデヒド (例えばグルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えばビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体 (例えばビス (p - ジアゾニウムベンゾイル) エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えばトルエン 2, 6 - ジイソシアネート) 及びビス活性フッ素化合物 (例えば 1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン) を用いて作成される。例えば、リシン免疫毒は Vitettaら、Science, 238: 1098 (1987) に記載の通り製造できる。炭素 - 14 - 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミノペンタ酢酸 (MX-DTPA) は抗体への放射性核種のコンジュゲーションのための例示されるキレート剤である。WO 94 / 11026 を参照できる。

10

20

## 【0279】

抗体及び 1 つ以上の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、マイタンシノイド、トリコテセン及び CC1065 及び毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体のコンジュゲートもまた本発明において意図している。

## 【0280】

(マイタンシン及びマイタンシノイド)

1 つの実施形態において本発明の抗体 (完全長又はフラグメント) は 1 つ以上のマイタンシノイド分子にコンジュゲートする。

## 【0281】

マイタンシノイドはチュブリン重合を阻害することにより機能する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは東アフリカの灌木である Maytenus serrata から最初に単離された (米国特許 3, 896, 111)。その後、特定の微生物もまたマイタンシノイド、例えばマイタンシノール及び C - 3 マイタンシノールエステルを生産することが発見された (米国特許 4, 151, 042)。合成のマイタンシノール及びその誘導体及び類縁体は例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許 4, 137, 230; 4, 248, 870; 4, 256, 746; 4, 260, 608; 4, 265, 814; 4, 294, 757; 4, 307, 016; 4, 308, 268; 4, 308, 269; 4, 309, 428; 4, 313, 946; 4, 315, 929; 4, 317, 821; 4, 322, 348; 4, 331, 598; 4, 361, 650; 4, 364, 866; 4, 424, 219; 4, 450, 254; 4, 362, 663; および 4, 371, 533 に開示されている。

30

40

## 【0282】

(マイタンシノイド - 抗体コンジュゲート)

その治療指数を向上させる試みにおいて、マイタンシン及びマイタンシノイドは腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体にコンジュゲートされている。マイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びその治療用途は例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許 5, 208, 020、5, 416, 064 及び欧州特許 EP 0 425 235 B1 に開示されている。Liuraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618 - 8623 (1996) はヒト結腸直腸癌に対して指向されたモノクローナル抗体 C242 に連結した DM1 と指名されたマイタンシノイドを含む免疫コンジュゲートを記載している。コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対しては高度に細胞毒性であることが

50



わかり、そしてインビボの腫瘍生育試験において抗腫瘍活性を示している。Chaririら、Cancer Research 52: 127-131 (1992)はヒト結腸癌細胞株上の抗原に結合するマウス抗体A7に、又は、HER-2/neu癌遺伝子に結合する別のマウスモノクローナル抗体にジスルフィドリンカーを介してマイタンシノイドをコンジュゲートしている免疫コンジュゲートを記載している。TA-1-マイタンシノイドコンジュゲートの細胞毒性は細胞当たり $3 \times 10^5$  HER-2表面抗原を発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3に対してインビトロで試験されている。薬剤コンジュゲートは有利のマイタンシノイド薬剤と同様の細胞毒性の程度を達成しており、これは抗体分子当たりのマイタンシノイド分子の数を増大させることにより増大させることができた。A7-マイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいて低い全身細胞毒性を示した。

10

## 【0283】

(抗体-マイタンシノイドコンジュゲート(免疫コンジュゲート))

抗体マイタンシノイドコンジュゲートは抗体又はマイタンシノイド分子の何れかの生物学的活性を有意に低下させること無くマイタンシノイド分子に抗体を化学的に連結することにより製造する。抗体分子当たり平均3~4個のマイタンシノイド分子をコンジュゲートすると抗体の機能又は溶解性に悪影響を及ぼすことなく標的細胞の細胞毒性を増強する場合に有効であることがわかっているが、1分子毒素/抗体であっても抗体単独の使用よりも細胞毒性を増強できることが期待される。マイタンシノイドは当該分野でよく知られており、そして知られた手法により合成するか、又は、天然原料から単離することができる。適当なマイタンシノイドは例えば米国特許5,208,020に、そして、上記した他の特許又は非特許の公開物に開示されている。好ましいマイタンシノイドはマイタンシノール及び芳香環において、又は、マイタンシノール分子の他の位置において修飾されているマイタンシノール類縁体、例えば種々のマイタンシノールエステルである。

20

## 【0284】

抗体-マイタンシノイドコンジュゲートを作成するための当該分野で知られた連結基は多数存在し、例えば米国特許5,208,020又は欧州特許EP0425235B1及びChaririら、Cancer Research 52: 127-131 (1992)に開示されているもの等が挙げられる。連結基は上記特許に開示されている通りジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチダーゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基を包含するが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

30

## 【0285】

抗体とマイタンシノイドのコンジュゲートは種々の2官能性蛋白カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの2官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCl)、活性エステル(例えばジスクシンイミジルズベレート)、アルデヒド(例えばグルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体(例えばビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えばトルエン2,6-ジイソシアネート)及びビス活性フッ素化合物(例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を用いて作成してよい。特に好ましいカップリング剤は、ジスルフィド結合を与えるためのN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)(Carlssonら、Biochem. J., 173, 723-737 (1978))及びN-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート(SPP)を包含する。

40

## 【0286】

リンカーは連結部の型に応じて種々の位置においてマイタンシノイド分子に結合してよい。例えば、エステル結合は従来のカップリング手法を用いてヒドロキシル基との反応により形成してよい。反応はヒドロキシル基を有するC3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC14位、ヒドロキシル基で修飾されたC15位及びヒドロキシル基を有するC20位において起こってよい。好ましい実施形態においては、連結はマイタンシノール又はマイ

50

タンシノール類縁体のC3位において形成される。

【0287】

(カリケアマイシン)

目的の免疫コンジュゲートの別のものはカリケアマイシン分子1つ以上にコンジュゲートした抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはピコモル未満の濃度において2本鎖DNA切断をもたらすことができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの製造に関しては米国特許5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001、5,877,296を参照することができる(全てAmerican Cyanamid Company)。使用してよいカリケアマイシンの構造的類縁体は例えば  $1^I$ 、 $2^I$ 、 $3^I$ 、N-アセチル- $1^I$ 、PSAG及び $1^I$  (Himmanら、Cancer Research 53:3336-3342(1993)、Lodeら、Cancer Research 58:2925-2928(1998)及び上記したAmerican Cyanamidへの米国特許)。抗体をコンジュゲートできる別の抗腫瘍剤は抗葉酸エステルであるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは両方とも細胞内作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。従って、抗体媒介内在を介したこれらの薬剤の細胞内取り込みはその細胞毒性作用を大きく増大させる。

10

【0288】

(他の細胞毒性剤)

本発明の抗体にコンジュゲートできる他の抗腫瘍剤はBCNU、ストレプトゾシン、ビクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許5,053,394、5,770,710に記載の総称LL-E33288複合体として知られる薬剤ファミリー、並びに、エスペラマイシン(米国特許5,877,296)を包含する。

20

【0289】

使用できる酵素的に活性な毒素及びそのフラグメントは、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、エキソトキシンA鎖(シュードモナス・アエルギノーサ由来)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、Aleurites fordii蛋白、ジアンシン蛋白、Phytolacca americana蛋白(PAPI、PAPII及びPAP-S)、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテセンを包含する。例えば1993年10月28日に公開されたWO93/21232を参照できる。

30

【0290】

本発明は更に抗体と核溶解活性を有する化合物との間に形成される免疫コンジュゲートを意図している(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ;DNase)。

【0291】

腫瘍の選択的破壊のためには、抗体は高度に放射性の原子を含んでよい。種々の放射性同位体が放射性コンジュゲート抗体の製造のために使用される。例示されるものは $At^{213}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$ 及びLuの放射性同位体を包含する。検出のためにコンジュゲートを使用する場合は、それはシンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば $tc^{99m}$ 又は $I^{123}$ 、又は核磁気共鳴(NMR)画像化(磁気共鳴画像化mriとしても知られている)のためのスピン標識、例えばヨウ素-123、更にヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含んでよい。

40

【0292】

放射標識又は他の標識を知られた方法でコンジュゲートに取り込ませてよい。例えば、水素の代わりにフッ素-19を含む適当なアミノ酸前駆体を用いながら、ペプチドを生合

50

成するか、又はアミノ酸化学合成法により合成してよい。tc<sup>99m</sup>又はI<sup>123</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>及びIn<sup>111</sup>のような標識をペプチド内のシステイン残基を介して結合することができる。イットリウム-90はリジン残基を介して結合できる。IODOGEN法(Frakerら、(1978)Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)を用いてヨウ素-123を取り込むことができる。Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy(Chatal, CRC Press 1989)は他の方法を詳細に説明している。

#### 【0293】

抗体と細胞毒性剤のコンジュゲートは種々の2官能性の蛋白カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの2官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCl)、活性エステル(例えばジスクシンイミジルズベレート)、アルデヒド(例えばグルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体(例えばビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えばトルエン2,6-ジイソシアネート)及びビス活性フッ素化合物(例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を用いて作成してよい。例えば、リシン免疫毒はVitettaら、Science, 238:1098(1987)に記載の通り製造できる。炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミノペンタ酢酸(MX-DTPA)は抗体への放射性核種のコンジュゲーションのための例示されるキレート剤である。WO94/11026を参照できる。リンカーは細胞内での細胞毒性剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってよい。例えば酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chariら、Cancer Research 52:127-131(1992);米国特許5,208,020)を使用してよい。

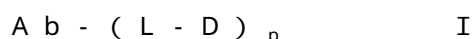
#### 【0294】

本発明の化合物は例えば、市販されている(例えばPierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A.より)交差結合剤:BMP S、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC及びスルホ-SMPB及びSVSB(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート)を用いて製造されたADCも意図している。例えば2003-2004 Applications Handbook and Catalog, p467-498を参照できる。

#### 【0295】

(抗体薬剤コンジュゲートの製造)

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ADC)においては、抗体(Ab)を1つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体当たり約1~約20薬剤部分にリンカー(L)を介してコンジュゲートする。式I:



のADCは、数種類の経路により、当業者の知る有機化学の反応、条件及び試薬を用いながら、例えば(1)共有結合を介したAb-Lを形成するための2価リンカー試薬との抗体の親核基の反応、及び、その後の薬剤部分Dとの反応;及び(2)共有結合を介したD-Lを形成するための2価リンカー試薬との薬剤部分の親核基の反応、及び、その後の抗体の親核基との反応、により製造してよい。

#### 【0296】

抗体上の親核基は例えば、(i)N末端アミン基、(ii)側鎖アミン基、例えばリジン、(iii)側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv)糖ヒドロキシル又はアミノ基であって抗体がグリコシル化されるところを包含する。アミン、チオール及びヒド

ロキシル基は親核性であり、(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート及び酸ハライド；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基を包含するリンカー部分及びリンカー試薬上の親電子基と共有結合を形成するように反応することができる。特定の抗体は還元性の鎖間ジスルフィド、即ちシステイン架橋を有する。抗体はDTT（ジチオスレイトール）のような還元剤による処理によりリンカー試薬とのコンジュゲーションのために反応性としてよい。即ち各システイン架橋は理論的には2つの反応性チオール親核物質を形成することになる。2-イミノチオラン（Traut試薬）とのリジンの反応を介して抗体に別の親核基を導入することができ、これによりアミンからチオールへの変換がもたらされる。

10

## 【0297】

本発明の抗体薬剤コンジュゲートはまたリンカー試薬又は薬剤上の親核性置換基と反応することができる親電子部分を導入するための抗体の修飾により製造してもよい。グリコシル化抗体の糖は例えば過ヨウ素酸塩の酸化剤で酸化することによりアルデヒド又はケトン基とし、これをリンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応させてよい。形成されるイミンシッフ塩基の基は安定な連結部を形成するか、又は、例えばボロハイドライド試薬で還元することにより、安定なアミン連結部を形成してよい。1つの実施形態において、ガラクトースオキシダーゼ又はm-過ヨウ素酸ナトリウムの何れかとのグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により薬剤上の適切な基と反応できる蛋白中のカルボニル（アルデヒド又はケトン）基を形成してよい（Hermanson, *Bioconjugate Techniques*）。別の実施形態においては、N末端セリン又はスレオニン残基を含有する蛋白をm-過ヨウ素酸ナトリウムと反応させることにより、第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドの形成を行う（Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146；米国特許5362852）。このようなアルデヒドは薬剤部分又はリンカー親核物質と反応することができる。

20

## 【0298】

同様に、薬剤部分上の親核基は、例えば、(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート及び酸ハライド；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基を包含するリンカー部分及びリンカー試薬上の親電子基と共有結合を形成するように反応することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアンヒドラジド基を包含する。

30

## 【0299】

或いは、抗体及び細胞毒性剤を含む融合蛋白、例えば組み換え手法又はペプチド合成により、作成してよい。DNAの長さは、相互に隣接するか、又は、コンジュゲートの所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により分断されたコンジュゲートの2つの部分をコードする各々の領域を含む。

## 【0300】

更に別の実施形態においては、抗体は腫瘍のプレターゲティングにおいて利用するための「受容体」（例えばストレプトアビジン）にコンジュゲートしてよく、その場合、抗体-受容体コンジュゲートを患者に投与し、その後、キレート剤を用いて循環系から未結合のコンジュゲートを除去し、そして次に細胞毒性剤（例えば放射性核種）にコンジュゲートされた「リガンド」（例えばアビジン）を投与する。

40

## 【0301】

（抗体誘導体）

本発明の抗体誘導体は、当該分野で知られ容易に入手できる別の非蛋白性部分を含有するように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適する部分は水溶性重合体である。水溶性重合体の非限定的な例は、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デ

50

キストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1, 3 - ジオキソラン、ポリ - 1, 3, 6 - トリオキソラン、エチレン / 無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（単独重合体又はランダム共重合体の何れか）及びデキストラン又はポリ（*n* - ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、プロピレンオキシド / エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはその水中での安定性のために製造において好都合である。重合体は何れかの分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合する重合体の数は変動してよく、そして、1つより多い重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であることができる。一般的に、誘導体化に使用する重合体の数及び / 又は種類は、例えば向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体を特定の条件下の治療に使用するのが等を考慮しながら決定することができる。

10

## 【0302】

(医薬品製剤)

本発明の抗体を含む治療用製剤は、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥した製剤の形態において、任意の生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）に所望の程度の純度を有する抗体を混合することにより保存用に製造される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は使用される用量及び濃度においてレシピエントに非毒性であり、そして、緩衝物質、例えばリン酸塩、酢酸塩、ヒスチジン又は他の有機酸；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸及びメチオニン；保存料（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；セタノール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - ペンタノール；及び*m* - クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；蛋白、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性重合体、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；単糖類、2糖類及び他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース又はデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属複合体（例えばZn - 蛋白複合体）；及び / 又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>又はポリエチレングリコール（PEG）を包含する。

20

30

## 【0303】

本発明の製剤は又、治療すべき特定の適応症のために必要に応じて1つより多い活性化合物、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない補完的な活性を有するものを含有してよい。このような分子は適宜、意図する目的のために有効である量において、組み合わせて存在する。

## 【0304】

活性成分はまた例えばコアセルベーション法によるか、又は、界面重合により製造されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（例えばリポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中、又はマクロエマルジョン中に捕獲させてもよい。このような手法はRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に記載されている。

40

## 【0305】

インピボ投与のために使用されるべき製剤は滅菌されていなければならない。これは滅菌濾過メンブレンを通過する濾過により容易に達成される。

## 【0306】

50

持続放出製剤を製造してよい。持続放出製剤の適当な例は本発明の免疫グロブリンを含む固体疎水性重合体の半透過性マトリックスを包含し、そのようなマトリックスは形状付与された物品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えばポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許3,773,919）、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、例えばLUPRON DEPOSIT<sup>TM</sup>（乳酸-グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドよりなる注射可能な微小球）及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸を包含する。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸のような重合体は100日間にわたる分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルはより短い時間に蛋白を放出する。カプセル化免疫グロブリンが身体内に長時間残存する場合、それらは、37の水分への曝露の結果として、変性するか凝集し、生物学的活性を消失するか、又は、免疫原性が変化する可能性がある。合理的な方策は関与する機序に応じて安定化のために考案することができる。例えば、凝集の機序がチオ-ジスルフィド交換を介した分子間S-S結合の形成であることが発見されれば、スルフィドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加物の使用、及び、特定の重合体マトリックス組成物の開発により安定化を達成してよい。

10

### 【0307】

（用途）

本発明の抗体は例えばインビトロ、エクスピボ及びインピボの治療方法において使用してよい。本発明の抗体はインビトロ、エクスピボ及びインピボで特定の抗原の活性を部分的又は完全にブロックするための拮抗剤として使用できる。更に又、本発明の抗体の少なくとも一部は他の種由来の抗原の活性を中和することができる。従って、本発明の抗体は例えば抗原を含有する細胞培養物において、ヒト被験体において、又は、本発明の抗体が交差反応する抗原を有する他の哺乳類被験体（例えばチンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザル及びアカゲザル、ブタ又はマウス）において、特定の抗原活性を阻害するために使用できる。1つの実施形態において、本発明の抗体は抗原活性が阻害されるように抗原に抗体を接触させることにより抗原活性を阻害するために使用できる。好ましくは、抗原はヒト蛋白分子である。

20

### 【0308】

1つの実施形態において、本発明の抗体は、抗原活性が有害であるような障害に罹患した被験体において、被験体における抗原活性が阻害されるように本発明の抗体を被験体に投与することを含む抗原を阻害するための方法において使用することができる。好ましくは、抗原はヒト蛋白分子であり、そして被験体はヒト被験体である。或いは、被験体は本発明の抗体が結合する抗原を発現する哺乳類であることができる。更に又、被験体は抗原が導入されている（例えば抗原の投与によるか、又は、抗原トランスジェンの発現による）哺乳類であることができる。本発明の抗体は治療目的のためにヒト被験体に投与することができる。更に又、本発明の抗体は獣医科用途のため、又は、ヒト疾患の動物モデルとしての、免疫グロブリンが交差反応する抗原を発現する非ヒト哺乳類（例えば霊長類、ブタ又はマウス）に投与できる。後者に関しては、そのような動物モデルは本発明の抗体の治療薬効を評価する（例えば用量及び投与の時間的過程の試験）ために有用である。治療上有益な本発明のブロッキング抗体は、例えば抗HER2、抗VEGF、抗IgE、抗CD11、抗インターフェロン及び抗組織因子の抗体を包含する。本発明の抗体は抗原分子の1つ以上の異常な発現及び/又は活性に関連する疾患、障害又は状態、例えば悪性及び良性の腫瘍；非白血病性及びリンパ性の悪性疾患；ニューロン、神経膠、星状細胞、視床下部及び他の腺、マクロファージ、上皮、間質性及び胞胚腔の障害；及び炎症性、血管形成及び免疫学的な障害の治療、阻害、進行の遅延、再発の防止/遅延、軽減又は防止のために使用することができる。

30

40

### 【0309】

1つの特徴において、本発明のブロッキング抗体はリガンド抗原に特異的であり、そし

50

て、リガンド抗原が関与するリガンド - 受容体相互作用をブロックするか、これに干渉することにより抗原活性を阻害し、これにより、相当するシグナル経路及び他の分子又は細胞の事象を阻害することができる。本発明は更に、必ずしもリガンド結合を防止しないが受容体の活性化に干渉し、これにより通常ではリガンド結合により開始される何れかの応答を阻害する受容体特異的抗体を特徴とする。本発明は又、リガンド - 受容体複合体に優先的又は排他的に結合する抗体を包含する。本発明の抗体はまた特定の抗原受容体のアゴニストとして機能することができ、これによりリガンド媒介受容体活性化の全て又は部分的な活性を強化、増強又は活性化する。

#### 【0310】

特定の実施形態においては、細胞毒性剤とコンジュゲートした抗体を含む免疫コンジュゲートを患者に投与する。一部の実施形態においては、免疫コンジュゲート及び/又はそれが結合する抗原は、細胞により内在化され、それが結合する標的細胞の殺傷において、免疫コンジュゲートの増大した治療薬効をもたらす。1つの実施形態において、細胞毒性剤は標的細胞内の核酸をターゲティングするか、又は、それに干渉する。そのような細胞毒性剤の例は本明細書に記載した化学療法剤の何れか（例えばマイタンシノイド又はカリケマイシン）、放射性同位体、又は、リボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼを包含する。

10

#### 【0311】

本発明の抗体は治療において単独で、又は、他の組成物と組み合わせて使用できる。例えば、本発明の抗体は他の抗体、化学療法剤（化学療法剤のカクテルを包含する）、他の細胞毒性剤、抗血管形成剤、サイトカイン及び/又は成長阻害剤と同時投与してよい。本発明の抗体が腫瘍の生育を阻害する場合、やはり腫瘍生育を阻害する他の治療薬1つ以上とそれを組み合わせることが特に望ましい場合がある。例えば、本発明の抗体は投与スキームにおいて、例えば本明細書に記載した疾患の何れか、例えば結腸直腸癌、転移性乳癌及び腎臓癌の治療において、抗VEGF抗体（例えばAVASTIN）及び/又は抗ErbbB抗体（例えばHERCEPTIN（登録商標）抗HER2抗体）と組み合わせてよい。或いは、又は追加的に、患者は複合放射線療法を受けてよい（例えば体外からの放射線照射又は放射標識薬剤、例えば抗体を用いた治療）。上記したこのような複合療法は複合投与（2種以上の薬剤を同じ、又は別個の製剤中に含有させる）及び本発明の抗体の投与を副次的治療の投与の前、及び/又は後に行う個別投与を包含する。

20

30

#### 【0312】

本発明の抗体（及び副次的治療薬）は何れかの適当な手段、例えば非経口、皮下、腹腔内、肺内及び鼻内、及び、所望により局所投与、患部内投与により投与される。非経口注入は筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与を包含する。更に又、抗体は適宜、特に抗体の漸減用量によるパルス注入により投与される。投薬は何れかの適当な経路、例えば注射、例えば静脈内又は皮下注射により行うことができ、これは部分的には投与が短期であるか長期であるかにより決まる。

#### 【0313】

本発明の抗体組成物は良好な医療上の慣行に合致した態様において製剤され、容量決定され、そして投薬される。この観点において考慮すべき要因は、治療すべき特定の障害、治療すべき特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与日程及び医療従事者が知る他の要因を包含する。抗体は必然ではないが場合より問題となる障害の防止又は治療のために現在使用中の薬剤1つ以上とともに製剤される。そのような他剤の有効量は製剤中に存在する本発明の抗体の量、障害又は治療の種類及び上記した他の要因に応じたものである。これらは一般的には以前に使用されていたものと同じ用量及び投与経路において、又は、以前に使用されていた用量の1~99%で使用される。

40

#### 【0314】

疾患の予防又は治療のためには、本発明の抗体の適切な用量（単独使用、又は、化学療法剤のような他剤との組み合わせにおいて）は治療すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患

50

の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び抗体に対する応答性、及び担当医の判断に応じて変動する。抗体は適宜、患者に対し、単回、又は一連の治療に渡って投与する。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、抗体約  $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$  (例えば  $0.1 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ ) が患者への投与のための初期候補用量である。1つの典型的な一日当たり用量は上記した要因に応じて約  $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$  以上の範囲である。数日間以上に渡る反復投与の場合には、状態に応じて、投与は所望の疾患症状の阻害が起こるまで持続する。1つの例示される抗体用量は約  $0.05 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$  の範囲である。即ち、約  $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $4.0 \text{mg} / \text{kg}$  又は  $10 \text{mg} / \text{kg}$  の1つ以上の用量 (又はこれらの何れかの組み合わせ) を患者に投与してよい。このような用量は間歇的に、例えば毎週又は3週毎 (例えば患者が約2～約20、例えば約6抗体投薬を受けるように) 投与してよい。初期の高値の負荷用量の後、1つ以上の低用量を投与してよい。例示される用量用法は約  $4 \text{mg} / \text{kg}$  の初期負荷用量を投与した後、抗体約  $2 \text{mg} / \text{kg}$  の週当たり維持用量を含む。しかしながら、他の用量用法も使用してよい。この治療法の進行は従来の手法及び試験により容易にモニタリングされる。

10

## 【0315】

(製造物品)

本発明の別の特徴において、上記した疾患の治療、予防及び/又は診断のために有用な物質を含有する製造物品が提供される。製造物品は容器及び容器上又はそれに伴ったラベル又はパッケージインサートを含む。適当な容器は例えばビン、バイアル、シリンジ等を包含する。容器は種々の材料、例えばガラス又はプラスチックから形成してよい。自身、又は他の組成物と組み合わせた場合に状態の治療、予防及び/又は診断に有効となる組成物を容器が保持しており、そして滅菌された接触口を有してよい (例えば容器は静脈内投与用の溶液バッグ又は皮下注射針により穿刺可能な蓋つきのバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも1つの活性剤は本発明の抗体である。ラベル又はパッケージインサートは組成物が例えば癌のような選択された状態の治療のために使用されることを示す。更に又、製造物品は (a) その中に含有される組成物の入った第1の容器、ここで組成物は本発明の抗体を含むもの、及び (b) その中に含有される組成物の入った第2の容器、ここで組成物は別の細胞毒性剤を含むもの、を含んでよい。本発明のこの実施形態における製造物品は更に第1及び第2の抗体組成物を例えば癌のような特定の状態の治療のために使用できることを示すパッケージインサートを含んでよい。或いは、又は追加的に、製造物品は更に製薬上許容しうる緩衝液、例えば注射用殺菌水 (BWF I)、リン酸塩緩衝食塩水、リンゲル液及びデキストロス溶液を含む第2 (又は第3) の容器を含んでよい。それは更に商業上又は使用者の観点から望ましい他の物質、例えば他の緩衝物質、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含んでよい。

20

30

## 【0316】

以下に本発明の方法及び組成物の例を示す。上記した一般的説明が与えられたとすれば種々の他の実施形態が実施されてよいことが当然理解される。

## 【実施例】

40

## 【0317】

本明細書の実施例はアルファ4ベータ7インテグリンのベータ7サブユニットに結合するラット抗マウス抗体からのヒト化抗ベータ7抗体の形成を説明する。

## 【0318】

(実施例1: ベータ7拮抗剤抗体のヒト化)

(材料及び方法)

残基の番号は Kabat に従う (Kabat, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。1文字アミノ酸

50



略記法を用いる。D A N縮重はI U Bコードを用いて表示する（N = A / C / G / T、D = A / G / T、V = A / C / G、B = C / G / T、H = A / C / T、K = G / T、M = A / C、R = A / G、S = G / C、W = A / T、Y = C / T）。

【0319】

アクセプターヒトコンセンサスフレームワークへの直接超可変領域グラフト - この作業に用いたファージミド p V O 3 5 0 - 2 b は本質的に Lee ら、J . M o l . B i o l . ( 2 0 0 4 ) , 3 4 0 ( 5 ) : 1 0 7 3 - 9 3 に記載の通り p h o A プロモーターの制御下の 2 オープンリーディングフレームを有する 1 価の F a b - g 3 ディスプレイベクターとした。第 1 のオープンリーディングフレームはアクセプター軽鎖の V L 及び C H 1 ドメインに融合した s t I I シグナル配列よりなり、第 2 のものはアクセプター重鎖の V H および C H 1 ドメインに縮合した s t I I シグナル配列とそれに続く小型のファージ被膜蛋白 P 3 のトランケーション型よりなるものである ( L o w m a n , H . ら、( 1 9 9 0 ) B i o c h e m i s t r y 3 0 : 1 0 8 3 2 ) 。

10

【0320】

ラット F i b 5 0 4 ( ハイブリドーマ A T C C H B - 2 9 3 により生産された抗体 F I B 5 0 4 . 6 4、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ( A T C C ) , P . O . B o x 1 5 4 9 , M a n a s s a s , V A 2 0 1 0 8 , U S A ) 由来の V L 及び V H ドメインをヒトコンセンサス ユーパイ I ( h u K I ) 及びヒトサブグループ I I I コンセンサス V H ( h u I I I ) ドメインとアラインさせた。超可変領域 ( H V R ) グラフトを作成するために、以下のフレームワークに使用した。即ち、H u K I は軽鎖可変ドメインフレームワークについて使用した ( 図 1 A 及び 7 参照 ) 。重鎖可変ドメインフレームワーク、アクセプター V H フレームワークについては、3 位置 : R 7 1 A、N 7 3 T 及び L 7 8 A において h u m I I I 配列から異なっている修飾ヒトサブグループ I I I ( h u m I I I ) コンセンサス V H ドメインを使用してよい ( C a r t e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 4 2 8 5 ( 1 9 9 2 ) 参照 ) ( 図 1 B 参照 ) 。本発明の抗体の生成においては、5 0 4 K - R F グラフトはまた、以下のアミノ酸置換 : A 7 1 R 及び A 7 8 F を行うことにより修飾ヒトサブグループ I I I コンセンサス V H ドメインから製造した。

20

【0321】

ラット F i b 5 0 4 ( ハイブリドーマ A T C C H B - 2 9 3 により生産 ) 抗体由来の超可変領域を操作してアクセプターヒトサブグループ I I I コンセンサス V H フレームワーク内にいれ、直接の H V R - グラフト ( F i b 5 0 4 グラフト ) を形成した ( 図 1 B 参照 ) 。V L ドメインにおいては、ラット F i b 5 0 4 由来の以下の領域、即ち位置 2 4 - 3 4 ( L 1 )、5 0 - 5 6 ( L 2 ) 及び 8 9 - 9 7 ( L 3 ) をヒトコンセンサスアクセプター h u K I にグラフトした ( 図 1 A ) 。V H ドメインにおいては、位置 2 6 - 3 5 ( H 1 )、4 9 - 6 5 ( H 2 ) 及び 9 4 - 1 0 2 ( H 3 ) をグラフトした ( 図 1 B ) 。更に、第 2 の H V R - グラフト、F i b 5 0 4 K グラフトを、L 2 の拡張定義に基づいて H V R 内に V L 4 9 位を含むように構築した ( M a c C a l l u m ら、J . M o l . B i o l . 2 6 2 : 7 3 2 - 7 4 5 ( 1 9 9 6 ) 参照 ) 。M a c C a l l u m 等は抗体及び抗原の複合体の結晶構造を分析しており、そして軽鎖の 4 9 位及び重鎖の 4 9 位及び 9 4 位が抗原接触領域の部分であり、従ってこれらの位置が本明細書に開示したヒト化抗ペータ 7 抗体に関する H V R - L 2、H V R - H 2 及び H V R - H 3 の定義内に包含されることを発見した。

30

40

【0322】

直接グラフト変異体は各超可変領域について別個のオリゴヌクレオチドを使用しながら K u n k e l 突然変異誘発 ( K u n k e l ら、( 1 9 8 7 ) 上出 ) により形成した正しいクローンを D N A 配列決定により評価した。

【0323】

( 超可変領域のソフトランダム化 ( s o f t r a n d o m i z a t i o n ) )

「ソフトランダム化」( 米国特許出願 6 0 / 5 4 5 , 8 4 0 参照 ) の工程は抗体の超可

50

変領域のような選択された蛋白配列のバイアスした突然変異誘発のための操作法を指す。方法はマウス、ラット又は他の出発超可変領域配列へのバイアスを維持しつつ、約10～50パーセントの突然変異を各選択位置において導入する。この手法は使用されるライブラリ配列の容量を増大させ、そして抗体により認識される抗原エピトープの変化を回避する。このソフトランダム化手法によれば、マウス超可変領域配列へのバイアスを維持する方策を用いながら、配列の多様性が各超可変領域に導入される。これはGallopら、*J. Med. Chem.* 37: 1233-1251 (1994)により最初に報告された位置決めオリゴヌクレオチド合成法を用いて達成された。しかしながら、非ヒト超可変領域残基への変更を維持するための他の方法、例えば誤りがちのPCR、DNAシャフリング等も使用される。

10

**【0324】**

ここで使用する方法に従えば、突然変異すべき超可変領域内のある位置について、野生型アミノ酸をコードするコドンヌクレオチドの混合物(例えば70-10-10-10混合物)とともに位置づけることにより、各選択された超可変領域位置において約50%の突然変異がもたらされる。これを達成するためには、ヌクレオチドの70-10-10-10混合物のような他の3ヌクレオチドの夾雑物混合物を低濃度としながら突然変異すべき野生型超可変領域アミノ酸をコードするコドンヌクレオチドを合成する。即ち、例えば、PRO(CCG)のソフトランダム化のためには、合成された第1の位置は70%のC及び各々10%のG、T及びAの混合物であり;第2の位置は70%のC及び各々10%のA、G及びTの混合物であり;そして第3の位置は70%のG及び各々10%のA、C及びTの混合物である。バイアスは所定の位置において合成されるコドン、特定のアミノ酸をコードするコドンの数、及び、合成混合物のヌクレオチド組成によりオリゴヌクレオチド合成が位置付けられる程度に応じて上方又は下方に調節できると考えられる。

20

**【0325】**

ソフトランダム化オリゴヌクレオチドはマウス、ラット又は他の出発超可変領域配列に続いてパターン化することができ、そして直接の超可変領域グラフトにより定義される同じ領域を包含する。場合により、2位置、VHドメインのH2及びH3の始点のアミノ酸はその多様性が限定されてよく:コドンRGCはA、G、S又はTをコードする49位について使用してよく、そして94位においてはM又はRをコードするコドンAKGを使用してよい。

30

**【0326】**

ファージライブラリの作成 - 各超可変領域について設計されたランダム化オリゴヌクレオチドプールを37で1時間、オリゴヌクレオチド660ng、50mMトリスpH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM ATP、20mM DTT及び5Uポリヌクレオチドキナーゼを含有する6点の20μl反応物において別個にホスホリル化した。次に6点のホスホリル化オリゴヌクレオチドプールを最終容量500μlとなるように50mMトリスpH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>中においてKunkel鑄型20μgと合わせ、オリゴヌクレオチドの鑄型に対する比を3とした。混合物を90で4分、50で5分アニーリングし、次に氷上で冷却した。過剰の未アニーリングオリゴヌクレオチドは、アニーリングしたDNAの過剰な変性を防止するために改良されたプロトコルを用いながらQIAQUICK™ PCR精製キット(Qiagenキット28106、Qiagen, Valencia, CA)で除去した。アニーリング混合物500μlにQiagen緩衝液PB150μlを添加し、そして混合物を2本のシリカカラムの間にスプリットした。Qiagen緩衝液PE750μlで各カラムを洗浄し、カラムを乾燥させるために過剰に回転させた後、各カラムを110μlの10mMトリス、1mM EDTA、pH8で溶出させた。次に、室温で3時間1μlの100mM ATP、10μlの25mM dNTP類(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPの各々25mM)、15μlの100mM DTT、25μlの10XTM緩衝液(0.5MトリスpH7.5、0.1MMgCl<sub>2</sub>)、2400UのT4リガーゼ、及び30UのT7ポリメラーゼを添加することにより、アニーリングして洗浄した鑄型(220μl)をフィルインした。

40

50

## 【0327】

フィルイン産物はトリス - 酢酸 - EDTA / アガロースゲル上で分析した (Sidhu ら、Methods in Enzymology 328:333-363 (2000))。3つのバンドが通常は観察され、最下部のバンドは正しくフィルインされ、ライゲーションされた産物であり、中央のバンドはフィルインされたが未ライゲーションであり、そして最上部のバンドは排除された鎖である。最上部のバンドはT7ポリメラーゼの内因性の副次的活性により生成し、そして回避することは困難である (Lechner ら、J. Biol. Chem. 258:11174-11184 (1983)) が ; しかしながら、このバンドは最下部のバンドより30倍低値の効率でしかトランスフォームされず、通常はライブラリには殆ど影響しない。中央のバンドは最終ライゲーション反応のための5'ホスフェートが存在しないことに起因するものであり ; このバンドは効率的にトランスフォームされ、主に野生型配列を与える。

10

## 【0328】

次にSidhu ら、Methods in Enzymology 328:333-363 (2000) に記載の通りフィルイン産物を洗浄し、SS320細胞へのエレクトロポレーションに付し、そしてM13/KO7ヘルパーファージの存在下に増殖させた。ライブラリのサイズは $1 \sim 2 \times 10^9$  独立クローンの範囲であった。初期ライブラリ由来のランダムクローンはライブラリの品質を評価するために配列決定した。

## 【0329】

ファージ選択 - 抗全長ヒトインテグリンアルファ4ベータ7を293細胞 (Graham ら、J. Gen. Virol. 36:59 (1997)) において発現させ、Fib504アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、そしてファージ選択のための標的として使用した。MaxiSorp<sup>TM</sup> マイクロプレート (Nalge Nunc, Rochester, NY) 上の固定化のために、100  $\mu$ l のヒトインテグリンアルファ4ベータ7を4 で一夜、150 mM NaCl、50 mM トリス pH 7.5、2 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 2 mM MnCl<sub>2</sub> (TBSSM) 中 5  $\mu$ g/ml となるようにコーティングした。ウェルを1% BSA を含有するTBSSMを用いて1時間ブロッキングした。選択の第1回目では標的でコーティングした8ウェルを使用し ; 標的コーティングウェル1枚を次の回の選択用に用いた。ファージは培養上澄みから回収し、1% BSA 及び 0.05% TWEEN<sup>TM</sup> 20 を含有するTBSSM (TBSSMBT) 中に懸濁した。2時間ウェルに結合させた後、未結合のファージを0.05% TWEEN 20 含有TBSS (TBSS T) で十分洗浄することにより除去した。結合ファージは、ウェルを100 mM HC1 で30分間インキュベートすることで溶出する。Top10細胞及びM13/KO7ヘルパーファージを用いながらファージを増幅し、そして2YT、50  $\mu$ g/ml カルバナシリン中37 で一夜生育させた。標的コーティングウェルから溶出したファージの力価を非標的コーティングウェルから回収したファージの力価と比較することにより濃縮を評価した。4回の選択を行った後、ランダムクローンを選択して配列分析に付した。

20

30

## 【0330】

Fab生産及びアフィニティー測定 - 親和性測定のためのFab蛋白を発現するためにファージディスプレイベクターの重鎖とg3の間に停止コドンを導入した。クローンはE.coli 34B8細胞に形質転換し、30 でAP5培地中生育させた (Presta, L. ら、Cancer Res. 57:4593-4599 (1997))。細胞を遠心分離により回収し、10 mM トリス、1 mM EDTA pH 8 に懸濁し、マイクロフルイダイザーを用いて崩壊させた。FabはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

40

## 【0331】

親和性の測定はBIAcore<sup>TM</sup> - 3000 (Biacore, Piscataway, NJ) を用いた表面プラズモン共鳴試験により行った。ヒト化Fib504Fab変異体をCM5センサーチップ上に10 mM 酢酸塩 pH 4.5 中で固定化 (250 ~ 150

50

0 応答単位 (RU) の範囲) し、そして 2% n - オクチルグルコシド含有 TBSM 中のヒトインテグリンアルファ 4 ベータ 7 の 2 倍希釈物を注入した。各試料は 5 分間の会合及び 5 ~ 60 分間の解離時間で分析した。各注入の後、8 M 尿素の 1 分間注射 3 回を用いてチップを再生した。結合応答はブランクのフローセルから RU を差し引くことにより補正した。 $k_{on}$  及び  $k_{off}$  の同時フィットの 1 対 1 ロングミュアモデルを用いて速度論的分析を行った。

### 【0332】

(結果及び考察)

ラット Fib 504 のヒト化 - ヒト化のために使用したヒトアクセプターフレームワークは HERCEPTIN (登録商標) のために使用したフレームワークに基づいており、  
 10  
 (humIII) コンセンサス VH ドメイン及びヒトサブグループ III (humIII) コンセンサス VH ドメインの変異体よりなるものである。この変異体 VH ドメインはヒトコンセンサスからの 3 つの変化、即ち R71A、N73T 及び L78A を有する。ラット Fib 504 の VL 及び VH ドメインを各々ヒトカップ I 及びサブグループ III ドメインとアラインし; 各超可変領域 (HVR) を発見し、そしてヒトアクセプターフレームワークにグラフトし、ファージ上の Fab として提示され得る HVR グラフト (504 グラフト) を形成した (図 1 A 及び 1 B)。

### 【0333】

使用可能な抗体及び抗原の複合体の結晶構造に基づいて、MacCallum 等 (MacCallumら、J. Mol. Biol. 262: 732 - 745 (1996)) は頻  
 20  
 繁に抗原と接触する可変ドメイン残基に基づいた HVR の定義を提案している。即ち、重鎖の位置 49G 及び 94M を Fib 504 の HVR グラフト内に包含させた (図 1 B)。更に又、第 2 の HVR グラフトである Fib 504 K グラフトもまた、軽鎖の位置 49K がやはり HVR - L2 の接触定義内にあり、そして抗原接触部として機能することができるため、この位置を含むように作成した (図 1 A)。Fib 504 又は Fib 504 K グラフトの何れかがファージ上に提示された場合に固定化アルファ 4 ベータ 7 への結合に関して試験したが結合は観察されなかった。

### 【0334】

Fib 504 及び Fib 504 - KHVR グラフトの両方を用いて HVR 領域の各々が  
 30  
 同時にソフトランダム化されるようにライブラリを作成した。各 HVR グラフトライブラリは選択 4 回について固定化されたアルファ 4 ベータ 7 に対して選別した。濃縮は観察されず、そして DNA 配列分析のために採取されたクローンは 6 つの HVR 領域にターゲティングされたランダム配列変化のみを提示した。

### 【0335】

2 つのさらなる VH フレームワーク配列である「RL」及び「RF」をアクセプターフレームワークとして調べたところ、71 位及び 78 位に変化を含有していた。71 位はヒトサブグループ III コンセンサスの場合と同様にアルギニンに変化しており、そして 78 位はヒトサブグループ III コンセンサスの場合と同様にロイシン (アクセプターフレームワーク「RL」) 又はヒトサブグループ III コンセンサス及びラット Fib 504 VH  
 40  
 フレームワークの場合と同様にフェニルアラニン (アクセプターフレームワーク「RF」) に変化していた (図 10 A)。「RL」(Fib 504 - RL 及び Fib 504 K - RL) 又は「RF」(Fib 504 - RF 及び Fib 504 K - RF) アクセプターフレームワーク内の Fib 504 又は Fib 504 K の何れかがファージ上に提示された場合には固定化アルファ 4 ベータ 7 への結合に関して試験した。「RF」フレームワークを用いた場合の Fib 504 K グラフトについてのみ特異的ファージ結合が観察された (図 10 B)。Y49K (軽鎖) 及び L78F (重鎖) を欠失した他のグラフトと相対比較した場合の Fib 504 - RF グラフトを提示するファージの中等度の結合は有用なアクセプターフレームワークを選択する場合のこれらの位置の重要性を示している。

### 【0336】

Fib 504 K - RL 及び Fib 504 K - RF グラフトについて 6 HVR の各々にお  
 50

いて同時にソフトランダム化の手法を用いて以前と同様にライブラリを作成し、そして上記した通り4回の選択について固定化アルファ4ベータ7上でソーティングした。Fib504K-RFグラフトによるライブラリについてのみ濃縮が観察された。Fib504K-RFライブラリの第4回から得られたクローンを配列分析のために選択し、そしてHVR-L1にターゲティングされたアミノ酸変化が判明した。大部分のクローンはY32Lの変化を含有しており；更に、31位は頻繁にはD、S、P又はNに変化していた（図1C）。出発グラフトFib504K-RFのほか、3クローンは発現され、そしてFab蛋白として精製し、そして更に上記した通りBiacoreで分析した。クローンhu504-5、hu504-16及びhu504-32（置換T31S+Y32L（変異体hu504.5）、Y32L（変異体hu504.16）又はT31D+Y32L（変異体hu504.32）を含有する配列番号1の変異体；図1C参照）はFib504K-RFグラフトと相対比較してアルファ4ベータ7への優れた結合を示し、そしてアルファ4ベータ7に対するキメラFib504Fabの親和性に合致するか、それを超過していた。Biacore分析の結果は以下の表3に示す通りであり、そして本明細書に開示したHVR及び/又はフレームワークの領域内の選択された変異が出発抗体と相対比較して向上した親和性を有するアルファ4ベータ7への拮抗剤抗体を形成したことを示している。表3の結果は、ヒト化変異体504.32がアルファ4ベータ7に3倍より堅固に結合することにより出発ラット抗体と相対比較して親和性の最大の増加をもたらしたことを示している。

10

20

【0337】

【表3】

表 3

Fab (BIAcore™ 分析)	アルファ4ベータ7への親和性 (nM)
Fib504	11
変異体 504.5	9
変異体 504.16	23
変異体 504.32	3

30

表3の結果は又、高親和性の抗原結合の回復にとってHVR-L1の再設計が重要であったことを示している。特に突然変異Y32Lは種々のクローンの中で最も頻繁に観察された。31位における他の変化及びHVR-H1全体に渡る多くの他の置換は十分耐容性を示していると考えられ、そして別の向上をもたらしている場合がある、これらの結果から、元のラット抗体のものと合致するかそれを超える親和性を生じさせるヒトフレームワークにグラフトしたFib504の親和性を向上させることができる複数の配列変化が存在することは明らかである。

【0338】

即ちヒトアクセプタースカホールド内への6ラットFib504HVRのグラフトから出発し、49位（リジン）を含むためのHVR-L2の拡張、49位（グリシン）を含むためのHVR-H2の拡張、及び、94位（メチオニン）を含むためのHVR-94の拡張、並びに、アミノ酸変化のVHR-L1の32位（ここではL又はIがYを置き換える）及び、場合により、VHR-L1の31位（ここでは例えばTがD又はSにより置き換えられる）となる。有用なフレームワークアミノ酸変化はVHドメインの71位（A71R）及び78位（L78F）において生じる。このようなアミノ酸変化は、例えばアルファ4ベータ7インテグリンに対して3倍向上した結合親和性を有する完全ヒト抗体である変異体hu504.32をもたらす。更に又、本明細書に記載した選択されたヒト化抗体は親ラットFib504抗体に少なくとも匹敵する生物学的活性を有することが判明している（本明細書の実施例3参照）。

40

50

## 【0339】

(実施例2：別のヒト化 F i b 5 0 4 H V R 変異体)

ヒト化変異体 F i b 5 0 4 . 3 2 の H V R アミノ酸配列を更に修飾することにより、ベータ7インテグリンサブユニット及び/又はベータ7サブユニットを含有するインテグリンの活性に拮抗する能力を有する別の変異体を形成した。

## 【0340】

広範なアミノ酸スキャンライブラリの形成 - 変異体 h u 5 0 4 . 3 2 のベータ7結合変異体を形成することができる他のアミノ酸残基に対する選択された H V R 位置をスキャンするためのライブラリを、3つのオリゴヌクレオチド、即ち、h u 5 0 4 . 3 2 H V R - L 1 配列へのバイアスを有する H V R - L 1 の一部をソフトランダム化するために設計された 5 0 4 - L 1 (即ち、配列 A S E S V D D L L H (配列番号47、相対的な位置 A 2 - A 1 1 に対する)を上記の通りソフトランダム化した) ; 及び軽鎖の位置 H V R - L 3 の 9 6 位及び重鎖の H V R - H 3 の 9 4 位に N N S を導入する H V R - L 3 の 5 0 4 - N 9 6 及び H V R - H 3 の 5 0 4 - M 9 4 を用いて形成し、これにより全 2 0 アミノ酸をこれらの位置とした。これらの 3 オリゴヌクレオチドを用いて、軽鎖における 3 停止コドン ( H V R - L 1 の 3 1 及び 3 2 位、及び、 H V R - L 3 の 9 6 位 ) 及び重鎖における 1 停止コドン ( H V R - H 3 の 9 4 位 ) を含有する鋳型を用いながら上記したとおり広範なアミノ酸スキャンライブラリを形成した。

10

h u 5 0 4 - 3 2 の広範なアミノ酸スキャン - H V R - L 1 において可能な好ましい配列をより完全に探索するため、及び、5 0 4 - 3 2 の安定性を増大させるために、本発明者らは a ) ヒト化の間に変化が観察された領域における 5 0 4 - 3 2 の H V R - L 1 (即ち A S E S V D D L L H (配列番号47、相対的な位置 A 2 - A 1 1 に対する)をソフトランダム化し(図1C)、そして、b ) H V R - L 3 における N 9 6 及び H V R - H 3 における M 9 4 において全ての可能なアミノ酸を与えるファージライブラリを設計した。前記した固定化完全長ヒトインテグリンアルファ4ベータ7に対する選択4回の後、96のランダムクローンを選択して配列分析に付した。広範なアミノ酸スキャンライブラリの各位置においてアミノ酸が検出される頻度は、h u 5 0 4 - 3 2 に存在する H V R - L 1 配列及び重鎖 9 4 位のメチオニンが高親和性結合のためには指摘であることを示唆している(図12)。変異体 5 0 4 . 3 2 から出発した選択により得られた最も好ましいアミノ酸(図12)を黄色で示す。これとは対照的に、アスパラギンも h u 5 0 4 - 3 2 の軽鎖の 9 6 位に存在し、広範なアミノ酸スキャンにおけるこの位置において観察されたロイシンの高頻度は突然変異 N 9 6 L がアルファ4ベータ7に対するヒト化 F i b 5 0 4 変異体の親和性を更に向上させ、そしてこの位置におけるいかなる潜在的な脱アミドの問題も排除することを示唆している。図12の情報は又、置き換えアミノ酸の数が親和性の実質的な損失を伴うことなく殆どの位置で相容性が示されていることを示唆している。例えば、H V R - H 3 の M 9 4 における酸化を排除するためには、グルタミン又はアルギニンを置換すればよいと考えられる。

20

30

## 【0341】

限定的なアミノ酸スキャンライブラリの形成 - 限定されたアミノ酸スキャンのための 6 ライブラリは 6 種の K u n k e l 鋳型を利用しており、各々が 6 つの H V R の 1 つ内に位置する 1 つの停止コドンを含むようにした。各ライブラリは、ベータ7又はアルファ4ベータ7への結合に関する後の試験についてアミノ酸残基を改変するために、単一の H V R をコードする単一のオリゴヌクレオチドを用いながら、図11A(「コドン」のコラム)に示すコドンを利用しながら作成した。同じ操作法を用いて抗ベータ7抗体のアミノ酸残基を改変し、そして、アルファEベータ7インテグリンへの結合に関してそれらを試験した。

40

## 【0342】

h u 5 0 4 - 3 2 の限定的なアミノ酸スキャン - ヒト軽鎖及び重鎖コンセンサス配列により近似している h u 5 0 4 - 1 6 を作成し、そして工程において、結合のために必要なラット F i b 5 0 4 の最小配列エレメントを発見するために、h u 5 0 4 - 1 6 の限定的

50

なアミノ酸スクランを設計した。6ライブラリを作成し、hu504-16とヒトコンセンサスカップI軽鎖又はサブグループIII重鎖の間で異なる部位において各HVRをターゲティングし(図1Aおよび1B);ラット又はヒトのアミノ酸の何れかをライブラリのこれらの位置とした(図11A)。オリゴヌクレオチド合成及び突然変異誘発の間に両方のアミノ酸に対してコーディングを適合させるために、別のアミノ酸もまた一部の場合においては導入した(図11Aのコードされたアミノ酸を参照)。限定的なアミノ酸スクランライブラリを上記した通り固定化された完全長のヒトインテグリンアルファ4ベータ7に対して選択し、そして、約32のランダムクローンを第3回の後に各ライブラリから配列決定した。各位置において検出された各アミノ酸の頻度を図11B及び11Cに示す。

10

#### 【0343】

広範なアミノ酸スクランの場合と同様、限定的なアミノ酸スクランもまたヒト化Fib504における多くの位置においてどのような変化が耐容性であるかに関する情報を提供する。しかしながら広範なアミノ酸スクランとは異なり、限定的なアミノ酸スクランにおいてランダム化される各位置において許容される多様性は数個のアミノ酸に限定されていた。即ち、所定の位置における何れかの観察された置換の欠如は、特定の残基が変化され得ないことを示しているわけでもなく、又、所定の位置における何れかの特定のアミノ酸の高頻度はそれが高親和性のための最良の解決法であることを必ずしも示しているわけでもない。

20

#### 【0344】

一部の位置(軽鎖の27、29、30、53、54位及び重鎖の50、54、58、60、61及び65位)においてはヒトコンセンサアミノ酸が極めて高頻度で選択され、ヒトコンセンサへの復帰突然変異がヒトアルファ4ベータ7への結合を劇的に改変しないことを示唆している。実際、軽鎖(HVR-L2内)の54位において、ヒトコンセンサアミノ酸はラットFib504由来のアミノ酸よりもより頻繁に選択されており、504-32で起こったこの変化が有用なベータ7結合抗体を与えることを示している。

#### 【0345】

更に又、ライブラリ設計の結果として、ヒトコンセンサ及びラットFib504の何れからも誘導されていないアミノ酸は、ある位置においてはより頻繁に選択されており、そして、ヒト化Fib504変異体の親和性を向上させるための潜在的置換を与える。これらには、例えば、軽鎖のD30A及びI55V及び重鎖のY50Fが包含される。これらの2つのライブラリから得られた結果は、多くのHVR位置が他のアミノ酸置換に耐容性を示し、そしてなお、同等の生物学的活性を保持していることを示している。

30

#### 【0346】

観察されたアミノ酸変化の総括を図13及び15に示す。図15はKababナンバリング又は相対的ナンバリング系に従ってナンバリングされた位置における本発明の抗体変異体のCDRにおける位置の各々において有用な種々のアミノ酸を総括する。図13及び15に示す変異体により包含される別の抗体の各々は本発明の実施形態である。

#### 【0347】

(実施例3:細胞接着試験)

細胞表面上に発現されたりガンドに本発明のヒト化Fib504変異体の一部が結合する能力を細胞接着試験により試験した。アルファ4ベータ7及び他のベータ7インテグリン、アルファEベータ7への結合はインテグリンのその天然の受容体への結合を妨害するヒト化変異体の能力により試験した。細胞表面上に発現されたベータ7サブユニット単独へのヒト化Fib504変異体の結合も同様に試験した。操作法及び結果を以下に記載する。

40

#### 【0348】

IgG生産-ヒトFib504IgG変異体を軽鎖及び重鎖に関する別個のベクターを用いて293細胞において一過性に発現させた(Grahamら、(1977)上出)。ベクターは軽鎖及び重鎖の各々につき適当な発現ベクター内に軽鎖又は重鎖の可変ドメイ

50

ンをサブクローニングすることにより構築した。ヒト化Fib504変異体の1.1LのCHO細胞培養物の上澄みを0.45umのフィルターで濾過し、緩衝液A(10mM トリスpH7.5, 150mM NaCl)中に平衡化させておいた新しい1mL HiTrapプロテインA HPカラム(Amersham/Pharmacia)に適用した。試料は4で一夜0.8mL/分で適用した。次に各カラムの洗浄及び平衡化を緩衝液A 30mlを用いて行った。抗体の溶出は0%から100%緩衝液B(100mM グリシン、pH3.0)となるまで1ml/分で14分の一次勾配を用いながらFPLC(Amersham/Pharmacia)上で室温でクロマトグラフィーにより行った。得られた1ml画分を即座に1MトリスpH8を75ul添加することにより中和した。溶出した蛋白は280nmにおける吸光度により検出し、そしてピーク画分をプールし、PD10G-25セファデックス使い捨てサイジングカラム(Amersham/Pharmacia)上でPBS中に脱塩した。蛋白はOD280により検出し、ピーク画分をプールした。PBS中の抗体を0.22um濾過し、4で保存した。アミノ酸分析を用いてこれらの精製された抗体の濃度を定量し、そして、数値は2つの別個の測定の平均から割り付けた。

10

## 【0349】

(BCECF 標識)

実施例3に示す試験の各々において、細部を以下の操作法に従って標識した。接着試験に使用した全ての細胞は、ベータ7サブユニットでトランスフェクトしたRPMI8866細胞及び38C13細胞(38C13ベータ7細胞)用には10%FBS含有RPMI1640培地中、そして、アルファEベータ7トランスフェクト293細胞(アルファEベータ7293細胞)用には10%FBS含有F-12:DMEM混合物(50:50)中において、10uMの2',7'-ビス-(2-カルボキシフルオレセイン)-5-(及び6)-カルボキシフルオレセインのアセトキシメチルエステル(BCECF)により標識した。細胞は30分間標識し、そして、試験培地を用いて2回洗浄した。細胞密度はRPMI8866及び38C13ベータ7細胞についてはml当たり $3 \times 10^6$ 個に調節し、そしてアルファEベータ7293細胞については $2.2 \times 10^6$ 個に調節した。

20

## 【0350】

(ヒト化Fib504変異体のMAdCAMへのアルファ4ベータ7の結合の妨害)

RPMI8866/MAdCAM-1-Ig細胞接着: RPMI8866細胞はその表面上にアルファ4ベータ7を発現する(Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY)。ヒト化Fib504変異体(hu504変異体)を固相上にコーティングされたIgGに融合させたRPMI8866とMAdCAMの混合物に接触させた。RPMI8866細胞のMAdCAM-1への結合の50%阻害をもたらすヒト化Fib504変異体濃度(IC<sub>50</sub>)は、4一夜Nunc Maxisorp<sup>TM</sup>96穴プレートをPBS中2µg/ml、100µl/ウェルのMAdCAM-1-Ig(Genentech, Inc., ここでIgはFc領域へのMAdCAM-1の融合物を指す)でコーティングすることにより測定した。室温で1時間200ul/ウェルの5mg/mlBSAでプレートをブロックした後、試験培地(RPMI1640培地、Hyclone(登録商標)、Logan Utah, USA, 5mg/mlBSA添加)中ヒト化Fib504変異体50µlを各ウェルに添加し、そして試験培地50µl中150,000BCECF標識細胞(BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR)を各ウェルに添加し、37で15分間インキュベートする。ウェルを試験培地150µlで2回洗浄し、未結合の細胞を除去した。結合した細胞は50mM トリス塩酸pH7.5中0.1%SDS100µlで可溶化した。溶解した細胞から放出された蛍光の量は485nm励起530nm発光の波長においてSPECTRAMaxGEMINI<sup>TM</sup>(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)により測定した。試験における各ヒト化Fib504変異体のIC<sub>50</sub>値を得るために、4パラメーターの非線形最小自乗フィットを用いながら各試験において添加したヒト化Fib504変異体の濃度の関数として蛍光値を分析した。IC<sub>50</sub>及

30

40

50



び  $IC_{90}$  値は4パラメーターのフィットから推定した。図14は結果の例示的プロットである。被験変異体の各々に関する  $IC_{90}$  及び  $IC_{50}$  値は表4において以下に示す通りである。

【0351】

【表4】

表 4  
ヒトMAdCAM-1への抗体の結合

試験した抗体 Fib504 および hu504 変異体	$IC_{50}$ (nM) Exp 1/Exp 2*	$IC_{90}$ (nM) Exp 1/Exp 2*
ラットFib504	0.098/0.197	0.483/0.703
変異体 hu504.5	0.067/0.248	0.361/0.880
変異体 hu504.16	0.0768/0.206	0.244/0.551
変異体 hu504.32	0.036/0.119	0.150/0.396
6B11 (非ブロッキング対照)	>100	>100

10

\* Exp 1 / Exp 2 は反復試験の結果を示す。

【0352】

20

(VCAMへのアルファ4ベータ7結合のヒト化Fib504変異体妨害)

RPMI 8866 / 7d VCAM - 1細胞接着：RPMI 8866 / 7d VCAM - 1試験はプレートをコーティングするために7d VCAM - 1 (ADP5、R&D Systems, Minneapolis, MN) を  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  で使用した以外はRPMI 8866 / MAdCAM - 1 - Igと同様のフォーマットである。結果はMAdCAM結合実験に関して上記した通り分析した。被験変異体の各々に関する  $IC_{90}$  及び  $IC_{50}$  値は表5において以下に示す通りである。

【0353】

【表5】

表 5  
ヒトVCAMへの抗体の結合

試験した抗体 Fib504 および hu504 変異体	$IC_{50}$ (nM) Exp 1/Exp 2*	$IC_{90}$ (nM) Exp 1/Exp 2*
ラットFib504	0.107/0.193	0.396/0.580
変異体 hu504.5	0.088/0.270	0.396/0.726
変異体 hu504.16	0.098/0.223	0.261/0.774
変異体 hu504.32	0.059/0.110	0.183/0.337
6B11 (非ブロッキング対照)	>100	>100

30

\* Exp 1 / Exp 2 は反復試験の結果を示す。

【0354】

(ヒトEカドヘリンへのアルファEベータ7結合のヒト化Fib504変異体の妨害)

アルファEベータ7の293/huE-カドヘリン細胞接着：293細胞 (Grahamら、(1977)上出) をアルファE及びベータ7 (Genentech, Inc.) でトランスフェクトした。試験フォーマットはプレートをコーティングするためにhuE-カドヘリン (648-EC、R&D Systems, Minneapolis, MN

40

50

)を2 $\mu$ g/mlで使用した以外はRPMI8866/MAdCAM-1-Igと同様である。次にプレートを5mg/mlBSAで上記した通りブロッキングし、そして、試験培地(F-12:DMEM(50:50)、5mg/mlBSA添加)中FIB504変異体50 $\mu$ lを各ウェルに添加し、そして試験培地50 $\mu$ l中110,000BCECF標識細胞を各ウェルに添加し、37で15分間インキュベートした。ウェルを試験培地150 $\mu$ lで2回洗浄し、そして溶解細胞から放出された蛍光の量を上記した通り測定した。3実験から得られた結果を表6に示す。

【0355】

【表6】

表 6  
ヒトE-カドヘリンへの抗体の接着

試験した抗体 Fib504 および hu504 変異体	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
ラット Fib504	2.047/7.89/4.19	8.80/24.5/9.95
変異体 hu504.5	2.132/10.18/4.77	7.99/28.7/10.19
変異体 hu504.16	1.957/10.05/4.58	7.03/33.7/13.51
変異体 hu504.32	1.814/6.99/3.47	8.8/24.5/11.73
HP2/1 (抗-アルファ4、対照)	>100/>100/>100	>100/>100/>100

(MAdCAMへのベータ7の結合のヒト化Fib504変異体の妨害)

38C13ベータ7/muMAdCAM-1-Ig細胞接着試験：38C13ベータ7/muMAdCAM-1-Ig試験はプレートをコーティングするためにmuMAdCAM-1-Ig(Genentech, Inc.)を2 $\mu$ g/mlで使用した以外はRPMI8866/MAdCAM-1-Igと同様のフォーマットである。38C13アルファ4+マウスリンパ腫細胞(Crowe, D.T.ら、J.Biol.Chem.269:14411-14418(1994))を、アルファ4ベータ7が細胞表面上に発現されるようにインテグリンベータ7をコードするDNAでトランスフェクトした。アルファ4ベータ7と会合している細胞膜とMAdCAMとの間の相互作用を妨害する抗体変異体の能力を上記の通り調べた。試験結果は表7に示す。(2実験のIC<sub>50</sub>及びIC<sub>90</sub>値を示す)。

【0356】

【表7】

表 7  
38C13-ベータ7発現細胞におけるhu504変異体抗体の活性  
マウスMAdCAMへの結合

試験した抗体 Fib504 および hu504 変異体	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
ラット Fib504	0.682/0.306	2.869/1.51
変異体 hu504.5	0.8587/0.466	2.322/2.61
変異体 hu504.16	0.998/0.610	3.717/4.08
変異体 hu504.32	0.718/0.458	4.08/1.51

マウスVCAMへのベータ7の結合のヒト化Fib504変異体の妨害

38C13ベータ7/muVCAM-1-Ig細胞接着試験：38C13ベータ7/m

uVCAM-1-Ig試験はプレートをコーティングするためにmuVCAM-1-Ig (Genentech, Inc.)を2ug/mlで使用した以外はマウスMAdCAM-1-Ig/RPMI8866に従って実施した。試験結果は表8に示す。(2実験のIC50及びIC90値を示す)。

【0357】

【表8】

表 8

38C13-ベータ7発現細胞におけるhu504変異体抗体の活性

マウスVCAM-1-Igへの結合

試験した抗体 Fib504およびhu504変異体	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
ラットFib504	0.845/0.447	2.903/2.30
変異体 hu504.5	0.763/0.407	3.074/2.30
変異体 hu504.16	0.835/0.584	2.857/1.84
変異体 hu504.32	0.562/0.330	2.004/1.84

10

ヒト化Fib504変異体結合試験の結果は、本発明のヒト化抗体はその標的ベータ7インテグリンサブユニット並びにアルファ4ベータ7及びアルファEベータ7インテグリンに、ほぼ出発ラット抗体の親和性で、そして、一部の実施形態においてはより大きい親和性で、結合することを示している。即ち、本発明のヒト化抗ベータ7抗体は抗ベータ7インテグリン治療、特にヒトの治療において有用である。

20

【0358】

(本発明のhu504.32変異体の相対的活性)

本明細書に記載した細胞接着試験方法に従って、hu504.32抗体の種々のアミノ酸変異体がベータ7含有受容体のそのリガンドへの結合を阻害する能力について、それらをヒト及びマウスの細胞接着試験において試験した。RPMI8866/MAdCAM-1-Fc試験は上記した通り実施した。アルファEベータ7-293/huE-カドヘリン試験はリガンドとしてのヒトE-カドヘリン-Fcの使用により変更した(ヒトE-カドヘリン-Fc、648-EC、R&D Systems, Minneapolis, MN)。ヒトフィブロネクチン(huFN40)とPRMI8866細胞上のヒトアルファ4ベータ7受容体の相互作用を阻害するhu504.32の相対的能力も調べた。これらの試験のために使用したRPMI8866/huフィブロネクチン(huFN40)試験はプレートをコーティングするためにヒトフィブロネクチンアルファ-キモトリプシン処理フラグメント40kDa(F1903、Chemicon International, Temecula, CA)を2ug/mlで使用した以外は本明細書に開示したRPMI8866/MAdCAM-1-Ig試験と同様のフォーマットとした。

30

【0359】

マウスベータ7含有受容体とマウスMAdCAM-1又はマウスVCAM-1との相互作用を阻害するhu504.32変異体の能力を調べた。マウスMAdCAM-1-Fc及びマウスVCAM-1-Fcはhu504.32変異体によりマウスベータ7を発現するマウスリンパ腫アルファ4+細胞(38C13ベータ7細胞)との相互作用を阻害された。マウスMAdCAM-1-Fc及びVCAM-1-Fcの細胞接着試験をヒトMAdCAM-1及びVCAMに関して本明細書に記載したものと同様に実施した。リガンドがFc領域に融合する場合は、細胞上のFc受容体を室温で5分間10<sup>6</sup>個の細胞当たり0.5ugの抗-CD16/32抗体(抗Fc I II/I II受容体抗体、カタログ番号553142、BD Biosciences, San Jose, CA)でブロッキングした。50ulの試験培地中150,000標識細胞を各ウェルに添加し、37で13

40

50

分インキュベートした。ウェルを洗浄し、そして、溶解した細胞から放出された蛍光の量を上記した通り測定した。ヒト細胞接着試験のための対照抗体はヒト血清アルブミンに対するマウスモノクローナル抗体6B11とした(カタログ番号ab10244、Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)。マウス細胞接着試験のための対照抗体はインテグリンベータ7への結合に関してリガンド又はFib504と競合しないラット抗マウスインテグリンベータ7抗体M293(BD Biosciences, San Jose, CA)とした。

【0360】

ヒト及びマウスの細胞接着試験について3連の試験の結果をそれぞれ表9及び10に示す。

【0361】

【表9】

表 9

ヒト細胞接着試験における hu504.32 変異体抗体の活性

抗体変異体	IC50 Ave ± SD			
	RPMI8866/ huMAdCAM-1- Fc	RPMI8866/ hu7dVCAM-1	αEβ7-293/ huE-カドヘリン -Fc	RPMI8866/ huFN40
hu504.32	0.088 ± 0.035	0.101 ± 0.021	3.970 ± 1.664	0.100 ± 0.046
hu504.32M94Q	0.090 ± 0.045	0.111 ± 0.035	4.130 ± 1.212	0.124 ± 0.056
hu504.32M94R	0.075 ± 0.034	0.089 ± 0.009	3.963 ± 1.776	0.119 ± 0.056
対照 (6B11)	>100	>100	>100	>100

【0362】

【表10】

表 10

マウス細胞接着試験における hu504.32 変異体抗体の活性

抗体変異体	IC50 Ave ± SD	
	38C13ベータ7/ muMAdCAM-1-Fc	38C13ベータ7/ mu7dVCAM-1-Fc
hu504.32	0.270 ± 0.041	0.228 ± 0.065
hu504.32M94Q	0.370 ± 0.102	0.264 ± 0.083
hu504.32M94R	0.391 ± 0.112	0.228 ± 0.081
対照 (M293)	>100	>100

hu504.32抗体は重鎖CDR3の94位にメチオニンを有する。変異体M94Q(又はhu504.32Q)及びM94R(又はhu504.32R)はそれぞれhu504.32変異体の94位にグルタミン又はアルギニンを有する。hu504.32M、Q及びR抗体は試験の各々においてインテグリンベータ7受容体-リガンド相互作用を実質的に低減し、従って、ベータ7媒介細胞接着の強力な阻害剤であった。

【0363】

10

20

30

40

50

(インビボの抗体 hu504.32R 活性)

hu504.32 抗体変異体がインテグリンベータ7受容体-リガンド相互作用を低減し、そしてインビボのマウス炎症性腸疾患モデルにおける炎症結腸へのリンパ球のリクルートメントを低減する能力をインビボで試験した。BALB/cマウス及びCB17SCIDマウスをCharles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, MA, USA)より入手した。CD4<sup>+</sup>CD45Rb高T細胞再形成SCID結腸炎マウスは、ドナーBALB/cマウスからCD4<sup>+</sup>CD45Rb高T細胞を単離し、そして、100µlPBS中3×10<sup>5</sup>個を静脈内に移行させることにより作成した。対照SCIDマウスにはCD4<sup>+</sup>CD45Rb高T細胞を投与しなかった。4週目におけるベースラインからの10%体重減少又はピーク体重から15%という投与群割付基準に合致する再形成CD4<sup>+</sup>マウスは炎症性腸疾患を誘導したとみなし、投与のために選択した。

10

【0364】

試験抗体投与日においてドナーBALB/cマウスの腸間膜リンパ節(MLN)細胞を採取し、Cr<sup>51</sup>で放射標識した。投与では予め抗GP120抗体、hu504.32抗ベータ7抗体、hu504.32R抗ベータ7抗体又は無抗体(対照)を200µg/100µlPBS静脈内投与した。抗体投与後30分に、Cr<sup>51</sup>標識MLN細胞を4×10<sup>6</sup>細胞/100µlの濃度で注射した。標識細胞注射後1時間にマウスを安楽死させ、脾臓、結腸及びパイアー斑を採取し、計量し、そして臓器当たりの総Cr<sup>51</sup>放射能を測定した。図16はこれらの試験の結果の棒グラフであり、炎症性腸疾患を経験しているマウスの結腸への放射標識T細胞のホーミングをブロックする抗体の相対的な能力を示している。炎症結腸へのT細胞のホーミングは陰性対照である抗GP120抗体と相対比較してhu504.32及びhu504.32R抗ベータ7抗体により阻害された。脾臓への分布は抗体の全てについて同様であった。即ちhu504.32及びhu504.32R抗ベータ7抗体はインビボの炎症結腸へのT細胞のホーミングを効果的に阻害した。

20

【0365】

抗体グリケーションはアルファ4ベータ7受容体へのMAdCAM-1の結合をブロックするhu504.32R変異体の能力に影響していない。

【0366】

蛋白の非酵素的グリコシル化であるグリケーションは抗体-リガンド相互作用に影響する場合がある(例えばKennedy, D.M.ら、Clin Exp Immunol. 98(2):245-51(1994)参照)。504.32Rの49位のグリケーション、504.32R変異体の軽鎖49位(HVR-L2相対的な位置B1)のグリケーションが観察されているが、アルファ4ベータ7受容体発現RPMI8866細胞へのMAdCAM-1の結合をブロックする抗体変異体の能力に有意な影響を示していない。グリケーション及びグリケーション水準の測定は標準的な電子スプレーイオン化質量スペクトル分析(ESI-MS)により、そして、ポロネートアフニティークロマトグラフィにより実施した。グリケーションに関する試験に有用なポロネートアフニティークロマトグラフィは例えばQuan C.P.ら、Analytical Chemistry 71(20):4445-4454(1999)及びLi Y.C.ら、J. Chromatography A, 909:137-145(2001)に記載されている。細胞接着試験は本明細書に開示するRPMI8866/MAdCAM-1-Fc細胞接着試験に従って実施した。

30

40

【0367】

本発明の別の実施形態においては、49位におけるグリケーションは、リジン以外のアミノ酸を49位が含む場合は低減又は排除される。本発明のポリペプチド又は抗体は49位(HVR-L2相対的な位置B1)のアミノ酸としてアミノ酸A、C、D、E、F、G、H、I、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W又はYのいずれかを包含し、ここで各文字は標準的な1文字アミノ酸標記に従うアミノ酸を指す。504.32R変異体(又は他の504変異体)の軽鎖の49位のアミノ酸はR、N、V、A、F、Q、H、P、I

50

又はLからなる群より選択される。49位において有用なアミノ酸は、例えばファージ(変異体)上にhu504.32RFabを提示(ファージライブラリを作成)すること、及び、20個の天然に存在するアミノ酸の各々に対するコドン、49位のコドンにおいて別個に置換することにより、選択される。49位において改変されたhu504.32R変異体を発現するファージを、インテグリンベータ7及び/又はインテグリンベータ7を含む受容体、例えばアルファ4ベータ7又はアルファEベータ7受容体への結合に関して試験する。ベータ7インテグリン又はアルファ4ベータ7又はアルファEベータ7受容体に結合するこれらの変異体を、本明細書に記載する通り、インテグリンベータ7受容体-リガンド結合を阻害する能力、及び、インビボの薬効に関して、更にスクリーニングする。別の、天然に存在する、又は天然に存在しないアミノ酸を標準的な突然変異誘発手法により49位に置換させ、そして、細胞接着及び本明細書に記載したインビボ試験において試験してよい。或いは、軽鎖の49位のアミノ酸はリジン(K)以外のアミノ酸であり、そして何れかの他のHVR又はフレームワーク又は軽鎖及び/又は重鎖の位置のアミノ酸を改変することにより、インテグリンベータ7の生物学的活性を低減することにより炎症の低減のために有用である結合親和性、インビトロ又はインビボの生物学的活性、薬物胴体、薬剤クリアランス及び免疫原性を示す変異体抗ベータ7結合ポリペプチド又は抗体を選択する。突然変異誘発及びそのようなポリペプチド又は抗体の変異体の選択は、本明細書に開示した通り、そして他の標準的手法に従って実施される。そのような変異体抗ベータ7結合ポリペプチド又は抗体は、本明細書に開示したヒト化Fib504変異体のいずれかにより示される結合親和性の10,000倍以内、或いは100倍以内、1000倍以内、或いは10倍以内、或いは5倍以内、或いは2倍以内のインテグリンベータ7結合親和性を示す。

10

20

30

#### 【0368】

上記した明細書は当業者を本発明実施可能とするために十分であると考えられる。寄託した実施形態は本発明の特定の特徴の単一の説明として意図されており、そして機能的に等価ないかなる構築も本発明の範囲内に包含されるため、本発明は寄託した構築によりその範囲において限定されるものではない。本発明における物質の寄託は本明細書に含まれる書面による説明がその最良の様式を含む本発明の如何なる特徴の実施を可能とするために不十分であることの受諾を構成せず、又それが示している特定の説明に請求項の範囲を限定するものともみなされない。実際、本明細書に示し、記載したもののほかに本発明の種々の変更が上記記載より当業者には明らかとなり、そして添付する請求項の範囲に包含される。



【 図 3 】

Fib504 グラフト

軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDVTRITTCRASESVDTYLHWYQQKPGKAPKLLIYASQSSIS  
 GVPSPRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQGNSLNTFGQGTKVEIKRTVA  
 PSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSLSTLTLSKADYERKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 29)

FIG. 3A

Fib504 グラフト

重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKLEWVGYISYSGS  
 TSYNPSLKSRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSTGDFWQQT  
 VTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTQYICNVNPKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (配列番号 30)

FIG. 3B

【 図 4 】

Fib504K グラフト

軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDVTRITTCRASESVDTYLHWYQQKPGKAPKLLIKYASQSSIS  
 GVPSPRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQGNSLNTFGQGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSLSTLTLSKADYERKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 31)

FIG. 4A

Fib504K グラフト

重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKLEWVGYISYSGS  
 TSYNPSLKSRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSTGDFWQQT  
 VTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTQYICNVNPKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (配列番号 30)

FIG. 4B

【 図 5 】

Fib504K-RF グラフト

軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDVTRITTCRASESVDTYLHWYQQKPGKAPKLLIKYASQSSIS  
 GVPSPRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQGNSLNTFGQGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSLSTLTLSKADYERKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 31)

FIG. 5A

Fib504K-RF グラフト

重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKLEWVGYISYSGS  
 TSYNPSLKSRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSTGDFWQQT  
 VTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTQYICNVNPKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (配列番号 32)

FIG. 5B

【 図 6 】

ヒト化変異体 504.32

軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDVTRITTCRASESVDDLLHWYQQKPGKAPKLLIKYASQSSIS  
 GVPSPRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYCQQGNSLNTFGQGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSLSTLTLSKADYERKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 33)

FIG. 6A

ヒト化変異体 504.32

重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKLEWVGYISYSGS  
 TSYNPSLKSRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSTGDFWQQT  
 VTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTTQYICNVNPKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (配列番号 32)

FIG. 6B



【 7 】

kv1 Z DIQMTQSPSSLSASVGRDRVITTC -L1- WTQQPKGAKFKLLI -L2- GVFSRFSGSGGDTDFLTISSIQP  
kv1 X DIQMTQSPSSLSASVGRDRVITTC -L1- WTQQPKGAKFKLLI -L2- GVFSRFSGSGGDTDFLTISSIQP  
kv2 DIWMTQSPSLSLVFPFGPASISCC -L1- WYLQPKGSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGGDTDFLTKISRVEA  
kv3 EIVLVTSPTSLSLSPGERALISC -L1- WTQQPKGAKFKLLI -L2- GLPDRFSGSGGDTDFLTISSRLRP  
kv4 DIWMTQSPDLSLAVSLGERATINCC -L1- WTQQPKGAKFKLLI -L2- GVPDRFSGSGGDTDFLTISSISLQA

FIG. 7A

kv1 Z EDFAVYYC -L3- FGGTKVEIK 配列番号 14  
kv1 X EDFAVYYC -L3- FGGTKVEIK 配列番号 15  
kv2 EDVGVYYC -L3- FGGTKVEIK 配列番号 16  
kv3 EDFAVYYC -L3- FGGTKVEIK 配列番号 17  
kv4 EDVAVYYC -L3- FGGTKVEIK 配列番号 18

FIG. 7B

【 8 B 】

19 配列番号  
20 配列番号  
21 配列番号  
22 配列番号  
48 配列番号  
49 配列番号  
50 配列番号  
51 配列番号  
52 配列番号  
53 配列番号  
54 配列番号  
55 配列番号  
56 配列番号  
57 配列番号  
58 配列番号  
59 配列番号  
60 配列番号  
61 配列番号  
62 配列番号

I A RVITADTSTAYMEISSLRSRSEDTAIVYCAR -H3-  
B RVITADTSTAYMEISSLRSRSEDTAIVYCAR -H3-  
C RVITADTSTAYMEISSLRSRSEDTAIVYCA -H3-  
D RVITADTSTAYMEISSLRSRSEDTAIVYCC -H3-  
II A RVISVDTSEKNGFSLKISSVTRAADTAIVYCAR -H3-  
B RVISVDTSEKNGFSLKISSVTRAADTAIVYCAR -H3-  
C RVISVDTSEKNGFSLKISSVTRAADTAIVYCA -H3-  
D RVISVDTSEKNGFSLKISSVTRAADTAIVYCC -H3-  
III A RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCAR -H3-  
B RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCAR -H3-  
C RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCA -H3-  
D RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCC -H3-  
アクセプター  
A RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCSK -H3-  
B RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCSK -H3-  
C RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCS -H3-  
D RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCCS -H3-  
第2のアクセプター  
A RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCAR -H3-  
B RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCAR -H3-  
C RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCA -H3-  
D RPTISRDNKNTLYLQMNLSLRAREDTAIVYCC -H3-

FIG. 8B

【 8 A 】

I A QVQLVDSGAEVKKVFGASVKVSKASGVTFF -H1-  
B QVQLVDSGAEVKKVFGASVKVSKAS -H1-  
C QVQLVDSGAEVKKVFGASVKVSKAS -H1-  
D QVQLVDSGAEVKKVFGASVKVSKAS -H1-  
II A QVQLQESGGFLVPPSQTLSLTCTVSS -H1-  
B QVQLQESGGFLVPPSQTLSLTCTVSS -H1-  
C QVQLQESGGFLVPPSQTLSLTCTVSS -H1-  
D QVQLQESGGFLVPPSQTLSLTCTVSS -H1-  
III A EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1-  
B EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-  
C EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-  
D EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-  
アクセプター  
A EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1-  
B EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-  
C EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-  
D EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-  
第2のアクセプター  
A EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1-  
B EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-  
C EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-  
D EYQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1-

FIG. 8A

【 9 】

ラット抗マウス Fib504 可変ドメイン  
可変領域  
DVVMTQSPATLSVTPGERISLSCRASESVDYTLHWYQQKPNESRLLIKYASOSIS  
GTPSRFSGSGGDTDFLTSINGVELDELSTIYYCQQGNSLPTFTFGAGTKLELKRADA  
PTVSIIPFSPMEQLTSGGATVVCVFNFFYPRDISVKKIKIDGSEQRDGLVDSVTDQDS  
KDSITYS (配列番号 12)

ラット抗マウス Fib504 可変ドメイン  
可変領域  
EVQLQESGGFLVLPKPSQSLSLTCSVTGFFITNNYWGWRIRKFGPKMMEWMGYISYSGS  
TSYNPGLKSRISITRDTSKNQVFLQLNSVTTEDTATPYCAMTSGSSGYFDLFWGPGTM  
VTVSSAETTAPSVYPLAPGTLKNSMVTLGCLV (配列番号 13)

FIG. 9A

FIG. 9B

【図10】

VH フレームワーク配列の比較

フレームワーク領域 H3

71 72 73 74 75 76 77 78						
hu サブグループ I	A	D	T	S	T	A
hu サブグループ II	V	D	T	S	K	Q
hu サブグループ III	R	D	N	S	K	N
ハーゼブチン	A	D	T	S	K	N
Fib504	R	D	T	S	K	N
Fib504-RL	R	D	T	S	K	N
Fib404-RF	R	D	T	S	K	N

FIG. 10A

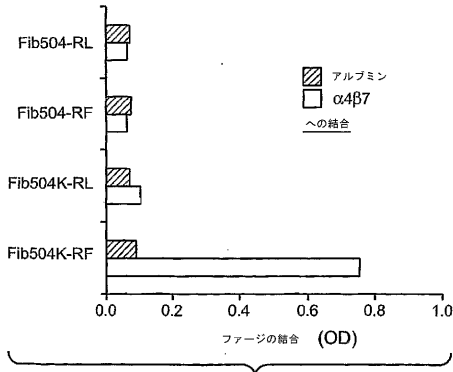


FIG. 10B

【図11A-1】

FIG. 11A-1

	504.16		ヒト		コドン		アミノ酸		アミノ酸	
	コンセンサス	コードするもの	コードするもの	観察されたもの	コードするもの	観察されたもの	コードするもの	観察されたもの		
HVR-L1	25	R	R							
		A	A							
		S	S							
	27	E	Q	SAA	EQ	E	Q			
		S	S							
	29	V	I	RIT	VI	V	I			
	D	S	KMT	DSAY	D	S	A			
31	T	N	RAC	DN	D	N				
	L	Y	YWC	LYFH	L					
33	L	L								
	H	A	SMC	HADP	H					
HVR-L2	49	K	Y	WAW	KYNZ	K	N			
		Y	A	KMC	YADS	Y				
	51	A	A							
		S	S							
	53	Q	S	YMG	QSPZ	Q	S			
		S	L	TYG	SL	S	L			
55	I	E	RWA	IEKV	I	E	K	V		
	S	S								
HVR-L3	89	Q	Q							
		Q	Q							
	91	G	Y	KRT	GYDC	G				
		N	N							
	93	S	S							
		L	L							
95	P	P								
	N	W	WRS	NWYRSZ	N	W	Y	R	S	
97	T	T								

注記：Zは停止コドンである。最も頻繁に観察されるアミノ酸を四角で囲った。

【図11A-2】

	504.16		ヒト		コドン		アミノ酸		アミノ酸	
	コンセンサス	コードするもの	コードするもの	観察されたもの	コードするもの	観察されたもの	コードするもの	観察されたもの		
HVR-H1	26	G	G							
		F	F							
	28	F	T	WYC	FITS	F				
		I	F	WTC	IF	I				
	30	T	S	ASC	TS	T				
		N	S	ARC	NS	N				
32	N	Y	WAC	NY	N					
	Y	A	KMT	YADS	Y					
34	W	M	WKG	WMRL	W					
	G	S	RGC	GS	G					
HVR-H2	49	G	S	RGC	GS	G				
		Y	V	KWT	YVDF	Y	V	D	F	
	51	I	I							
		S	S							
	53	Y	G	KRT	YGCD	Y				
		S	G	RGC	SG	S	G			
	55	G	G							
		S	S							
	57	T	T							
		S	Y	TMT	SY	S	Y			
59	Y	Y								
	N	A	RMC	NADT	N	A	D	T		
61	P	D	SMT	PDAH	P	D	A	H		
	S	S								
63	L	V	STG	LV	L	V				
	K	K								
65	S	G	RGC	SG	S	G				
HVR-H3	93	A	A							
		M	R	AKG	MR	M				
	95	T	G	RSC	TGAS	T				
		G								
	97	S								
		S								
99	G									
	Y									
	F	F								
101	D	D								
	F	Y	TWC	FY	F	Y				

FIG. 11A-2

【図11B】

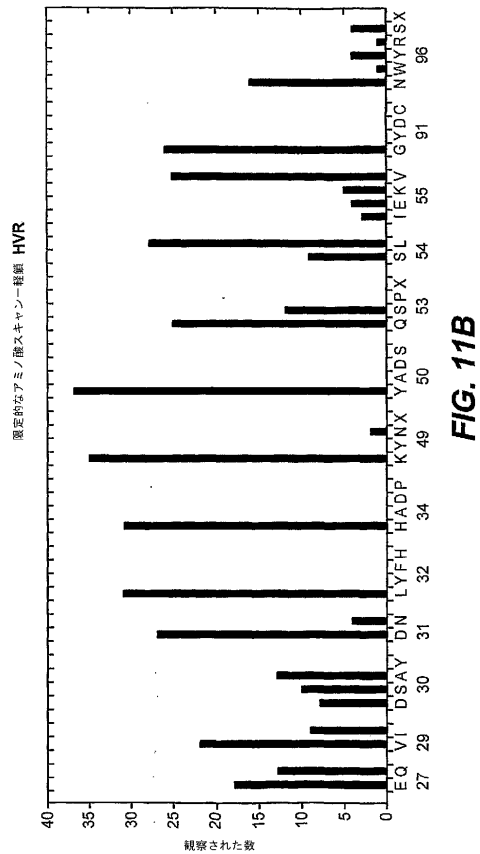
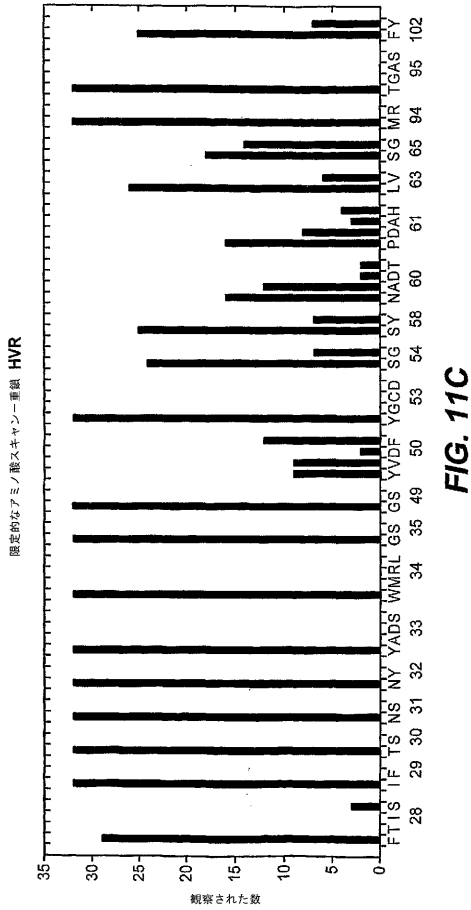


FIG. 11B

【 図 1 1 C 】



【 図 1 2 】

アミノ酸位置	アミノ酸																			
	観察回数																			
A25	A <sub>64</sub>	G <sub>2</sub>	S <sub>11</sub>	I <sub>7</sub>	Y <sub>9</sub>															
S26	G <sub>4</sub>	I <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	N <sub>8</sub>	P <sub>1</sub>	Q <sub>1</sub>	R <sub>7</sub>	S <sub>61</sub>	I <sub>6</sub>											
E27	A <sub>6</sub>	D <sub>8</sub>	F <sub>60</sub>	G <sub>2</sub>	H <sub>1</sub>	I <sub>1</sub>	K <sub>4</sub>	L <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	Q <sub>5</sub>	R <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>								
S28	A <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	G <sub>7</sub>	H <sub>1</sub>	I <sub>1</sub>	K <sub>1</sub>	N <sub>9</sub>	P <sub>3</sub>	R <sub>7</sub>	S <sub>56</sub>	I <sub>4</sub>	V <sub>1</sub>	Y <sub>1</sub>							
V29	A <sub>11</sub>	G <sub>6</sub>	I <sub>3</sub>	K <sub>1</sub>	L <sub>9</sub>	M <sub>6</sub>	Q <sub>1</sub>	R <sub>1</sub>	V <sub>55</sub>											
D30	A <sub>3</sub>	D <sub>59</sub>	E <sub>9</sub>	G <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	I <sub>1</sub>	K <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>	N <sub>6</sub>	P <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>							
D31	D <sub>77</sub>	E <sub>13</sub>	G <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>																
L32	I <sub>1</sub>	L <sub>88</sub>	M <sub>4</sub>																	
L33	A <sub>1</sub>	I <sub>5</sub>	L <sub>64</sub>	M <sub>1</sub>	V <sub>22</sub>															
H34	F <sub>1</sub>	H <sub>87</sub>	Y <sub>4</sub>	S <sub>1</sub>																
HVR-L1																				
HVR-L3																				
HVR-H3																				
N96	A <sub>2</sub>	F <sub>6</sub>	H <sub>1</sub>	I <sub>3</sub>	L <sub>47</sub>	M <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	R <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>	I <sub>4</sub>	V <sub>2</sub>	W <sub>16</sub>	Y <sub>3</sub>							
M94	A <sub>1</sub>	E <sub>3</sub>	G <sub>1</sub>	M <sub>48</sub>	Q <sub>10</sub>	R <sub>24</sub>	S <sub>8</sub>													

注記：最も頻りに観察されるアミノ酸を四角で囲った。

FIG. 12

【 図 1 3 A 】

FIG. 13A

位置	観察された全ての変化 ラット F16504	ヒトコンセンサス	観察された全アミノ酸	限定的なアミノ酸	広範なアミノ酸	ソフトランダム (504) に対する変化
CDR-L1	25 R 27 A 29 S 31 S 33 S 49 K 51 Y 53 A 55 S	R A S Q S I D N Y L A	AGSTV GIKNPQRST ADEGHIKLNQRV ADGHIKNPRSTVY AGIKLMQRV ADEGHIKLNPESTV DEGNP ILM ALLMV PHYS	Q V D L H	G I K N P Q R S T V Y	S D DN S P N D V
CDR-L2	49 K 51 Y 53 A 55 S	Y A A S	KN Y QS SLR EIKTV	K Y Q S L I E K V		R T
CDR-L3	89 O 91 O 93 N 95 L 97 F	O O G N S L P W	AFHILMNRSTVWY	G C		

【 図 1 3 B 】

位置	観察された全ての変化 ラット F16504	ヒトコンセンサス	観察された全アミノ酸	限定的なアミノ酸	広範なアミノ酸
CDR-H1	49 G 51 S 53 S 55 S	G S S S	AGSTV GIKNPQRST ADGHIKLNQRV ADGHIKNPRSTVY AGIKLMQRV ADEGHIKLNPESTV DEGN ILM ALLMV PHYS	Q V D L H	G I K N P Q R S T V Y
CDR-H2	81 F 83 S 85 G	F S G	AGSTV GIKNPQRST ADGHIKLNQRV ADGHIKNPRSTVY AGIKLMQRV ADEGHIKLNPESTV DEGN ILM ALLMV PHYS	Q V D L H	G I K N P Q R S T V Y
CDR-H3	91 F 93 N 95 L 97 F	F N L F	AFHILMNRSTVWY	G C	

FIG. 13B

【 図 1 4 】

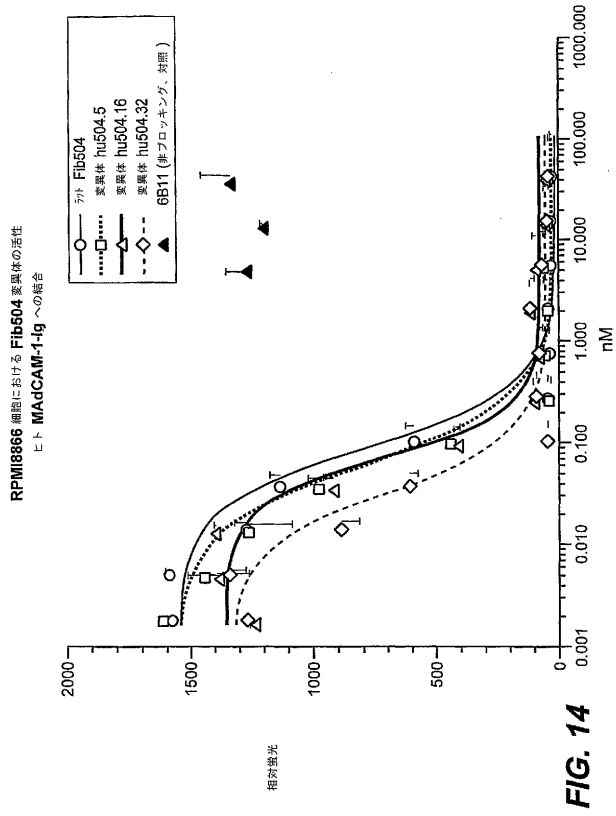


FIG. 14

【 図 1 5 A 】

FIG. 15A

位置	504.32R	アミノ酸置換	
Kabat 番号	相対的な番号	アミノ酸	
HVR-L1	24	A1	R
	25	A2	A
	26	A3	S
	27	A4	E
	28	A5	S
	29	A6	V
	30	A7	D
	31	A8	D
	32	A9	L
	33	A10	L
	34	A11	H
HVR-L2	49	B1	K
	50	B2	Y
	51	B3	A
	52	B4	S
	53	B5	S
	54	B6	S
	55	B7	I
	56	B8	S
HVR-L3	89	C1	Q
	90	C2	Q
	91	C3	Q
	92	C4	N
	93	C5	S
	94	C6	L
	95	C7	P
	96	C8	N
	97	C9	T

【 図 1 5 B 】

位置	504.32R	アミノ酸置換	
Kabat 番号	相対的な番号	アミノ酸	
HVR-H1	26	D1	G
	27	D2	F
	28	D3	F
	29	D4	I
	30	D5	T
	31	D6	N
	32	D7	N
	33	D8	Y
	34	D9	W
	35	D10	G
	HVR-H2	49	E1
50		E2	Y
51		E3	I
52		E4	S
53		E5	Y
54		E6	S
55		E7	G
56		E8	S
57		E9	T
58		E10	S
59		E11	Y
60		E12	N
61		E13	P
62		E14	S
63		E15	L
64		E16	K
65		E17	S
HVR-H3	93	F1	A
	94	F2	R
	95	F3	T
	96	F4	G
	97	F5	S
	98	F6	S
	99	F7	G
	100	F8	Y
	k	F9	F
	101	F10	D
	102	F11	F
重鎖	71	R	A T
FR3	73	T	N
	78	F	A F L

FIG. 15B

【 図 1 6 】

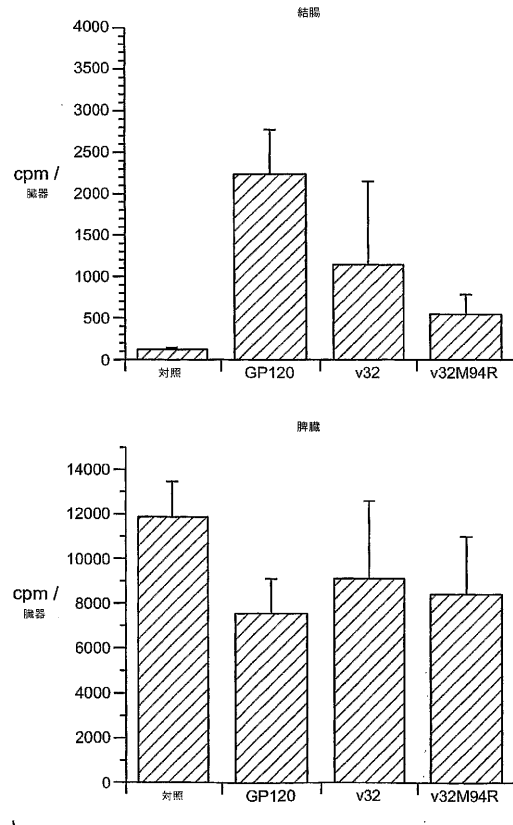


FIG. 16

【配列表】

2012107050000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10	
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(72)発明者 シャーマン フォン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 0 2 , アラメダ , ベイスンサイド ウェイ 1 9

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA02 BA08 BA17 BA18 BA23 CA59

MA02 NA05 NA14 ZA592 ZA682 ZB082 ZB112 ZC352 ZC422

4C085 AA14 CC23

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 FA74

【外国語明細書】

2012107050000001.pdf