

(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2009-5695

(P2009-5695A)

(43) 公開日 平成21年1月15日(2009.1.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	2 B 0 3 0
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 2 4
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00 A	4 B 0 6 3
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 C	4 B 0 6 5
審査請求 有 請求項の数 53 O L (全 116 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-149091 (P2008-149091)	(71) 出願人	506181531
(22) 出願日	平成20年6月6日(2008.6.6)		ファイザー インコーポレイティッド
(62) 分割の表示	特願2006-549399 (P2006-549399) の分割		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー ヨーク イースト 42番 ストリート 235
原出願日	平成17年1月7日(2005.1.7)	(71) 出願人	506236185
(31) 優先権主張番号	60/535,490		アムジェン フレモント インコーポレイ ティッド
(32) 優先日	平成16年1月9日(2004.1.9)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレ モント カイザー ドライブ 6701
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 MAdCAMに対する抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】炎症性腸疾患に対してMAdCAMに関係した治療法等の提供。

【解決手段】ヒトMAdCAMへ特異的に結合し、かつMAdCAMを阻害するように機能する、ヒト抗体およびそれらの抗原結合部分を含む抗体に関する。また、ヒト抗MAdCAM抗体およびそれらの抗原結合部分に関する。また、キメラ、二重特異性、誘導体化、一本鎖抗体または融合タンパク質の部分である抗体に関する。また、ヒト抗MAdCAM抗体由来の単離された重鎖および軽鎖免疫グロブリン、ならびにそのような免疫グロブリンをコードする核酸分子に関する。また、ヒト抗MAdCAM抗体、これらの抗体を含む組成物を作製する方法、ならびに診断および処置のために抗体および組成物を使用する方法に関する。また、ヒト抗MAdCAM抗体を含む重鎖および/または軽鎖免疫グロブリン分子をコードする核酸分子を用いる遺伝子治療法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

粘膜アドレシン細胞接着分子(MAdCAM)へ特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項2】

以下の性質の少なくとも1つを有する、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体または抗原結合部分：

- (a) ヒト細胞に結合する性質；
- (b) VCAMまたはフィブロネクチンと比較した少なくとも100倍のMAdCAMに対する選択性をもつ性質；
- (c) 3×10^{-10} Mまたはそれ以下の K_d でヒトMAdCAMに結合する性質；または
- (d) $\alpha_4 \beta_7$ 発現細胞のヒトMAdCAMへの結合を阻害する性質；
- (e) 胃腸リンパ組織へのリンパ球の補充を阻害する性質。

10

【請求項3】

3×10^{-10} Mまたはそれ以下の K_d でヒトMAdCAMと結合し、かつヒトMAdCAMへの $\alpha_4 \beta_7$ の結合を阻害する、請求項2記載のヒトモノクローナル抗体または抗原結合部分。

【請求項4】

ハイブリドーマが1.7.2(ECACCアクセッション番号03090901)、1.8.2(ECACCアクセッション番号03090902)、6.14.2(ECACCアクセッション番号03090903)、6.22.2(ECACCアクセッション番号03090904)、6.34.2(ECACCアクセッション番号03090905)、6.67.1(ECACCアクセッション番号03090906)、6.73.2(ECACCアクセッション番号03090907)、6.77.1(ECACCアクセッション番号03090908)、7.16.6(ECACCアクセッション番号03090909)、7.20.5(ECACCアクセッション番号03090910)、7.26.4(ECACCアクセッション番号03090911)、および9.8.2(ECACCアクセッション番号03090912)からなる群より選択される、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。

20

【請求項5】

請求項4記載のハイブリドーマ細胞系により産生されるヒトモノクローナル抗体、または該モノクローナル抗体の抗原結合部分。

【請求項6】

重鎖C末端リシンが切断されている、請求項5記載のヒトモノクローナル抗体。

30

【請求項7】

抗体または抗原結合部分が、ヒトMAdCAMの $\alpha_4 \beta_7$ への結合を阻害し、かつ抗体またはその部分が以下の性質の少なくとも1つを有し、ここで参照抗体が、モノクローナル抗体1.7.2、モノクローナル抗体1.8.2、モノクローナル抗体6.14.2、モノクローナル抗体6.22.2、モノクローナル抗体6.34.2、モノクローナル抗体6.67.1、モノクローナル抗体6.73.2、モノクローナル抗体6.77.1、モノクローナル抗体7.16.6、モノクローナル抗体7.20.5、モノクローナル抗体7.26.4、モノクローナル抗体9.8.2、モノクローナル抗体6.22.2-mod、モノクローナル抗体6.34.2-mod、モノクローナル抗体6.67.1-mod、モノクローナル抗体6.77.1-modおよびモノクローナル抗体7.26.4-modからなる群より選択される、請求項1または5のいずれか記載のヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分：

40

- (a) MAdCAMへの結合について参照抗体と交差競合する性質；
- (b) MAdCAMへの結合について参照抗体と競合する性質；
- (c) 参照抗体と同じMAdCAMのエピトープに結合する性質；
- (d) 参照抗体と実質的に同じ K_d でMAdCAMに結合する性質；
- (e) 参照抗体と実質的に同じ解離速度でMAdCAMに結合する性質；

。

【請求項8】

以下のものからなる群より選択される、MAdCAMと特異的に結合するモノクローナル抗体：

- (a) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:4に示されたアミノ酸配列を

50

含む抗体；

(b)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(c)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:10およびSEQ ID NO:12に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(d)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:14およびSEQ ID NO:16に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(e)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:20に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(f)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:22およびSEQ ID NO:24に示されたアミノ酸配列を含む抗体； 10

(g)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:26およびSEQ ID NO:28に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(h)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:30およびSEQ ID NO:32に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(i)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:34およびSEQ ID NO:36に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(j)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:38およびSEQ ID NO:40に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(k)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:42およびSEQ ID NO:44に示されたアミノ酸配列を含む抗体； 20

(l)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:46およびSEQ ID NO:48に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(m)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:52およびSEQ ID NO:54に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(n)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:56およびSEQ ID NO:58に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(o)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:60およびSEQ ID NO:62に示されたアミノ酸配列を含む抗体；

(p)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:64およびSEQ ID NO:66に示されたアミノ酸配列を含む抗体；ならびに 30

(q)シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:42およびSEQ ID NO:68に示されたアミノ酸配列を含む抗体。

【請求項 9】

抗体またはその部分の重鎖が、以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の重鎖CDR1、CDR2およびCDR3を含む、または軽鎖が、以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合部分：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod。 40

【請求項 10】

ヒトVH 1-18遺伝子、ヒトVH 3-15遺伝子、ヒトVH 3-21遺伝子、ヒトVH 3-23遺伝子、ヒトVH 3-30遺伝子、ヒトVH 3-33遺伝子、またはヒトVH 4-4遺伝子を利用する重鎖を含む、請求項9記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分。

【請求項 11】

ヒトVk A2遺伝子、ヒトVk A3遺伝子、ヒトVk A26遺伝子、ヒトVk B3遺伝子、ヒトVk O12遺伝子、またはヒトVk O18遺伝子を利用する軽鎖を含む、請求項10記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 12】

重鎖可変領域、軽鎖可変領域または両方が、以下のものからなる群より選択されるモノ 50

クローナル抗体の対応する領域とアミノ酸配列において少なくとも90%同一である、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体または抗原結合部分：モノクローナル抗体1.7.2、モノクローナル抗体1.8.2、モノクローナル抗体6.14.2、モノクローナル抗体6.22.2、モノクローナル抗体6.34.2、モノクローナル抗体6.67.1、モノクローナル抗体6.73.2、モノクローナル抗体6.77.1、モノクローナル抗体7.16.6、モノクローナル抗体7.20.5、モノクローナル抗体7.26.4、モノクローナル抗体9.8.2、モノクローナル抗体6.22.2-mod、モノクローナル抗体6.34.2-mod、モノクローナル抗体6.67.1-mod、モノクローナル抗体6.77.1-modおよびモノクローナル抗体7.26.4-mod。

【請求項 1 3】

以下である、MAdCAMと特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分：

(a) 重鎖が、以下のものからなる群より選択される参照抗体の重鎖CDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列を含む：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod；

(b) 軽鎖が、以下のものからなる群より選択される参照抗体の軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列を含む：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod；

(c) 抗体が、(a)の重鎖および(b)の軽鎖を含む；ならびに

(d) 重鎖および軽鎖CDRアミノ酸配列が同じ参照抗体から選択される、(c)の抗体。

【請求項 1 4】

重鎖、軽鎖または両方が、参照抗体の、それぞれ、重鎖、軽鎖または両方のCDR1の始まりからCDR3の終わりまでのアミノ酸配列を含む、請求項13記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分。

【請求項 1 5】

抗体が以下のものを含む、請求項13記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分：

(a) 以下のものからなる群より選択される抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列を含む重鎖：1.7.2(SEQ ID NO:2)；1.8.2(SEQ ID NO:6)；6.14.2(SEQ ID NO:10)；6.22.2(SEQ ID NO:14)；6.34.2(SEQ ID NO:18)；6.67.1(SEQ ID NO:22)；6.73.2(SEQ ID NO:26)；6.77.1(SEQ ID NO:30)；7.16.6(SEQ ID NO:34)；7.20.5(SEQ ID NO:38)；7.26.4(SEQ ID NO:42)；および9.8.2(SEQ ID NO:46)；6.22.2-mod(SEQ ID NO:52)；6.34.2-mod(SEQ ID NO:56)；6.67.1-mod(SEQ ID NO:60)；6.77.1-mod(SEQ ID NO:64)；および7.26.4-mod(SEQ ID NO:42)；

(b) 以下のものからなる群より選択される抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む軽鎖：1.7.2(SEQ ID NO:4)；1.8.2(SEQ ID NO:8)；6.14.2(SEQ ID NO:12)；6.22.2(SEQ ID NO:16)；6.34.2(SEQ ID NO:20)；6.67.1(SEQ ID NO:24)；6.73.2(SEQ ID NO:28)；6.77.1(SEQ ID NO:32)；7.16.6(SEQ ID NO:36)；7.20.5(SEQ ID NO:40)；7.26.4(SEQ ID NO:44)；および9.8.2(SEQ ID NO:48)；6.22.2-mod(SEQ ID NO:54)；6.34.2-mod(SEQ ID NO:58)；6.67.1-mod(SEQ ID NO:62)；6.77.1-mod(SEQ ID NO:66)；および7.26.4-mod(SEQ ID NO:68)；または

(c) (a)の重鎖および(b)の軽鎖。

【請求項 1 6】

免疫グロブリンG(IgG)、IgM、IgE、およびIgAもしくはIgD分子、ヒト化抗体、キメラ抗体または二重特異性抗体である、請求項1～3および請求項5～15のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 7】

Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片または一本鎖抗体である、請求項1～3、5～7および9～16のいずれか一項記載の抗原結合部分。

【請求項 1 8】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗

10

20

30

40

50

原結合部分の有効量および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物。

【請求項 19】

炎症性疾患を、処置を必要としている被験者において処置する方法であって、請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を該被験者へ投与する段階を含み、該抗体または抗原結合部分がMAdCAMの $\alpha_4\beta_7$ への結合を阻害する、方法。

【請求項 20】

炎症性疾患が胃腸管の炎症性疾患である、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

胃腸管の炎症性疾患が、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、憩室疾患、胃炎、肝臓疾患、原発性胆汁性硬化症および硬化性胆管炎からなる群より選択される、請求項20記載の方法。

10

【請求項 22】

炎症性腸疾患が、クローン病、潰瘍性大腸炎または両方である、請求項20記載の方法。

【請求項 23】

炎症性疾患がインスリン依存性糖尿病および移植片対宿主病である、請求項20記載の方法。

【請求項 24】

請求項1～3および5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分、または該抗体もしくは該その部分の重鎖もしくは軽鎖を産生する単離された細胞系。

20

【請求項 25】

1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、および9.8.2からなる群より選択される抗体、または該抗体の1つのアミノ酸配列を含む抗体を産生する、請求項4または24のいずれか記載の細胞系。

【請求項 26】

6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-modからなる群より選択されるモノクローナル抗体、または該抗体の1つのアミノ酸配列を含む抗体を産生する、請求項25記載の細胞系。

【請求項 27】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載の抗体の重鎖もしくはその抗原結合部分、または軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

30

【請求項 28】

核酸分子に機能的に連結された発現制御配列を任意で含む、請求項27記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 29】

請求項28記載のベクターまたは請求項27記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 30】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載の抗体または抗原結合部分の、重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子、ならびに軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子を含む、請求項29記載の宿主細胞。

40

【請求項 31】

MAdCAMと特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を作製する方法であって、請求項29もしくは30記載の宿主細胞または請求項4もしくは24のいずれか記載の細胞系を適した条件下で培養する段階、および該抗体または抗原結合部分を回収する段階を含む、方法。

【請求項 32】

請求項1～3または5～17のいずれか一項記載の抗体の、(a)重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子；(b)軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子；または(c)(a)および(b)の両方を含む、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェ

50

ニック植物であって、該重鎖または軽鎖または両方を発現させる、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物。

【請求項 3 3】

請求項32記載の非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物から抗体を単離する段階を含む、MAdCAMへ特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を単離する方法。

【請求項 3 4】

以下の段階を含む、MAdCAMへ特異的に結合し、かつ $\alpha_4\beta_7$ への結合を阻害する、ヒト抗体またはその抗原結合部分で処置を必要としている被験者を処置する方法：

- (a)重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子、軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子、または軽鎖および重鎖またはそれらの抗原結合部分をコードする核酸分子の有効量を投与する段階；および
(b)核酸分子を発現させる段階。

【請求項 3 5】

以下の段階を含む、MAdCAMと特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を産生するための方法：

- (a)ヒト抗体を産生する能力がある非ヒトトランスジェニック動物をMAdCAMで、MAdCAMの免疫原性部分で、またはMAdCAMを発現させる細胞もしくは組織で、免疫する段階；および
(b)トランスジェニック動物をMAdCAMに対する免疫応答を開始するようにさせておく段階

。

【請求項 3 6】

請求項35記載の方法により産生されるヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3 7】

ヒトMAdCAMを発現させる細胞への $\alpha_4\beta_7$ の結合を阻害する方法であって、請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分とその細胞を接触させる段階を含む、方法。

【請求項 3 8】

MAdCAM媒介性白血球内皮細胞接着を阻害するための方法であって、請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分とその内皮細胞を接触させる段階を含む、方法。

【請求項 3 9】

組織へのMAdCAM媒介性白血球の接着、遊走および浸潤を阻害するための方法であって、請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分とその内皮細胞を接触させる段階を含む、方法。

【請求項 4 0】

ヒトMAdCAMを発現させる細胞を請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と接触させる段階を含む、 $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM依存性細胞接着を阻害するための方法。

【請求項 4 1】

ヒトMAdCAMを発現させる細胞を請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と接触させる段階を含む、リンパ球の胃腸リンパ組織へのMAdCAM媒介性補充を阻害するための方法。

【請求項 4 2】

MAdCAMと特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、以下のものからなる群より選択されるヒトモノクローナル抗体のFR1、FR2、FR3もしくはFR4アミノ酸配列の1つまたは複数を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合部分：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod。

【請求項 4 3】

抗体が以下のものを含む、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体または抗原結合部分

:

(a)以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の重鎖アミノ酸配列と少なくとも90%同一である重鎖アミノ酸配列：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod；

(b)以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の軽鎖アミノ酸配列と少なくとも90%同一である軽鎖アミノ酸配列：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod；

(c)(a)および(b)の両方；または

(d)シグナル配列を持つもしくは持たない(a)、(b)または(c)のいずれか。

10

【請求項44】

以下の段階を含む、循環している可溶性ヒトMAdCAMを特徴とする疾患を診断するための方法：(1)生体試料を請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分と接触させる段階、ならびに(2)結合を検出する段階。

【請求項45】

以下の段階を含む、被験者において炎症を検出するための方法：(1)請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分を該被験者へ投与する段階であって、該抗体またはその部分が検出可能に標識されている、段階、ならびに(2)結合を検出する段階。

20

【請求項46】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分を含む診断キット。

【請求項47】

1つもしくは複数の追加の抗炎症性剤または免疫調節剤をさらに含む、請求項18記載の薬学的組成物。

【請求項48】

1つもしくは複数の追加の抗炎症性剤または免疫調節剤が以下のものからなる群より選択される、請求項47記載の薬学的組成物：コルチコステロイド、アミノサリチラート、アザチオプリン、メトトレキセート、シクロスポリン、FK506、IL-10、GM-CSF、ラパマイシン、抗TNF α 剤、および接着分子アンタゴニスト。

30

【請求項49】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のヒト抗体または抗原結合部分の有効量ならびに薬学的に許容される担体を含むワクチン。

【請求項50】

ワクチンが粘膜性である、請求項49記載のワクチン。

【請求項51】

以下の段階を含む、阻害性抗MAdCAM抗体またはその抗原結合部分の被験者への投与の効果を検出する方法：

(a)MAdCAMへ特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を被験者へ投与する段階；および

(b)循環している $\alpha_4\beta_7$ 発現白血球のレベルにおける増加があるかどうかを測定する段階。

40

【請求項52】

白血球がリンパ球である、請求項51記載の方法。

【請求項53】

循環している $\alpha_4\beta_7$ 発現白血球のレベルにおける増加がFACS分析により測定される、請求項51記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

50

本願は、2004年1月9日に出願された米国仮出願第60/535,490号の恩典を主張する。

【0002】

発明の背景

粘膜アドレシン細胞接着分子(mucosal addressin cell adhesion molecule) (MAdCAM) は、細胞接着受容体の免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。特定化されたリンパ組織および胃腸管の粘膜部位へのリンパ球ホーミングの選択性は、MAdCAMの内皮発現により決定される(Berlin, C. et al., Cell, 80:413-422 (1994) (非特許文献1); Berlin, C., et al., Cell, 74:185-195 (1993) (非特許文献2); およびErle, D.J., et al., J. Immunol., 153:517-528 (1994) (非特許文献3))。MAdCAMは、パイエル板および腸間膜リンパ節のような組織化された腸リンパ組織の高内皮性細静脈の細胞表面上に固有に発現されているが(Streeter et al., Nature, 331:41-6 (1988) (非特許文献4); Nakache et al., Nature, 337:179-81 (1989) (非特許文献5); Briskin et al., Am. J. Pathol. 151:97-110 (1997) (非特許文献6))、膵臓、胆嚢、ならびに白脾髄の脾細静脈および周縁洞のような他のリンパ器官においても発現されている(Briskin et al. (1997) 前記 (非特許文献6); Kraal et al., Am. J. Path., 147:763-771 (1995) (非特許文献7))。

【0003】

MAdCAMは、腸管免疫監視に生理学的役割を果たしているが、慢性胃腸管炎症の条件下で炎症性腸疾患において過剰リンパ球血管外遊走を促進するように思われる。TNF α および他の炎症誘発性のサイトカインは、内皮MAdCAM発現を増加させ、クローン病および潰瘍性大腸炎をもつ患者から採取された生検標本において、炎症の部位にMAdCAM発現の約2~3倍の限局的増加がある(Briskin et al. (1997) (非特許文献6), Souza et al., Gut, 45:856-63 (1999) (非特許文献8); Arihiro et al., Pathol Int., 52:367-74 (2002) (非特許文献9))。大腸炎の実験モデルにおいて、同様の発現の上昇が観察された(Hesterberg et al., Gastroenterology, 111:1373-1380(1997) (非特許文献10); Picarella et al., J. Immunol., 158:2099-2106 (1997) (非特許文献11); Connor et al., J Leukoc Biol., 65:349-55(1999) (非特許文献12); Kato et al., J Pharmacol Exp Ther., 295:183-9(2000) (非特許文献13); Hokari et al., Clin Exp Immunol., 26:259-65(2001) (非特許文献14); Shigematsu et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 281:G1309-15(2001) (非特許文献15))。インスリン依存性糖尿病(Yang et al. Diabetes, 46:1542-7 (1997) (非特許文献16); Hanninen et al., J Immunol., 160:6018-25 (1998) (非特許文献17))、移植片対宿主病(Fujisaki et al., Scand J Gastroenterol., 38:437-42 (2003) (非特許文献18), Murai et al., Nat Immunol., 4:154-60 (2003) (非特許文献19))、慢性肝疾患(Hillan et al., Liver, 19:509-18 (1999) (非特許文献20); Grant et al., Hepatology, 33:1065-72 (2001) (非特許文献21))、炎症性脳症(Stalder et al., Am J Pathol., 153:767-83 (1998) (非特許文献22); Kanawar et al., Immunol Cell Biol., 78:641-5 (2000) (非特許文献23))、および胃炎(Barrett et al., J Leukoc Biol., 67:169-73 (2000) (非特許文献24); Hatanaka et al., Clin Exp Immunol., 130:183-9 (2002) (非特許文献25))のような炎症性状態についての他の前臨床モデルにおいて、疾患病因に、胎児MAdCAM発現の再覚醒および活性化 $\alpha_4\beta_7$ リンパ球の関与もある。これらの炎症性モデルに加えて、ハプテン媒介性(例えば、TNBS、DSSなど)または養子移入(CD4⁺CD45Rb^{high})マウス大腸炎モデルにおいて、 $\alpha_4\beta_7$ リンパ球のMAdCAMへの結合をブロックするラット抗マウスMAdCAMモノクローナル抗体(mAb)、MECA-367、はリンパ球補充、組織血管外遊走、炎症および疾患重症度を低減させる。ヒトMAdCAMに対するマウスモノクローナル抗体(mAb)もまた、報告されている(例えば、WO 96/24673 (特許文献1) およびWO 99/58573 (特許文献2) 参照)。

【0004】

炎症性腸疾患(IBD)および胃腸管または他の組織に関連した他の炎症性疾患におけるMAdCAMの役割を考慮すれば、 $\alpha_4\beta_7$ 結合およびMAdCAM媒介性白血球補充を阻害するための手段は望ましい。限定されるわけではないが、患者における他の薬物との望ましくない相互

作用の非存在、ヒトにおけるpK/pD値、溶解性、安定性、有効期間およびインビボの半減期のような好ましい物理化学的性質を含む有利な性質をもつそのような治療的手段を有することがさらに望ましいように思われる。抗体のような治療性タンパク質は、有利には、望ましくない翻訳後修飾または凝集体形成がないことであろう。従って、治療性抗MadCAM抗体についての重要な必要性がある。

【特許文献1】WO 96/24673

【特許文献2】WO 99/58573

【非特許文献1】Berlin, C. et al., Cell, 80:413-422 (1994)

【非特許文献2】Berlin, C., et al., Cell, 74:185-195 (1993)

【非特許文献3】Erle, D.J., et al., J. Immunol., 153:517-528 (1994)

10

【非特許文献4】Streeter et al., Nature, 331:41-6 (1988)

【非特許文献5】Nakache et al., Nature, 337:179-81 (1989)

【非特許文献6】Briskin et al., Am. J. Pathol. 151:97-110 (1997)

【非特許文献7】Kraal et al., Am. J. Pathol., 147:763-771 (1995)

【非特許文献8】Souza et al., Gut, 45:856-63 (1999)

【非特許文献9】Arihiro et al., Pathol Int., 52:367-74 (2002)

【非特許文献10】Hesterberg et al., Gastroenterology, 111:1373-1380(1997)

【非特許文献11】Picarella et al., J. Immunol., 158:2099-2106 (1997)

【非特許文献12】Connor et al., J Leukoc Biol., 65:349-55(1999)

【非特許文献13】Kato et al., J Pharmacol Exp Ther., 295:183-9(2000)

20

【非特許文献14】Hokari et al., Clin Exp Immunol., 26:259-65(2001)

【非特許文献15】Shigematsu et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 281:G1309-15(2001)

【非特許文献16】Yang et al. Diabetes, 46:1542-7 (1997)

【非特許文献17】Hanninen et al., J Immunol., 160:6018-25 (1998)

【非特許文献18】Fujisaki et al., Scand J Gastroenterol., 38:437-42 (2003)

【非特許文献19】Murai et al., Nat Immunol., 4:154-60 (2003)

【非特許文献20】Hillan et al., Liver, 19:509-18 (1999)

【非特許文献21】Grant et al., Hepatology, 33:1065-72 (2001)

【非特許文献22】Stalder et al., Am J Pathol., 153:767-83 (1998)

30

【非特許文献23】Kanawar et al., Immunol Cell Biol., 78:641-5 (2000)

【非特許文献24】Barrett et al., J Leukoc Biol., 67:169-73 (2000)

【非特許文献25】Hatanaka et al., Clin Exp Immunol., 130:183-9 (2002)

【発明の開示】

【0005】

発明の概要

本発明は、MadCAMと特異的に結合する単離された抗体であって、その抗体の少なくともCDR配列がヒトCDR配列である抗体、またはその抗体の抗原結合部分を提供する。いくつかの態様において、抗体は、ヒト抗体、好ましくは、MadCAMアンタゴニストとして作用する抗体である。その抗体または部分を含む組成物もまた、提供される。

40

【0006】

本発明はまた、その抗MadCAMアンタゴニスト抗体の重鎖および/もしくは軽鎖、またはその可変領域もしくは他の抗原結合部分、または前記のいずれかをコードする核酸分子、ならびに薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。本発明の組成物は、治療剤または診断剤のようなもう一つの成分をさらに含む。診断および治療方法もまた、本発明により提供される。

【0007】

本発明はさらに、その抗MadCAM抗体またはその抗原結合部分を産生する単離された細胞系を提供する。

【0008】

50

本発明はまた、その抗MadCAM抗体の重鎖および/もしくは軽鎖、またはその可変領域、またはその抗原結合部分をコードする核酸分子を提供する。

【0009】

本発明は、その核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞、加えて、核酸分子によりコードされるポリペプチドを組換え技術で産生する方法を提供する。

【0010】

その抗MadCAM抗体の重鎖および/もしくは軽鎖、またはその抗原結合部分を発現させる非ヒトのトランスジェニック動物または植物もまた、提供される。

【0011】

発明の詳細な説明

定義および一般的な技術

本明細書で他に定義されていない限り、本発明に関連して用いられる科学および技術的用語は、当業者により一般に理解されている意味をもつものとする。さらに、文脈により別に必要とされない限り、単数形用語は、複数形を含むものとし、複数形用語は、単数形を含むものとする。一般的に、本明細書に記載された、細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質および核酸化学、ならびにハイブリダイゼーション、に関連して用いられる名称、ならびに、の技術は、当技術分野において周知かつ一般に用いられているものである。本発明の方法および技術は、一般的に、他に規定がない限り、当技術分野において周知の通常の方法により、ならびに本明細書を通して引用および考察されている様々な一般およびより特定の参考文献に記載されているように、行われる。例えば、参照により本明細書に組み入れられているが、Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), およびHarlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)を参照されたい。酵素反応および精製技術は、当技術分野において一般に達成されているように、または本明細書に記載されているように、製造会社の仕様書により行われる。標準技術は、化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、ならびに送達、および患者の処置のために用いられる。

【0012】

他に規定がない限り、以下の用語は、以下の意味をもつと理解されるものとする。

【0013】

「ポリペプチド」という用語は、天然または人工のタンパク質、タンパク質断片、およびタンパク質配列のポリペプチド類似体を含む。ポリペプチドは、単量体または重合体でありうる。

【0014】

「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」という用語は、その誘導の起源または源に基づいて、(1)その天然状態でそれに付随する天然で会合した成分と会合していない、(2)同じ種由来の他のタンパク質を含まない、(3)異なる種由来の細胞により発現されている、または(4)天然において存在していない、タンパク質またはポリペプチドである。従って、化学合成されている、またはそれが天然で生じている細胞とは異なる細胞系で合成されているポリペプチドは、その天然で会合した成分から「単離される」。タンパク質はまた、当技術分野において周知のタンパク質精製技術を用いる単離により天然で会合した成分を実質的に含まないようにされうる。

【0015】

タンパク質またはポリペプチドは、試料の少なくとも約60~75%がポリペプチドの単一種を示す場合、「実質的に純粋である」、「実質的に均質である」、または「実質的に精製されている」。ポリペプチドまたはタンパク質は、単量体または多量体でありうる。実質的に純粋なポリペプチドまたはタンパク質は、典型的には、タンパク質試料の約50%、60%、70%、80%または90%W/W、より通常には約95%、を含み、および好ましくは、99%を越え

10

20

30

40

50

て純粋である。タンパク質純度または均質性は、タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動、続いて、当技術分野において周知の染色でゲルを染色するにおいて単一のポリペプチドバンドを可視化することのような、当技術分野において周知のいくつかの手段により示されうる。特定の目的のために、より高い分解能が、HPLCまたは精製について当技術分野において周知の他の手段を用いることにより提供されうる。

【0016】

本明細書に用いられる場合、「ポリペプチド断片」という用語は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失をもつポリペプチドであるが、残りのアミノ酸配列は、天然に存在する配列における対応する位置と同一である、ポリペプチドを指す。いくつかの態様において、断片は、少なくとも5、6、8、または10アミノ酸長である。他の態様において、断片は、少なくとも14アミノ酸長、より好ましくは少なくとも20アミノ酸長、通常には少なくとも50アミノ酸長、よりいっそう好ましくは少なくとも70、80、90、100、150または200アミノ酸長である。

【0017】

本明細書に用いられる場合、「ポリペプチド類似体」という用語は、アミノ酸配列の一部との実質的同一性をもち、かつ以下の性質の少なくとも1つをもつ、少なくとも25アミノ酸のセグメントを含むポリペプチドを指す：(1)適した結合条件下でのMAdCAMへの特異的結合、(2) $\alpha_4\beta_7$ インテグリンおよび/もしくはL-セレクトインのMAdCAMへの結合を阻害する能力、または(3)インビトロもしくはインビボでのMAdCAM細胞表面発現を低下させる能力。典型的には、ポリペプチド類似体は、天然に存在する配列に対して保存的アミノ酸置換(または挿入または欠失)を含む。類似体は、典型的には、少なくとも20アミノ酸長、好ましくは少なくとも50、60、70、80、90、100、150もしくは200アミノ酸長またはそれ以上であり、しばしば、完全長の天然に存在するポリペプチドくらいの長さでありうる。

【0018】

好ましいアミノ酸置換は、以下であるものである。(1)タンパク分解に対する感受性を低下させる、(2)酸化に対する感受性を低下させる、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させる、(4)結合親和性を変化させる、または(5)そのような類似体の他の物理化学的もしくは機能的性質を与えるもしくは改変する。類似体は、天然に存在するペプチド配列以外の配列の様々な突然変異タンパク質を含みうる。例えば、単一または複数のアミノ酸置換(好ましくは保存的アミノ酸置換)は、天然に存在する配列において(好ましくは、分子間接触を形成するドメインの外側のポリペプチドの部分において)、なされうる。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造的特性を実質的には変化させないであるべきである(例えば、置換アミノ酸は、親配列に生じているヘリックスを破壊しないまたは親配列を特徴付ける他の型の二次構造を乱さない傾向があるべきである)。技術分野に認められているポリペプチド二次および三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991); およびThornton et al., Nature, 354:105 (1991)に記載されており、それらは、それぞれ、参照により本明細書に組み入れられている。

【0019】

非ペプチド類似体は、鋳型ペプチドのと類似した性質をもつ薬物として製薬産業において一般に用いられる。これらの型の非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体(peptide mimetics)」または「ペプチド模倣体(peptidomimetics)」と名付けられる。Fauchere, J. Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber and Freidinger, TINS, p.392 (1985); およびEvans et al., J. Med. Chem., 30:1229 (1987)、それらは参照により本明細書に組み入れられている。そのような化合物は、しばしば、コンピュータ化された分子モデリングの助けを借りて、開発される。治療的に有用なペプチドに構造的に類似しているペプチド模倣体は、等価の治療的または予防的効果を生じるように用いられうる。一般的に、ペプチド模倣体は、ヒト抗体のようなパラダイムポリペプチド(すなわち、所望の生化学的性質または薬理学的活性をもつポリペプチド)に構造的に類似しているが、当技術分野において周

知の方法により、 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (シスおよびトランス)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、および $-\text{CH}_2\text{SO}-$ のような結合により任意で置換された1つまたは複数のペプチド結合を有する。共通配列の1つまたは複数のアミノ酸の、同じ型のD-アミノ酸での系統的置換(例えば、L-リシンの代わりにD-リシン)もまた、より安定したペプチドを作製するために用いられうる。さらに、共通配列または実質的に同一の共通配列変異を含む束縛されたペプチドが、当技術分野において公知の方法により(参照により本明細書に組み入れられている、Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)); 例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成する能力がある内部システイン残基を付加することにより、作製されうる。

【0020】

「免疫グロブリン」は、四量体分子である。天然に存在する免疫グロブリンにおいて、各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成され、各鎖は、1つの「軽」鎖(約25 kDa)および1つの「重」鎖(約50~70 kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識に関与する約100~110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主としてエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、 κ および λ 軽鎖として分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、 α 、または ϵ として分類され、それぞれ、IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして抗体のアイソタイプを定義する。軽鎖および重鎖内において、可変および定常領域は、約12個またはそれ以上のアミノ酸の「J」領域により連結され、重鎖はまた、約10個またはそれ以上のアミノ酸の「D」領域を含む。一般的には、*Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第2版 Raven Press, N.Y. (1989))(すべての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられている)。各軽/重鎖対の可変領域は、無傷の免疫グロブリンが2つの結合部位を有するように抗体結合部位を形成する。

【0021】

免疫グロブリン鎖は、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる、3つの超可変領域により連結された相対的に保存されたフレームワーク領域(FR)の同じ一般的構造を示す。各対の2つの鎖由来のCDRは、エピトープ特異的結合部位を形成するようにフレームワーク領域により一列に並べられる。N末端からC末端へ、両方の軽鎖および重鎖は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割当は、カバット(Kabat)の定義、*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987および1991))、またはChothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342:878-883 (1989)(それぞれは、全体として参照により本明細書に組み入れられている)、に従っている。

【0022】

「抗体」は、無傷の免疫グロブリン、または特異的結合において無傷抗体と競合するその抗原結合部分を指す。いくつかの態様において、抗体は、その抗原結合部分である。抗原結合部分は、組換えDNA技術により、または無傷抗体の酵素的もしくは化学的切断により、作製されうる。抗原結合部分は、とりわけ、Fab、Fab'、 F(ab')_2 、Fv、dAb、および相補性決定領域(CDR)断片、一本鎖抗体(scFv)、キメラ抗体、ダイアボディ、ならびにポリペプチドに特異的抗原結合を与えるのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むポリペプチドを含む。Fab断片は、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価の断片である; F(ab)_2 断片は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価の断片である; Fd断片は、VHおよびCH1ドメインからなる; Fv断片は、抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなる; ならびにdAb断片(Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989))はVHドメインからなる。

【0023】

本明細書に用いられる場合、例えば、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.34.2、6.67.1、6.77.2、7.16.6、7.20.5、7.26.4または9.8.2と呼ばれる抗体は、同じ名前のハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である。例えば、1.7.2は、ハイブリドーマ1.7.2により産生される。6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modと呼

ばれる抗体は、配列が、部位特異的突然変異誘発によりその対応する親から改変されている、モノクローナル抗体である。

【0024】

一本鎖抗体(scFv)は、VLおよびVH領域が、それらが単一のタンパク質鎖として作製されるのを可能にする合成リンカーを介して一価の分子を形成するように組み合わせられている抗体である(Bird et al., Science, 242:423-426 (1988)およびHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988))。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが単一ポリペプチド鎖上に発現されている二価の、二重特異性抗体であるが、同じ鎖上の2つのドメイン間での対形成を可能にするには短すぎるリンカーを用い、それにより、もう一つの鎖の相補性ドメインと対形成するようにドメインを強制している(例えば、Holliger, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)およびPoljak, R. J., et al., Structure, 2:1121-1123 (1994)参照)。本発明の抗体由来の1つまたは複数のCDRは、それをMAdCAMへ特異的に結合するイムノアドヘンシンのように共有結合性かまたは非共有結合性かのいずれかで分子へ組み入れられうる。イムノアドヘンシンは、CDRをより大きなポリペプチド鎖の部分として組み入れうる、CDRをもう一つのポリペプチド鎖へ共有結合性に連結しうる、またはCDRを非共有結合性に組み入れうる。CDRは、イムノアドヘンシが、対象となる特定の抗原へ特異的に結合するのを可能にする。

【0025】

抗体は、1つまたは複数の結合部位を有しうる。1つより多い結合部位がある場合には、結合部位は、お互いに同一でありうる、または異なりうる。例えば、天然に存在する免疫グロブリンは、2つの同一の結合部位を有する、一本鎖抗体またはFab断片は、1つの結合部位を有し、一方、「二重特異性」または「二機能性」抗体(ダイアボディ)は、2つの異なる結合部位を有する。

【0026】

「単離された抗体」は、(1)その天然状態でそれに付随する、他の天然で会合した抗体を含む天然で会合した成分と会合していない、(2)同じ種由来の他のタンパク質を含まない、(3)異なる種由来の細胞により発現されている、または(4)天然において存在していない、抗体である。単離された抗体の例は、MAdCAMを用いてアフィニティー精製された抗MAdCAM抗体、インビトロでハイブリドーマまたは他の細胞系により産生された抗MAdCAM抗体、およびトランスジェニック哺乳動物または植物由来のヒト抗MAdCAM抗体を含む。

【0027】

本明細書に用いられる場合、「ヒト抗体」という用語は、可変および定常領域配列がヒト配列である抗体を意味する。その用語は、ヒト遺伝子由来の配列をもつ抗体であるが、例えば、可能性のある免疫原性を減少させる、親和性を増加させる、望ましくない折り畳みを引き起こしうるシステインまたはグリコシル化部位を除去するなどのために変化させられている、抗体を含む。その用語は、ヒト細胞に典型ではないグリコシル化を与えうる非ヒト細胞において組換え技術で産生されるそのような抗体を含む。その用語はまた、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖の座位の一部または全部を含むトランスジェニックマウスにおいて産生された抗体を含む。

【0028】

一つの局面において、本発明は、ヒト化抗体を提供する。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、非ヒト種由来である抗体であって、重鎖および軽鎖のフレームワークならびに定常ドメインにおけるある特定のアミノ酸が、ヒトにおいて免疫応答を避けるまたは排除するために突然変異されている、抗体である。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、ヒト抗体由来の定常ドメインを非ヒト種の可変ドメインに融合させることにより作製されうる。ヒト化抗体を作製する方法の例は、米国特許第6,054,297号、第5,886,152号および第5,877,293号に見出されうる。いくつかの態様において、本発明のヒト化抗MAdCAM抗体は、本発明の1つもしくは複数のヒト抗MAdCAM抗体の1つまたは複数のフレームワーク領域のアミノ酸配列を含む。

【0029】

もう一つの局面において、本発明は、「キメラ抗体」を含む。いくつかの態様において、キメラ抗体は、一つの抗体由来の1つまたは複数の領域、および1つもしくは複数の他の抗体由来の1つまたは複数の領域を含む抗体を指す。好ましい態様において、CDRの1つまたは複数の領域は、本発明のヒト抗MadCAM抗体由来である。より好ましい態様において、CDRの全部が、本発明のヒト抗MadCAM抗体由来である。もう一つの好ましい態様において、本発明の1つより多いヒト抗MadCAM抗体由来のCDRは、キメラ抗体において、混合かつ組み合わせられる。例えば、キメラ抗体は、第二のヒト抗MadCAM抗体の軽鎖由来のCDR2およびCDR3と組み合わせられる、第一のヒト抗MadCAM抗体の軽鎖由来のCDR1を含み、重鎖由来のCDRは、第三の抗MadCAM抗体由来でありうる。さらに、フレームワーク領域は、同じ抗MadCAM抗体の1つ由来、ヒト抗体のような1つもしくは複数の異なる抗体由来、またはヒト化抗体由来でありうる。

【0030】

「中和抗体」、「阻害抗体」またはアンタゴニスト抗体は、 $\alpha_4\beta_7$ もしくは $\alpha_4\beta_7$ 発現細胞、または任意の他の同族リガンドもしくは同族リガンド発現細胞の、MadCAMへの結合を、少なくとも約20%、阻害する抗体である。好ましい態様において、抗体は、 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンまたは $\alpha_4\beta_7$ 発現細胞のMadCAMへの結合を、少なくとも40%、より好ましくは60%、よりいっそう好ましくは80%、85%、90%、95%または100%、低減する、また阻害する。結合低減は、当業者に公知の任意の手段により、例えば、インビトロの競合結合アッセイ法において測定されるように、測定される。 $\alpha_4\beta_7$ 発現細胞のMadCAMへの結合における低減を測定することの例は、実施例Iに示されている。

【0031】

抗体の断片または類似体は、本明細書の教示に従って、当業者により容易に調製される。断片または類似体の好ましいアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能性ドメインの境界近くに存在する。構造的および機能性ドメインは、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データの、公共または所有権を主張できる配列データベースとの比較により同定される。好ましくは、コンピュータ化された比較方法は、既知の構造および/または機能の他のタンパク質に存在する配列モチーフまたは推定のタンパク質立体構造ドメインを同定するために用いられる。既知の3次元構造へ折り畳むタンパク質配列を同定するための方法は公知である(Bowie et al., Science, 253:164 (1991))。

【0032】

本明細書に用いられる場合、「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、BIAcore システム(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度における変化の検出によりリアルタイムの生体特異的相互作用の分析を可能にする光学的現象を指す。さらなる説明について、Jonsson, U., et al., Ann. Biol. Clin., 51:19-26 (1993); Jonsson, U., et al., Biotechniques, 11:620-627 (1991); Johnsson, B., et al., J. Mol. Recognit., 8:125-131 (1995); および Johnsson, B., et al., Anal. Biochem., 198:268-277 (1991)を参照されたい。

【0033】

「 k_{off} 」という用語は、抗体/抗原複合体から抗体の解離についての解離速度定数を指す。

【0034】

「Kd」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離定数を指す。抗体は、解離定数が $\leq 1 \mu\text{M}$ 、好ましくは $\leq 100 \text{ nM}$ および最も好ましくは $\leq 10 \text{ nM}$ である場合、抗原と結合すると言われる。

【0035】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンもしくはT細胞受容体への特異的結合、または分子と別なふうに相互作用することの能力がある任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖のような分子の化学的活性のある表面群化からなり、通常、特異的な3次元構造特性、および特異的な電荷特性をもつ。エピト

ープは、「線状」または「立体構造」でありうる。線状エピトープにおいて、タンパク質と相互作用する分子(抗体のような)の間の相互作用の点のすべては、そのタンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線的に生じる。立体構造的エピトープにおいて、相互作用の点はお互いに分離されているタンパク質上のアミノ酸残基に渡って生じる。

【0036】

本明細書に用いられる場合、20個の通常のアミノ酸およびそれらの略語は、慣例的用法に従う。参照により本明細書に組み入れられている、Immunology - A Synthesis (第2版, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))を参照されたい。20個の通常のアミノ酸の立体異性体(例えば、D-アミノ酸)、 α -、 α -二置換型アミノ酸のような非天然アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、および他の非通常のアミノ酸は、本発明のポリペプチドについての適切な成分でありうる。非通常のアミノ酸の例は、以下のものを含む：4-ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタメート、 ϵ -N, N, N-トリメチルリシン、 ϵ -N-アセチルリシン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、s-N-メチルアルギニン、ならびに他の類似したアミノ酸およびイミノ酸(例えば、4-ヒドロキシプロリン)。本明細書に用いられるポリペプチド表記法において、標準的用法および慣例に従って、左手方向がアミノ末端方向であり、右手方向がカルボキシ末端方向である。

【0037】

本明細書に言及される場合の「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドまたはヌクレオチドのいずれかの型の改変された形のいずれかで、少なくとも10塩基長のヌクレオチドの重合体形を意味する。その用語は、DNAの一本鎖および二本鎖の形を含む。

【0038】

本明細書に用いられる場合の「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、ゲノム、cDNA、もしくは合成起源またはそれらのいくつかの組み合わせのポリヌクレオチドであって、その起源に基づいて、「単離されたポリヌクレオチド」が、(1)「単離されたポリヌクレオチド」が天然において見出されるポリヌクレオチドの全部もしくは一部と会合していない、(2)それが天然において連結されていないポリヌクレオチドへ機能的に連結されている、または(3)より大きな配列の部分として天然において存在していない、ポリヌクレオチドを意味するものとする。

【0039】

本明細書に言及される「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然に存在する、および天然に存在しないオリゴヌクレオチド結合により共に連結された、天然に存在するおよび改変されたヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、一般的に、200塩基またはそれ以下の長さを含むポリヌクレオチドサブセットである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、10~60塩基長および最も好ましくは、12、13、14、15、16、17、18、19、または20~40塩基長である。オリゴヌクレオチドは、通常、例えば、プローブについて、一本鎖である；オリゴヌクレオチドは、例えば、遺伝子変異体の構築用に、二本鎖でありうるが。本発明のオリゴヌクレオチドは、センスかまたはアンチセンスかのいずれかのオリゴヌクレオチドでありうる。

【0040】

本明細書に言及される「天然に存在するヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。本明細書に言及される「改変されたヌクレオチド」という用語は、修飾または置換された糖群などをもつヌクレオチドを含む。本明細書に言及される「オリゴヌクレオチド結合」という用語は、ホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオネート、ホスホラニラデート、ホスホラミダイトなどを含む。例えば、LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acids Res., 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical App

10

20

30

40

50

roach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., 米国特許第5,151,510号; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews, 90:543 (1990)を参照されたい、それらの開示は参照により本明細書に組み入れられている。オリゴヌクレオチドは、必要に応じて、検出のために標識を含みうる。

【0041】

「機能的に連結された」配列は、対象となる遺伝子と隣接する発現制御配列、および対象となる遺伝子を制御するようにトランスにまたは少し離れて作用する発現制御配列の両方を含む。本明細書に用いられる場合の「発現制御配列」という用語は、それらが連結されているコード配列の発現およびプロセッシングをもたらすのに必要であるポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列は、適切な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングのような効率的なRNAプロセッシングシグナルおよびポリアデニル化シグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を向上させる配列(すなわち、コザック(Kozak)共通配列)；タンパク質安定性を向上させる配列；ならびに、望ましい場合、タンパク質分泌を向上させる配列を含む。そのような制御配列の性質は、宿主生物体に依存して異なる；原核生物において、そのような制御配列は、一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を含む；真核生物において、一般的に、そのような制御配列は、プロモーターおよび転写終結配列を含む。「制御配列」という用語は、最小限でも、存在が発現およびプロセッシングに絶対必要であるすべての構成要素を含むように意図され、存在が有利である追加の構成要素、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列、も含みうる。

【0042】

本明細書に用いられる場合の「ベクター」という用語は、それが連結されているもう一つの核酸を輸送する能力がある核酸分子を指すように意図される。ベクターの1つの型は、「プラスミド」であり、追加のDNAセグメントが連結されうる環状の二本鎖DNAループを指す。ベクターのもう一つの型は、ウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントが、ウイルスゲノムの中へ連結されうる。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自律複製の能力がある(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソードの哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソードの哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入において宿主細胞のゲノムへ組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが機能的に連結されている遺伝子の発現を指揮する能力がある。そのようなベクターは、本明細書で、「組換え発現ベクター」(または、単に、「発現ベクター」)と呼ばれる。一般的に、組換えDNA技術における利用の発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形をとる。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般に用いられる形であるため、交換可能に用いられうる。しかしながら、本発明は、等価の機能を果たす、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような発現ベクターのそのような他の型を含むように意図される。

【0043】

本明細書に用いられる場合、「組換え宿主細胞」(または、単に、「宿主細胞」)という用語は、組換え発現ベクターが導入された細胞を指すように意図される。そのような用語が、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫を指すように意図されることは、理解されるべきである。突然変異かまたは環境的影響のせいで後世にある特定の改変が生じる可能性があるため、そのような子孫は、実際に、親細胞と同一ではない可能性があるが、本明細書に用いられる場合の「宿主細胞」という用語の範囲内になお含まれる。

【0044】

本明細書に言及される「選択的にハイブリダイズする」という用語とは、検出可能かつ特異的に結合することを意味する。本発明によるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびそれらの断片は、非特異的核酸への検出可能な結合のかなりの量を最小限にするハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で核酸鎖に選択的にハイブリダイズする。「高ストリンジェント性」または「高ストリンジェント」条件は、当技術分野において公知で、

本明細書で考察されているように、選択的ハイブリダイゼーション条件に達するために用いられうる。「高ストリンジェント性」または「高ストリンジェント」条件の例は、6X S SPEまたはSSC、50%ホルムアミド、5X デンハートの試薬、0.5%SDS、100 µg/ml 変性の断片化サケ精子DNAのハイブリダイゼーション緩衝液において、42℃のハイブリダイゼーション温度で、12~16時間、一方のポリヌクレオチドが膜のような固体表面へ付着されうる、ポリヌクレオチドをもう一つのポリヌクレオチドとインキュベートし、続いて、1X SSC、0.5%SDSの洗浄緩衝液を用いて55℃で2回、洗浄する方法である。Sambrook et al., 前記, pp. 9.50-9.55も参照。

【0045】

ヌクレオチド配列との関連での「パーセント配列同一性」という用語は、最大の一致のために整列された場合、同じである2つの配列における残基を指す。配列同一性比較の長さは、少なくとも約9ヌクレオチド、通常には少なくとも約18ヌクレオチド、より通常には少なくとも約24ヌクレオチド、典型的には少なくとも約28ヌクレオチド、より典型的には少なくとも約32ヌクレオチド、および好ましくは少なくとも約36、48またはそれ以上のヌクレオチドのひと続きに渡りうる。ヌクレオチド配列同一性を測定するために用いられうる当技術分野において公知のいくらかの異なるアルゴリズムがある。例えば、ポリヌクレオチド配列は、Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys, San Diego, CAにおけるプログラムである、FASTA、GapまたはBestfitを用いて比較されうる。FASTAは、例えば、プログラムFASTA2およびFASTA3を含むが、質問配列と検索配列の間の最高の重複の領域のアラインメントおよびパーセント配列同一性を提供する(Pearson, Methods Enzymol., 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol., 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol., 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol., 276:71-84 (1998); 参照により本明細書に組み入れられている)。他に特定されない限り、特定のプログラムまたはアルゴリズムについてのデフォルトパラメーターが用いられる。例えば、ヌクレオチド配列間のパーセント配列同一性は、参照により本明細書に組み入れられている、Wisconsin Package Version 10.3に提供されているのだが、デフォルトパラメーター(6のワードサイズおよびスコア行列についてのNOPAMファクター)でFASTAを用いて、またはデフォルトパラメーターでGapを用いて、決定されうる。

【0046】

ヌクレオチド配列の言及は、他に特定されない限り、その相補体を含む。従って、特定の配列を有する核酸分子の言及は、その相補性配列をもつその相補鎖を含むと理解されるべきである。

【0047】

分子生物学分野において、研究者は、「パーセント配列同一性」、「パーセント配列類似性」および「パーセント配列相同性」という用語を交換可能に用いる。本出願において、これらの用語は、ヌクレオチド配列のみに関して同じ意味をもつものとする。

【0048】

核酸またはその断片に言及する場合、「実質的類似性」または「実質的配列類似性」という用語は、適切なヌクレオチド挿入または欠失を含めてもう一つの核酸と最適に整列された時、上で考察されているように、FASTA、BLASTまたはGapのような任意の周知の配列同一性のアルゴリズムにより決定される場合、ヌクレオチド塩基の少なくとも約85%、好ましくは少なくとも約90%、およびより好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%においてヌクレオチド配列同一性がある。

【0049】

ポリペプチドに適用される場合、「実質的同一性」という用語は、デフォルトギャップ重みを用いるプログラムGAPまたはBESTFITによるように最適に整列された場合、2つのペプチド配列が、少なくとも75%または80%配列同一性、好ましくは少なくとも90%または95%配列同一性、よりいっそう好ましくは少なくとも98%または99%配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似した化学的性質(例えば、電荷または

疎水性)をもつ側鎖(R基)を有するもう一つのアミノ酸残基により置換されていることである。一般的に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的性質を実質的には変化させない。2つまたはそれ以上のアミノ酸配列が保存的置換によりお互いに異なる場合において、パーセント配列同一性または類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するように向上に調整されうる。この調整を行うための手段は当業者に周知である。例えば、参照により本明細書に組み入れられている、Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 24:307-31 (1994)を参照。類似した化学的性質をもつ側鎖を有するアミノ酸の群の例は、1)脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン；2)脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン；3)アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；4)芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；5)塩基性側鎖：リシン、アルギニンおよびヒスチジン；ならびに6)イオウ含有側鎖はシステインおよびメチオニンである、を含む。好ましい保存的アミノ酸置換群は以下である：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタメート-アスパルテート、およびアスパラギン-グルタミン。

10

【0050】

または、保存的置換は、参照により本明細書に組み入れられている、Gonnet et al., *Science*, 256:1443-45 (1992)に開示されているPAM250対数尤度行列において正值をもつ任意の変化である。「中程度に保存的な」置換は、PAM250対数尤度行列において非負値をもつ任意の変化である。

【0051】

ポリペプチドについての配列類似性は、典型的には、配列解析ソフトウェアを用いて決定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む、様々な置換、欠失および他の改変に割り当てられる類似性の尺度を用いて類似した配列をマッチさせる。例えば、GCGは、異なる種の生物体由来の相同性ポリペプチドのような密接に関連したポリペプチド間で、または野生型タンパク質とその突然変異タンパク質の間で、配列相同性または配列同一性を決定するためにデフォルトパラメーターで用いられうる「Gap」および「Bestfit」のようなプログラムを含む。例えば、Wisconsin package Version 10.3を参照。ポリペプチド配列はまた、デフォルトまたは推奨パラメーターを用いるFASTA、Wisconsin package Version 10.3におけるプログラム、を用いて比較されうる。FASTA(例えば、FASTA2およびFASTA3)は、質問配列と検索配列の間の最高の重複の領域のアラインメントおよびパーセント配列同一性を提供する(Pearson (1990); Pearson (2000))。本発明の配列を異なる生物体由来の多数の配列を含むデータベースと比較する場合のもう一つの好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメーターを用いる、コンピュータプログラムBLAST、特にblastpまたはtblastn、である。例えば、Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997); 参照により本明細書に組み入れられている、を参照。

20

30

【0052】

相同性について比較されるポリペプチド配列の長さは、一般的に、少なくとも約16アミノ酸残基、通常には少なくとも約20残基、より通常には少なくとも約24残基、典型的には少なくとも約28残基、および好ましくは約35より多い残基である。多数の異なる生物体由来の配列を含むデータベースを検索する場合、アミノ酸配列を比較することが好ましい。

40

【0053】

本明細書に用いられる場合、「標識」または「標識された」という用語とは、抗体におけるもう一つの分子の取り込みを指す。一つの態様において、標識は検出可能なマーカーである、例えば、放射標識されたアミノ酸の取り込み、またはマークされたアビジン(例えば、光学的または比色定量的方法により検出されうる蛍光マーカーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン)により検出されうるビオチニル部分のポリペプチドへの付着。もう一つの態様において、標識またはマーカーは、治療用物質、例えば、薬剤結合体または毒素、でありうる。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法は、当技術分野において公知であり、用いられうる。ポリペプチドについての標識の例は、限定される

50

わけではないが、以下を含む：放射性同位体または放射性核種(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^3S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体)、酵素標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学ルミネセンスマーカー、ビオチニル基、二次レポーターにより認識されるあらかじめ決められたポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体についての結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)、ガドリニウムキレートのような磁気物質、百日咳毒素のような毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイシン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または相同体。いくつかの態様において、標識は、可能性のある立体障害を低減させるように様々な長さのスペーサーアームにより付着される。

【0054】

「作用物質(agent)」という用語は、化学化合物、化学化合物の混合物、生物学的高分子、生物学的材料から作製された抽出物を表すのに本明細書で用いられる。本明細書に用いられる場合の「薬学的物質または薬物」という用語は、患者へ正しく投与された場合、所望の治療効果を誘導する能力がある化学的化合物または組成物を指す。本明細書での他の化学用語は、参照により本明細書に組み入れられている、The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))により例示されているように、当技術分野における慣例的用法に従って用いられる。

【0055】

「抗炎症性」または「免疫調節性」物質という用語は、ヒトを含む被験者における炎症性疾患を含む、炎症を抑制する機能的性質をもつ作用物質を指すのに本明細書で用いられる。本発明の様々な態様において、炎症性疾患は、限定されるわけではないが、クローン病、潰瘍性大腸炎、憩室疾患、胃炎、肝疾患、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎を含む胃腸管の炎症性疾患でありうる。炎症性疾患はまた、限定されるわけではないが、腹部疾患、急性横断性脊髄炎、アレルギー性皮膚炎(アレルギー性皮膚、アレルギー性湿疹、皮膚アトピー、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、皮膚炎症、炎症性湿疹、炎症性皮膚炎、ノミ皮膚(flea skin)、粟粒性皮膚炎、粟粒性湿疹、イエダニ皮膚を含む)、強直性脊椎炎(ライター症候群)、喘息、気道炎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、胆道閉鎖症、膀胱炎症、乳癌、心血管炎症(脈管炎、リウマチ性爪郭梗塞、下腿潰瘍、多発性筋炎、慢性血管炎症、心膜炎、慢性閉塞性肺疾患を含む)、慢性膵臓炎、神経周囲炎症、大腸炎(アメーバ性大腸炎、感染性大腸炎、細菌性大腸炎、クローン大腸炎、虚血性大腸炎、潰瘍性大腸炎、特発性直腸炎、炎症性腸疾患、偽膜性大腸炎を含む)、膠原血管病(関節リウマチ、SLE、全身性進行性硬化症、混合結合組織病、真性糖尿病)、クローン病(限局性腸炎、肉芽腫性回腸炎、回結腸炎、消化器系炎症)、脱髄疾患(脊髄炎、多発性硬化症、散在性硬化症、急性散在性脳脊髄炎、静脈周囲脱髄、ビタミンB12欠乏症、ギラン・バレー症候群、MS関連レトロウイルス)、皮膚筋炎、憩室炎、滲出性下痢、胃炎、肉芽腫性肝炎、肉芽腫性炎症、胆嚢炎、インスリン依存性真性糖尿病、肝臓炎症性疾患(肝臓線維症、原発性胆汁性肝硬変、肝炎、硬化性胆管炎)、肺炎症(特発性肺線維症、肺好酸球性肉芽腫、肺組織球増殖症X、細気管支周囲炎症、急性気管支炎)、鼠径リンパ肉芽腫、悪性黒色腫、口腔/歯疾患(歯肉炎、歯周病を含む)、粘膜炎、筋骨格系炎症(筋炎)、非アルコール性脂肪性肝炎(非アルコール性脂肪肝疾患)、眼および眼窩炎症(ブドウ膜炎、視神経炎、周辺リウマチ性潰瘍、周辺角膜炎症を含む)、変形性関節症、骨髄炎、咽頭炎症、多発性関節炎、直腸炎、乾癬、放射線傷害、サルコイドーシス、鎌状赤血球壊死症、表在性静脈炎、全身性炎症反応症候群、甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、急性火傷、ベーチェット症候群、シェーグレン症候群も含む。

【0056】

患者および被験者という用語は、ヒトおよび獣医学的対象を含む。

【0057】

ヒト抗MadCAM抗体およびその特徴付け

一つの態様において、本発明は、ヒトCDR配列を含む抗MadCAM抗体を提供する。好ましい態様において、本発明は、ヒト抗MadCAM抗体を提供する。いくつかの態様において、ヒト抗MadCAM抗体は、トランスジェニック動物がヒト抗体を産生するようにゲノムがヒト免疫グロブリン遺伝子を含む、非ヒトのトランスジェニック動物、例えば、齧歯類、を免疫することにより、産生される。いくつかの態様において、本発明は、補体と結合しない抗MadCAM抗体を提供する。

【0058】

好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modである。もう一つの好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、54、58、62、66もしくは68(シグナル配列を持つまたは持たない)から選択されるアミノ酸配列、またはそのアミノ酸配列のいずれか一つの可変領域、またはこれらのアミノ酸配列由来の1つもしくは複数のCDRを含む軽鎖を含む。もう一つの好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、SEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、52、56、60もしくは64(シグナル配列を持つまたは持たない)から選択されるアミノ酸配列、または可変領域の、もしくはそれらのアミノ酸配列由来の1つもしくは複数のCDRの、アミノ酸配列を含む重鎖を含む。本発明にまた、上記の配列のいずれか一つのCDR1の始まりからCDR3の終わりまでのアミノ酸配列を含むヒト抗MadCAM抗体も含まれる。本発明はさらに、上記の配列のいずれかの1つまたは複数のFR領域を含む抗MadCAM抗体を提供する。

【0059】

本発明はさらに、1つまたは複数の改変がなされている前記のアミノ酸配列の1つを含む抗MadCAM抗体を提供する。いくつかの態様において、抗体におけるシステインは、化学反応性でありうるが、非限定的にアラニンまたはセリンのような、もう一つの残基と置換される。一つの態様において、置換は、非標準システインにおいてである。置換は、可変ドメインのCDRもしくはフレームワーク領域において、または抗体の定常ドメインにおいて、なされうる。いくつかの態様において、そのシステインは標準である。

【0060】

いくつかの態様において、アミノ酸置換は、抗体において可能性のあるタンパク分解性部位を除去するようになされる。そのような部位は、可変ドメインのCDRもしくはフレームワーク領域に、または抗体の定常ドメインに存在しうる。システイン残基の置換およびタンパク分解性部位の除去は、抗体産物において不均一性を減少させる。いくつかの態様において、アスパラギン-グリシン対は、可能性のある脱アミド部位を形成するのだが、その残基の1つまたは両方を変化させることにより排除される。いくつかの態様において、アミノ酸置換は、本発明の抗体の可変領域において可能性のあるグリコシル化部位を付加または除去するようになされる。

【0061】

いくつかの態様において、本発明の抗MadCAM抗体の重鎖のC末端リシンは、切断される。本発明の様々な態様において、抗MadCAM抗体の重鎖および軽鎖は、任意で、シグナル配列を含みうる。

【0062】

一つの局面において、本発明は、12個の阻害性ヒト抗MadCAMモノクローナル抗体、およびそれらを産生するハイブリドーマ細胞系を提供する。表1は、完全長重鎖および軽鎖(シグナル配列を含む)をコードする核酸の配列識別名(SEQ ID NO:)ならびに対応する完全長推定アミノ酸配列を列挙する。

【0063】

【表 1】

モノクローナル 抗体	ヒト抗MAdCAM抗体			
	配列識別名 (SEQ ID NO:)			
	完全長			
	重鎖		軽鎖	
	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質
1.7.2	1	2	3	4
1.8.2	5	6	7	8
6.14.2	9	10	11	12
6.22.2	13	14	15	16
6.34.2	17	18	19	20
6.67.1	21	22	23	24
6.73.2	25	26	27	28
6.77.1	29	30	31	32
7.16.6	33	34	35	36
7.20.5	37	38	39	40
7.26.4	41	42	43	44
9.8.2	45	46	47	48

10

20

【0064】

もう一つの局面において、本発明は、上で識別されたヒト抗MAdCAMモノクローナル抗体のある特定の改変バージョンを提供する。表2は、改変された抗体のDNAおよびタンパク質配列についての配列識別名を列挙する。

【0065】

30

【表 2】

改変 モノクローナル 抗体	ヒト抗MAdCAM抗体			
	配列識別名 (SEQ ID NO:)			
	完全長			
	重鎖		軽鎖	
	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質
6.22.2-mod	51	52	53	54
6.34.2-mod	55	56	57	58
6.67.1-mod	59	60	61	62
6.77.1-mod	63	64	65	66
7.26.4-mod	41	42	67	68

40

【0066】

抗MAdCAM抗体のクラスおよびサブクラス

抗体は、IgG、IgM、IgE、IgAまたはIgD分子でありうる。好ましい態様において、抗体は、IgGクラスであり、IgG₁、IgG₂、IgG₃、またはIgG₄サブクラスである。より好ましい

50

態様において、抗MadCAM抗体は、サブクラスIgG₂またはIgG₄である。もう一つの好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、IgG₂である抗体1.7.2、1.8.2、7.16.6、7.20.5、7.26.4、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modもしくは7.26.4-mod、またはIgG₄である6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1もしくは9.8.2と同じクラスおよびサブクラスである。

【0067】

抗MadCAM抗体のクラスおよびサブクラスは、当技術分野において公知の任意の方法により決定されうる。一般的に、抗体のクラスおよびサブクラスは、抗体のクラスおよびサブクラスに特異的である抗体を用いて決定されうる。そのような抗体は、市販されている。ELISA、ウェスタンブロットおよび他の技術は、クラスおよびサブクラスを決定することができる。または、クラスおよびサブクラスは、抗体の重鎖および/もしくは軽鎖の定常ドメインの全部または一部をシーケンシングし、それらのアミノ酸配列を免疫グロブリンの様々なクラスおよびサブクラスの既知のアミノ酸配列と比較し、そして、抗体のクラスおよびサブクラスを最高配列同一性を示すクラスとして決定することにより、決定されうる。

10

【0068】

種および分子選択性

本発明のもう一つの局面において、抗MadCAM抗体は、種および分子選択性の両方を実証する。一つの態様において、抗MadCAM抗体は、ヒト、カンクイザルまたはイヌのMadCAMに結合する。いくつかの態様において、抗MadCAM抗体は、マーモセットのような新世界サル種に結合しない。明細書の教示に従って、当技術分野において周知の方法を用いて抗MadCAM抗体についての種選択性を決定しうる。例えば、ウェスタンブロット、FACS、ELISAまたは免疫組織化学を用いて種選択性を決定しうる。好ましい態様において、免疫組織化学を用いて種選択性を決定しうる。

20

【0069】

いくつかの態様において、MadCAMと特異的に結合する抗MadCAM抗体は、少なくとも10倍、好ましくは少なくとも20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍または90倍、最も好ましくは少なくとも100倍である、VCAM、フィブロネクチンまたは任意の他の抗原と比較してのMadCAMに対する選択性をもつ。好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、VCAM、フィブロネクチンまたはMadCAM以外の任意の他の抗原へのいずれの感知できる結合も示さない。本明細書の教示に従って、当技術分野における周知の方法を用いて抗MadCAM抗体のMadCAMに対する選択性を決定しうる。例えば、ウェスタンブロット、FACS、ELISAまたは免疫組織化学を用いて選択性を決定しうる。

30

【0070】

抗MadCAM抗体のMadCAMへの結合親和性

本発明のもう一つの局面において、抗MadCAM抗体は、高親和性でMadCAMへ特異的に結合する。一つの態様において、抗MadCAM抗体は、BIAcoreのような表面プラズモン共鳴により測定される場合、 3×10^{-8} Mまたはそれ以下の K_d で、MadCAMへ特異的に結合する。より好ましい態様において、抗体は、 1×10^{-8} Mまたはそれ以下または 1×10^{-9} Mまたはそれ以下の K_d でMadCAMへ特異的に結合する。よりいっそう好ましい態様において、抗体は、 1×10^{-10} Mまたはそれ以下の K_d でMadCAMへ特異的に結合する。他の好ましい態様において、本発明の抗体は、 2.66×10^{-10} Mまたはそれ以下、 2.35×10^{-11} Mまたはそれ以下、または 9×10^{-12} Mまたはそれ以下の K_d でMadCAMへ特異的に結合する。もう一つの好ましい態様において、抗体は、 1×10^{-11} Mまたはそれ以下の K_d でMadCAMへ特異的に結合する。もう一つの好ましい態様において、抗体は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modから選択される抗体と実質的に同じ K_d でMadCAMへ特異的に結合する。参照抗体と「実質的に同じ K_d 」をもつ抗体は、同じ実験における参照抗体の K_d と比較して、 ± 100 pM、好ましくは ± 50 pM、より好ましくは ± 20 pM、なおより好ましくは ± 10 pM、 ± 5 pMまたは ± 2 pMである K_d をもつ。もう一つの好ましい態様において、抗体は、1.7

40

50

.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modから選択される抗体由来の1つもしくは複数の可変ドメインまたは1つもしくは複数のCDRを含む抗体と実質的に同じ K_d でMadCAMへ結合する。なおもう一つの好ましい態様において、抗体は、SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、52、54、56、58、62、64、66もしくは68(シグナル配列を持つまたは持たない)から選択されるアミノ酸配列の1つまたはその可変ドメインを含む抗体と実質的に同じ K_d でMadCAMに結合する。もう一つの好ましい態様において、抗体は、SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、52、54、56、58、62、64、66もしくは68から選択されるアミノ酸配列を含む抗体由来の1つまたは複数のCDRを含む抗体と実質的に同じ K_d でMadCAMに結合する。 10

【0071】

抗MadCAM抗体のMadCAMへの結合親和性は、当技術分野において公知の任意の方法により測定されうる。一つの態様において、結合親和性は、競合的ELISA、RIAまたはBIAcoreのような表面プラズモン共鳴により測定されうる。より好ましい態様において、結合親和性は、表面プラズモン共鳴により測定される。よりいっそう好ましい態様において、結合親和性および解離速度は、BIAcoreを用いて測定される。結合親和性を測定することの例は、下の実施例IIに記載されている。

【0072】

抗MadCAM抗体の半減期 20

本発明のもう一つの目的により、抗MadCAM抗体は、インビトロまたはインビボで少なくとも1日の半減期をもつ。好ましい態様において、抗体またはその部分は、少なくとも3日の半減期をもつ。より好ましい態様において、抗体またはその部分は、4日またはそれ以上の半減期をもつ。もう一つの態様において、抗体またはその部分は、8日またはそれ以上の半減期をもつ。もう一つの態様において、抗体またはその抗原結合部分は、下で考察されているように、それがより長い半減期をもつように誘導体化または改変される。もう一つの好ましい態様において、抗体は、2000年2月24日に公開されたWO 00/09560に記載されているように、血清半減期を増加させる点突然変異を含みうる。

【0073】

抗体半減期は、当業者に公知の任意の手段により測定されうる。例えば、抗体半減期は、適切な時間に渡って、ウェスタンブロット、ELISAまたはRIAにより測定されうる。抗体半減期は、霊長類、例えば、カニクイザルまたはヒト、のような任意の適切な動物において測定されうる。 30

【0074】

抗MadCAM抗体により認識されるMadCAMエピトープの同定

本発明はまた、本明細書に提供されたヒト抗MadCAM抗体と同じ抗原またはエピトープと結合するヒト抗MadCAM抗体を提供する。さらに、本発明は、ヒト抗MadCAM抗体と競合するまたは交差競合するヒト抗MadCAM抗体を提供する。好ましい態様において、ヒト抗MadCAM抗体は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modである。もう一つの好ましい態様において、ヒト抗MadCAM抗体は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modから選択される抗体由来の1つもしくは複数の可変ドメインまたは1つもしくは複数のCDRを含む。なおもう一つの好ましい態様において、ヒト抗MadCAM抗体は、SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、52、54、56、58、62、64、66もしくは68(シグナル配列を持つまたは持たない)から選択されるアミノ酸配列の1つまたはその可変ドメインを含む。もう一つの好ましい態様において、ヒト抗MadCAM抗体は、SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、52、54、56、58、62、64、66もしくは68から選択される 40 50

アミノ酸配列の1つを含む抗体由来の1つまたは複数のCDRを含む。大いに好ましい態様において、抗MAdCAM抗体は、もう一つのヒト抗体である。

【0075】

抗MAdCAM抗体が、もう一つの抗MAdCAM抗体と同じ抗原に結合するかどうかを当技術分野において公知の様々な方法を用いて測定しうる。例えば、その抗原を捕獲しうる既知の抗MAdCAM抗体を用い、抗MAdCAM抗体から抗原を溶離し、その後、試験抗体が溶離された抗原に結合するかどうかを決定しうる。抗体が抗MAdCAM抗体と競合するかどうかを、飽和しつつある条件下で抗MAdCAM抗体をMAdCAMへ結合させ、その後、MAdCAMに結合しうる試験抗体の能力を測定することにより決定しうる。試験抗体が、抗MAdCAM抗体と同時にMAdCAMに結合することができる場合には、試験抗体は、抗MAdCAM抗体とは異なるエпитープに結合する。しかしながら、試験抗体が同時にMAdCAMに結合できない場合には、試験抗体は、ヒト抗MAdCAM抗体と競合する。この実験は、ELISAまたは表面プラズモン共鳴または、好ましくは、BIAcoreを用いて行われうる。抗MAdCAM抗体がもう一つの抗MAdCAM抗体と交差競合するかどうかを試験するために、両方向において、すなわち、既知の抗体が試験抗体をブロックするかどうか、および逆もまた同様に測定すること、上記の競合方法を用いうる。

【0076】

軽鎖および重鎖遺伝子利用

本発明はまた、ヒトκ遺伝子によりコードされる軽鎖可変領域を含む抗MAdCAM抗体を提供する。好ましい態様において、軽鎖可変領域は、ヒトVκ A2、A3、A26、B3、O12またはO18遺伝子ファミリーによりコードされる。様々な態様において、軽鎖は、生殖系列ヒトVκ A2、A3、A26、B3、O12またはO18配列から、わずか11個、わずか6個、またはわずか3個のアミノ酸置換を含む。好ましい態様において、アミノ酸置換は、保存的置換である。

【0077】

SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44および48は、12個の抗MAdCAM抗体、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、および9.8.2、の完全長κ軽鎖のアミノ酸配列を提供する。図1K~1Tは、12個の抗MAdCAM抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列の、それらが由来する生殖系列配列とのアラインメントである。図2Aは、12個の抗MAdCAM抗体のκ軽鎖の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列のお互いとのアラインメントを示す。本明細書の教示に従って、当業者は、生殖系列配列と追加の抗MAdCAM抗体の抗体配列の間の違いを決定することができる。SEQ ID NO:54、58、62、66または68は、親の抗MAdCAM抗体、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.77.1、または7.26.4から、それぞれ、アミノ酸置換により改変された、5つの追加の抗MAdCAM抗体、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod、の完全長κ軽鎖のアミノ酸配列を提供する。

【0078】

好ましい態様において、抗MAdCAM抗体のVLは、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modもしくは7.26.4-modのVLのいずれか1つまたは複数と同じ、生殖系列アミノ酸配列に対する突然変異を含む。本発明は、例示された抗体と同じヒトVκおよびヒトヒトJk遺伝子を利用する抗MAdCAM抗体を含む。いくつかの態様において、抗体は、1つまたは複数の例示された抗体と同じ、生殖系列からの突然変異の1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、抗体は、例示された抗体の1つまたは複数と同じ位置の1つまたは複数において異なる置換を含む。例えば、抗MAdCAM抗体のVLは、抗体7.16.6に存在するものと同じである1つまたは複数のアミノ酸置換、および抗体7.26.4と同じであるもう一つのアミノ酸置換を含みうる。この様式において、例えば、MAdCAMに対する抗体の親和性、または抗原からのその解離速度を変化させるために抗体結合の異なる特徴を混合かつ組み合わせることができる。もう一つの態様において、突然変異は、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modもしくは7.26.4-modのVLのいずれか1つまたは複数に見出されるものと同じ位置においてなされるが、同じアミノ酸

を用いることよりむしろ、保存的アミノ酸置換がなされる。例えば、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの1つにおける生殖系列と比較してのアミノ酸置換がグルタメートである場合には、アスパルテートに保存的に置換しうる。同様に、アミノ酸置換がセリンである場合には、トレオニンに保存的に置換しうる。

【0079】

もう一つの好ましい態様において、軽鎖は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modのVLのアミノ酸配列と同じであるアミノ酸配列を含む。もう一つの好ましい態様において、軽鎖は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの軽鎖のCDR領域と同じであるアミノ酸配列を含む。もう一つの好ましい態様において、軽鎖は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの軽鎖の少なくとも1つのCDR領域を有するアミノ酸配列を含む。もう一つの好ましい態様において、軽鎖は、同じV κ およびJ κ 遺伝子を用いる異なる軽鎖由来のCDRを有するアミノ酸配列を含む。より好ましい態様において、異なる軽鎖由来のCDRは、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modから得られる。もう一つの好ましい態様において、軽鎖は、シグナル配列を持つまたは持たないSEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、54、58、62、64、66または68から選択されるアミノ酸配列を含む。もう一つの態様において、軽鎖は、SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、53、57、61、65もしくは67(シグナル配列を持つまたは持たない)から選択されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、またはそれからの1~11個のアミノ酸挿入、欠失もしくは置換をもつアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。好ましくは、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。もう一つの態様において、抗体またはその部分は、 λ 軽鎖を含む。

【0080】

本発明はまた、ヒトVH遺伝子配列またはヒトVH遺伝子由来の配列を含む抗MAdCAM抗体またはその部分を提供する。一つの態様において、重鎖アミノ酸配列は、ヒトVH 1-18、3-15、3-21、3-23、3-30、3-33または4-4遺伝子ファミリー由来である。様々な態様において、重鎖は、生殖系列ヒトVH 1-18、3-15、3-21、3-23、3-30、3-33または4-4遺伝子配列からわずか15個、わずか6個またはわずか3個のアミノ酸変化を含む。

【0081】

SEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42および46は、12個の抗MAdCAM抗体の完全長重鎖のアミノ酸配列を提供する。図1A~1Jは、12個の抗MAdCAM抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列の、それらが由来する生殖系列配列とのアラインメントである。図2Bは、12個の抗MAdCAM抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列のお互いとのアラインメントを示す。本明細書および本発明のヌクレオチド配列の教示に従って、当業者は、12個の抗MAdCAM重鎖および生殖系列重鎖のコードされたアミノ酸配列を決定し、そして生殖系列配列とその抗体配列の間の違いを決定することができる。SEQ ID NO:52、56、60および64は、親の抗MAdCAM抗体、6.22.2、6.34.2および6.67.1から、それぞれ、アミノ酸置換により改変された、抗MAdCAM抗体、6.22.2-mod、6.34.2-modおよび6.67.1-mod、の完全長重鎖のアミノ酸配列を提供する。1つのさらなる改変された抗MAdCAM抗体、7.26.4-mod、はSEQ ID NO:42である完全長重鎖アミノ酸配列を有する。

【0082】

好ましい態様において、抗MAdCAM抗体のVHは、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-

mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modのVHのいずれか1つまたは複数と同じ、生殖系列アミノ酸配列に対する突然変異を含む。上で考察されたものと同様に、抗体は、1つまたは複数の例示された抗体と同じ生殖系列からの突然変異の1つまたは複数を含む。いくつかの態様において、抗体は、例示された抗体の1つもしくは複数と同じ位置の1つまたは複数において異なる置換を含む。例えば、抗MadCAM抗体のVHは、抗体7.16.6に存在するものと同じである1つまたは複数のアミノ酸置換、および抗体7.26.4と同じであるもう一つのアミノ酸置換を含みうる。この様式において、例えば、MadCAMに対する抗体の親和性、または抗原からのその解離速度を変化させるために抗体結合の異なる特徴を混合かつ組み合わせることができる。もう一つの態様において、生殖系列と比較してのアミノ酸置換は、参照抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modもしくは7.26.4-modのVHのいずれか1つまたは複数に見出される生殖系列からの置換と同じ位置においてなされるが、位置は、参照抗体と比較して保存的置換である、異なる残基で置換される。

【0083】

もう一つの好ましい態様において、重鎖は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modのVHのアミノ酸配列と同じであるアミノ酸配列を含む。もう一つの好ましい態様において、重鎖は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの重鎖のCDR領域と同じであるアミノ酸配列を含む。もう一つの好ましい態様において、重鎖は、異なる重鎖由来のCDRを有するアミノ酸配列を含む。より好ましい態様において、異なる重鎖由来のCDRは、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modから得られる。もう一つの好ましい態様において、重鎖は、シグナル配列を持つまたは持たないSEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、52、56、60または64から選択されるアミノ酸配列を含む。もう一つの態様において、重鎖は、SEQ ID NO:1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、51、55、59もしくは63から選択されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、またはそれからの1~15個のアミノ酸挿入、欠失もしくは置換をもつアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。もう一つの態様において、置換は、保存的アミノ酸置換である。

【0084】

抗体および抗体産生細胞系を作製する方法

免疫化

本発明の一つの態様において、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖の一部または全部を含む非ヒトの動物をMadCAM抗原で免疫することにより産生される。好ましい態様において、非ヒトの動物は、XENOMOUSE(商標)動物であり、ヒト免疫グロブリン座の大きな断片を含み、かつマウス抗体産生が欠損している、操作されたマウス系統である。例えば、Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994)ならびに米国特許第5,916,771号、第5,939,598号、第5,985,615号、第5,998,209号、第6,075,181号、第6,091,001号、第6,114,598号および第6,130,364号を参照されたい。WO 91/10741、WO 94/02602、WO 96/34096およびWO 96/33735、WO 98/16654、WO 98/24893、WO 98/50433、WO 99/45031、WO 99/53049、WO 00/09560およびWO 00/037504も参照されたい。XENOMOUSE(商標)動物は、完全なヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異性ヒトモノクローナル抗体を作製する。第二世代XENOMOUSE(商標)動物は、ヒト重鎖座およびκ軽鎖座のメガベースサイズの生殖系列立体構造YAC断片の導入を通して、ヒト抗体V遺伝子レパートリーの約80%

を含む。他の態様において、XENOMOUSE(商標)マウスは、ヒト重鎖およびλ軽鎖座の約全部を含む。Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)を参照されたい、それらの開示は参照により本明細書に組み入れられている。

【0085】

本発明はまた、ヒト免疫グロブリン座を含む非ヒトのトランスジェニック動物を免疫することにより非ヒト、非マウスの動物から抗MadCAM抗体を作製するための方法を提供する。すぐ上に記載された方法を用いてそのような動物を作製しうる。これらの文書に開示された方法は、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,994,619号(「'619」特許)に開示されているように改変されうる。'619特許は、ブタおよびウシ由来の新規な培養内細胞塊(CICM)細胞および細胞系、ならびに異種性DNAが挿入されているトランスジェニックCICM細胞を作製するための方法を記載する。CICMトランスジェニック細胞は、クローニングされたトランスジェニック胚、胎児および子孫を産生するために用いられる。'619特許はまた、異種性DNAをそれらの子孫へ伝える能力があるトランスジェニック動物を作製する方法も記載する。好ましい態様において、非ヒト動物は、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマでありうる。

【0086】

もう一つの態様において、ヒト免疫グロブリン座を含む非ヒトの動物は、ヒト免疫グロブリンの「ミニ座」を有する動物である。ミニ座アプローチにおいて、外因性Ig座は、Ig座由来の個々の遺伝子の包含を通して模倣される。従って、1つまたは複数のVH遺伝子、1つまたは複数のDH遺伝子、1つまたは複数のJH遺伝子、μ定常ドメイン、および第二の定常ドメイン(好ましくはγ定常ドメイン)が、動物への挿入のための構築物へと形成される。このアプローチは、とりわけ、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,661,016号、第5,770,429号、第5,789,650号、第5,814,318号、第5,591,669号、第5,612,205号、第5,721,367号、第5,789,215号および第5,643,763号に記載されている。

【0087】

ミニ座アプローチの利点は、Ig座の部分を含む構築物が作製され、かつ動物へ導入されうる迅速性である。しかしながら、ミニ座アプローチの可能性のある欠点は、より低い抗体産生でありうるような、完全なB細胞発生を支持するのに十分な免疫グロブリン多様性ではない可能性があることである。

【0088】

ヒト抗MadCAM抗体を産生するために、ヒト免疫グロブリン座の一部または全部を含む非ヒトの動物が、MadCAM抗原で免疫され、抗体または抗体産生細胞が、動物から単離される。MadCAM抗原は単離および/または精製されたMadCAMでありうり、好ましくは、ヒトMadCAMである。もう一つの態様において、MadCAM抗原は、MadCAMの断片、好ましくはMadCAMの細胞外ドメインである。もう一つの態様において、MadCAM抗原は、MadCAMの少なくとも1つのエピトープを含む断片である。もう一つの態様において、MadCAM抗原は、細胞表面上にMadCAMを発現させる細胞、好ましくは細胞表面上にMadCAMを過剰発現させる細胞、である。

【0089】

動物の免疫化は、当技術分野において公知の任意の方法により行われうる。例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press (1990)を参照。マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシおよびウマのような非ヒトの動物を免疫するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、Harlow and Laneおよび米国特許第5,994,619号を参照。好ましい態様において、MadCAM抗原は、免疫応答を刺激しうるアジュバントと共に投与される。そのようなアジュバントは、完全もしくは不完全フロイントアジュバント、RIBI(ムラミールジペプチド)またはISCOM(免疫賦活性複合体)を含む。そのようなアジュバントは、ポリペプチドを、局所的沈着物に隔離することにより急速な分散から保護しうる、またはそれらは、免疫系のマクロファージお

10

20

30

40

50

よび他の構成要素に対して走化性である因子を分泌するように宿主を刺激する物質を含む。好ましくは、ポリペプチドが投与されることになっている場合には、免疫化計画は、数週間に渡って伝搬されるポリペプチドの2回以上の投与を含む。

【0090】

実施例Iは、XENOMOUSE(商標)動物をリン酸緩衝食塩水における完全長ヒトMAdCAMで免疫することについてのプロトコルを提供する。

【0091】

抗体および抗体産生細胞系の作製

動物のMAdCAM抗原での免疫化後、抗体および/または抗体産生細胞は、動物から得られる。抗MAdCAM抗体含有血清は、その動物を採血するまたは屠殺することにより、動物から得られる。血清は、それが動物から得られたままで用いられうる、免疫グロブリン画分が血清から得られうる、または抗MAdCAM抗体が血清から精製されうる。

【0092】

もう一つの態様において、抗体産生不死化細胞系は、免疫化動物から調製されうる。免疫化後、動物は屠殺され、B細胞は、当技術分野において周知の方法を用いて不死化される。細胞を不死化する方法は、限定されるわけではないが、それらに発癌遺伝子をトランスフェクションすること、それらに発癌性ウイルスを感染させ、不死化細胞について選択する条件下でそれらを培養すること、それらを発癌性または突然変異させる化合物に曝露させること、不死化細胞、例えば、骨髄腫細胞、とそれらを融合すること、および腫瘍抑制遺伝子を不活性化することを含む。例えば、Harlow and Lane、前記を参照。骨髄腫細胞を含む態様において、骨髄腫細胞は、免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない(非分泌細胞系)。免疫化および抗生物質選択後、不死化細胞またはその培養上清は、MAdCAM、その一部、またはMAdCAMを発現させる細胞を用いてスクリーニングされる。好ましい態様において、最初のスクリーニングは、酵素結合免疫測定法(ELISA)または放射性免疫測定法(RIA)、好ましくはELISA、を用いて行われる。ELISAスクリーニングの例は、参照により本明細書に組み入れられている、PCT公開第WO 00/37504号に提供されている。

【0093】

もう一つの態様において、抗体産生細胞は、自己免疫疾患をもつ、および抗MAdCAM抗体を発現させるヒトから調製されうる。抗MAdCAM抗体を発現させる細胞は、白血球を単離し、それらを蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)にかけることにより、またはMAdCAMもしくはその一部でコーティングされたプレート上でパンニングすることにより、単離されうる。これらの細胞は、ヒト抗MAdCAM抗体を発現させるヒトハイブリドーマを作製するようにヒト非分泌性骨髄腫と融合されうる。一般的に、抗MAdCAM抗体はMAdCAMに対して低い親和性をもつ可能性が高いため、これはあまり好ましい態様ではない。

【0094】

抗MAdCAM抗体産生細胞、例えば、ハイブリドーマが選択され、クローニングされ、さらに、頑強な細胞増殖、高い抗体産生、および下でさらに考察されているような望ましい抗体特性を含む望ましい特性についてスクリーニングされる。ハイブリドーマは、インビボで同系動物において、免疫系を欠く動物、例えばヌードマウス、において、またはインビトロで細胞培養において、培養および増殖されうる。ハイブリドーマを選択、クローニング、および増殖する方法は、当業者に周知である。

【0095】

好ましくは、免疫化動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させる非ヒトの動物であり、脾臓のB細胞が、その非ヒトの動物と同じ種由来の骨髄腫に融合される。より好ましくは、免疫化動物は、XENOMOUSE(商標)動物であり、骨髄腫細胞系は、非分泌性マウス骨髄腫であり、例えば、骨髄腫細胞系は、P3-X63-AG8-653(ATCC)である。例えば、実施例Iを参照。

【0096】

従って、一つの態様において、本発明は、(a)本明細書に記載された非ヒトのトランスジェニック動物を、MAdCAM、MAdCAMの一部、またはMAdCAMを発現させる細胞もしくは組織

10

20

30

40

50

で免疫する段階；(b)トランスジェニック動物をMAdCAMに対する免疫応答を開始するようにさせる段階；(c)トランスジェニック動物から抗体産生細胞を単離する段階；(d)抗体産生細胞を不死化する段階；(e)不死化抗体産生細胞の個々のモノクローナル集団を作製する段階；および(f)MAdCAMへ方向づけられた抗体を同定するように、不死化抗体産生細胞またはその培養上清をスクリーニングする段階を含む、MAdCAMへ方向づけられたヒトモノクローナル抗体またはその断片を産生する細胞系を作製するための方法を提供する。

【0097】

一つの局面において、本発明は、ヒト抗MAdCAM抗体を産生するハイブリドーマを作製する。好ましい態様において、ハイブリドーマは、上記のようなマウスハイブリドーマである。もう一つの態様において、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマのような非ヒト、非マウスの種において産生される。もう一つの態様において、ハイブリドーマは、ヒトの非分泌性骨髓腫が抗MAdCAM抗体を発現させるヒト細胞と融合されているヒトハイブリドーマである。

10

【0098】

抗体を作製する核酸、ベクター、宿主細胞および組換え方法
核酸

本発明の抗MAdCAM抗体をコードする核酸分子が提供される。一つの態様において、核酸分子は、抗MAdCAM免疫グロブリンの重鎖および/または軽鎖をコードする。好ましい態様において、単一の核酸分子は、抗MAdCAM免疫グロブリンの重鎖をコードし、もう一つの核酸分子は、抗MAdCAM免疫グロブリンの軽鎖をコードする。より好ましい態様において、コードされた免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリン、好ましくはヒトIgGである。コードされた軽鎖は、λ鎖またはκ鎖、好ましくはκ鎖、でありうる。

20

【0099】

好ましい態様において、軽鎖の可変領域をコードする核酸分子は、ヒトVκの生殖系列配列、A2、A3、A26、B3、012もしくは018遺伝子またはその配列の変異体、を含む。好ましい態様において、軽鎖をコードする核酸分子は、ヒトJκ1、Jκ2、Jκ3、Jκ4またはJκ5遺伝子由来の配列を含む。好ましい態様において、軽鎖をコードする核酸分子は、生殖系列A2、A3、A26、B3、012または018 Vκ 遺伝子からわずか11個のアミノ酸変化、好ましくはわずか6個のアミノ酸変化、およびよりいっそう好ましくはわずか3個のアミノ酸変化、をコードする。より好ましい態様において、軽鎖をコードする核酸は、生殖系列配列である。

30

【0100】

本発明は、生殖系列配列と比較して11個までのアミノ酸変化を含む軽鎖(VL)の可変領域をコードする核酸分子であって、アミノ酸変化が、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの1つのVLからの、生殖系列配列からのアミノ酸変化と同一である、核酸分子を提供する。本発明はまた、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの軽鎖の可変領域のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。本発明はまた、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modもしくは7.26.4-modの軽鎖のいずれか一つのCDRの1つまたは複数のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。好ましい態様において、核酸分子は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの軽鎖のいずれか一つのCDRの全部のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。もう一つの態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、54、58、62、66、68の1つのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、またはSEQ ID NO:3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、53、57、61、65、もしくは67の1つのヌク

40

50

レオチド配列を含む。もう一つの好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、54、58、62、66、68のいずれか一つのCDRの1つもしくは複数のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、またはSEQ ID NO:3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、53、57、61、65、もしくは67のいずれか一つのCDRの1つもしくは複数のヌクレオチド配列を含む。より好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、54、58、62、66、68のいずれか一つのCDRの全部のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、またはSEQ ID NO:3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、53、57、61、65、もしくは67のいずれか一つの全部のCDRのヌクレオチド配列を含む。

【0101】

10

本発明はまた、上記のVLと、特にSEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、54、58、62、66、または68の1つのアミノ酸配列を含むVLと、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である、アミノ酸配列を有するVLのアミノ酸配列をコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、53、57、61、65、または67の1つのヌクレオチド配列と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるヌクレオチド配列を提供する。

【0102】

もう一つの態様において、本発明は、上記のVLをコードする核酸分子、特に、SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、54、58、62、66、または68のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、へ高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、53、57、61、65、または67の1つのヌクレオチド配列を含む核酸分子へ高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子を提供する。

20

【0103】

本発明はまた、ヒトVH 1-18、3-15、3-21、3-23、3-30、3-33または4-4 VH遺伝子を利用する重鎖可変領域(VH)をコードする核酸分子を提供する。いくつかの態様において、VH遺伝子をコードする核酸分子はさらに、ヒトJH4またはJH6ファミリー遺伝子を利用する。いくつかの態様において、VH遺伝子をコードする核酸分子は、ヒトJH4bまたはJH6b遺伝子を利用する。もう一つの態様において、核酸分子は、ヒトD 3-10、4-23、5-5、6-6または6-19遺伝子由来の配列を含む。よりいっそう好ましい態様において、VHをコードする核酸分子は、生殖系列VH 1-18、3-15、3-21、3-23、3-30、3-33または4-4遺伝子からのわずかに15個のアミノ酸変化、好ましくはわずか6個のアミノ酸変化、およびよりいっそう好ましくはわずか3個のアミノ酸変化、を含む。大いに好ましい態様において、VHをコードする核酸分子は、生殖系列配列と比較して少なくとも1個のアミノ酸変化であって、アミノ酸変化が、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの1つの重鎖からの、生殖系列配列からのアミノ酸変化と同一である、アミノ酸変化を含む。よりいっそう好ましい態様において、VHは、生殖系列配列と比較してわずかに15個のアミノ酸変化であって、変化が抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの1つのVHからの、生殖系列配列からのそれらの変化と同一である、アミノ酸変化を含む。

30

40

【0104】

一つの態様において、核酸分子は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modのVHのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。もう一つの態様において、核酸分子は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modもしくは7.26.4-modの重鎖のCDRの1つまたは複数のアミノ酸配列を

50

コードするヌクレオチド配列を含む。好ましい態様において、核酸分子は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modの重鎖のCDRの全部のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。もう一つの好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、52、56、60もしくは64の1つのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、またはSEQ ID NO:1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、51、55、59もしくは63の1つのヌクレオチド配列を含む。もう一つの好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、52、56、60もしくは64のいずれか一つのCDRの1つもしくは複数のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、またはSEQ ID NO:1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、51、55、59もしくは63のいずれか一つのCDRの1つもしくは複数のヌクレオチド配列を含む。好ましい態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、52、56、60もしくは64のいずれか一つのCDRの全部のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、またはSEQ ID NO:1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、51、55、59もしくは63のいずれか一つのCDRの全部のヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、核酸分子は、上記の抗MadCAM抗体のいずれかの重鎖または軽鎖のCDR1の始めからCDR3の終わりまでの連続した領域をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0105】

もう一つの態様において、核酸分子は、すぐ上に記載されたVHをコードするアミノ酸配列の1つと、特にSEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、52、56、60または64の1つのアミノ酸配列を含むVHと、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である、VHのアミノ酸配列をコードする。本発明はまた、SEQ ID NO:1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、51、55、59または63の1つのヌクレオチド配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるヌクレオチド配列を提供する。

【0106】

もう一つの態様において、VHをコードする核酸分子は、上記のVHをコードするヌクレオチド配列へ、特に、SEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、52、56、60または64の1つのアミノ酸配列を含むVHへ、高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものである。本発明はまた、SEQ ID NO:1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、51、55、59または63の1つのヌクレオチド配列を含む核酸分子へ高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするVHをコードするヌクレオチド配列を提供する。

【0107】

抗MadCAM抗体の全体の重鎖および軽鎖の一方もしくは両方、またはそれらの可変領域をコードするヌクレオチド配列は、抗MadCAM抗体を産生する任意の源から得られうる。抗体をコードするmRNAを単離する方法は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)を参照。mRNAは、抗体遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)またはcDNAクローニングで用いるcDNAを作製するために用いられうる。本発明の一つの態様において、核酸分子は、上記のように、抗MadCAM抗体を発現させるハイブリドーマ、好ましくは、XENOMOUSE(商標)動物、非ヒトのマウストランスジェニック動物または非ヒト、非マウスのトランスジェニック動物のような、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させるトランスジェニック動物細胞を融合パートナーの1つとして有するハイブリドーマ、から得られうる。もう一つの態様において、ハイブリドーマは、例えば、ヒト化抗体のために用いられうる、非ヒトの、非トランスジェニック動物由来である。

【0108】

抗MadCAM抗体の重鎖全体をコードする核酸分子は、重鎖の可変ドメイン全体またはその抗原結合ドメインをコードする核酸分子を重鎖の定常ドメインと融合することにより構築されうる。同様に、抗MadCAM抗体の軽鎖をコードする核酸分子は、軽鎖の可変ドメインま

たはその抗原結合ドメインをコードする核酸分子を軽鎖の定常ドメインと融合することにより構築されうる。VHおよびVL領域をコードする核酸分子は、VHセグメントが、ベクター内の重鎖定常領域(CH)セグメントに機能的に連結され、かつVLセグメントが、ベクター内の軽鎖定常領域(CL)セグメントに機能的に連結されているように、重鎖定常領域および軽鎖定常領域をそれぞれ、すでにコードする発現ベクターへそれらを挿入することにより完全長抗体遺伝子へ変換されうる。または、VH鎖またはVL鎖をコードする核酸分子は、標準的分子生物学的技術を用いて、VH鎖をコードする核酸分子を、CH鎖をコードする核酸分子へ連結する、例えば、ライゲーションする、ことにより完全長抗体遺伝子へ変換される。同じことが、VL鎖およびCL鎖をコードする核酸分子を用いて達成されうる。ヒト重鎖および軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において公知である。例えば、Kabat et al. , Sequence of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publ. No. 91-3242 (1991)を参照。完全長重鎖および/または軽鎖をコードする核酸分子は、それらが導入されている細胞から発現されうり、抗MadCAM抗体が単離されうる。

10

【0109】

好ましい態様において、重鎖の可変領域をコードする核酸は、SEQ ID NO:2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、52、56、60または64のアミノ酸配列の可変領域をコードし、軽鎖の可変領域をコードする核酸分子は、SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、54、58、62、66または68のアミノ酸配列の可変領域をコードする。

【0110】

一つの態様において、抗MadCAM抗体の重鎖もしくはその抗原結合部分か、または抗MadCAM抗体の軽鎖もしくはその抗原結合部分のいずれかをコードする核酸分子は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させかつMadCAM抗原で免疫されている非ヒト、非マウスの動物から単離されうる。他の態様において、核酸分子は、抗MadCAM抗体を産生する非トランスジェニック動物由来またはヒト患者由来の抗MadCAM抗体産生細胞から単離されうる。抗MadCAM抗体産生細胞からのmRNAは、標準的技術により単離され、PCRおよびライブラリー構築技術を用いてクローニングおよび/または増幅され、ならびに抗MadCAM重鎖および軽鎖をコードする核酸分子を得るための標準プロトコルを用いてスクリーニングされうる。

20

【0111】

核酸分子は、下に記載されているように、大量の抗MadCAM抗体を組換え技術で発現させるために用いられうる。核酸分子はまた、さらに下に記載されているように、キメラ抗体、一本鎖抗体、イムノアドヘシン、ダイアボディ、突然変異型抗体および抗体誘導体を作製するために用いられうる。核酸分子が、非ヒトの、非トランスジェニック動物由来である場合には、核酸分子は、また下に記載されているように、抗体ヒト化のために用いられうる。

30

【0112】

もう一つの態様において、本発明の核酸分子は、特異的な抗体配列についてのプローブまたはPCRプライマーとして用いられうる。例えば、核酸分子プローブは、診断方法に用いられうる、または核酸分子PCRプライマーは、とりわけ、抗MadCAM抗体の可変ドメインを産生するにおいて用いるヌクレオチド配列を単離するために用いられうるDNAの領域を増幅するのに用いられうる。好ましい態様において、核酸分子はオリゴヌクレオチドである。より好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、対象となる抗体の重鎖および軽鎖の超可変領域由来である。よりいっそう好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、CDRの1つもしくは複数の全部または一部をコードする。

40

【0113】

ベクター

本発明は、重鎖またはその抗原結合部分をコードする本発明の核酸分子を含むベクターを提供する。本発明はまた、軽鎖またはその抗原結合部分をコードする本発明の核酸分子を含むベクターを提供する。本発明はまた、融合タンパク質、改変された抗体、抗体断片、およびそれらのプローブをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。

50

【0114】

本発明の抗体または抗体部分を発現させるために、上記のように得られた、部分的または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAは、遺伝子が転写および翻訳制御配列に機能的に連結されているように、発現ベクターへ挿入される。発現ベクターは、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルスのような植物ウイルス、コスミド、YAC、EBV由来エピソームなどを含む。抗体遺伝子は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を制御するそれらの意図された機能を果たすように、ベクターへライゲーションされる。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いられる発現宿主細胞と適合性であるように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターへ挿入されうる。好ましい態様において、両方の遺伝子が、同じ発現ベクターへ挿入される。抗体遺伝子は、標準的方法(例えば、抗体遺伝子断片上の相補的制限部位とベクターのライゲーション、または制限部位が存在しない場合には、平滑末端ライゲーション)により発現ベクターへ挿入される。

10

【0115】

便利なベクターは、上記のように、任意のVHまたはVL配列が容易に挿入および発現されるように操作された適切な制限部位をもつ、機能的に完全なヒトCHまたはCL免疫グロブリン配列をコードするものである。そのようなベクターにおいて、スプライシングは、通常、挿入されたJ領域とヒトC領域に先行するスプライス受容体部位の間、およびまたヒトCHエクソン内に存在するスプライス領域において、生じる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域の下流の天然の染色体部位において生じる。組換え発現ベクターはまた、宿主細胞から抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードしうる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクターへクローニングされうる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種性シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)でありうる。

20

【0116】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞において抗体鎖遺伝子の発現を調節する制御配列を有する。制御配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、望まれるタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存しうることは、当業者により認識されていると思われる。哺乳動物の宿主細胞発現についての好ましい制御配列は、レトロウイルスのLTR、サイトメガロウイルス(CMV)(CMVプロモーター/エンハンサーのような)、シミアン・ウイルス40(SV40)(SV40プロモーター/エンハンサーのような)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))、ポリオーマ由来のプロモーターおよび/またはエンハンサーのような哺乳動物細胞において高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメント、ならびに天然の免疫グロブリンおよびアクチンプロモーターのような強い哺乳動物プロモーターを含む。ウイルス制御エレメントおよびそれらの配列のさらなる説明について、例えば、それぞれ、参照により本明細書に組み入れられているが、米国特許第5,168,062号、第4,510,245号および第4,968,615号を参照されたい。プロモーターおよびベクター、加えて植物の形質転換の説明を含む、植物において抗体を発現させるための方法は、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第6,517,529号を参照。細菌細胞または真菌細胞、例えば、酵母細胞、においてポリペプチドを発現させる方法もまた、当技術分野において周知である。

30

40

【0117】

抗体鎖遺伝子および制御配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞において複製を制御する配列(例えば、複製起点)および選択マーカー遺伝子のような追加の配列を有する。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を容易にする(例えば、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号および第5,179,017号参照)。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞にG418、ハ

50

イグロマイシンまたはメトトレキセートのような薬物に対する耐性を与える。好ましい選択マーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子(メトトレキセート選択/増幅に関してdhfr^r宿主細胞で用いる)およびneo遺伝子(G418選択について)およびグルタミン酸シンテターゼ遺伝子を含む。

【0118】

組換え技術で産生するタンパク質の非ハイブリドーマ宿主細胞および方法

抗MAdCAM抗体の重鎖もしくはその抗原結合部分および/または軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子、ならびにこれらの核酸分子を含むベクターは、適した哺乳動物、植物、細菌または酵母宿主細胞の形質転換に用いられうる。形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞へ導入するための任意の公知の方法でありうる。異種性ポリヌクレオチドの哺乳動物細胞への導入のための方法は、当技術分野において周知であり、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、電気穿孔法、リボソームにおけるポリヌクレオチドのカプセル化、DNAの核への微粒子銃注入および直接的微量注入を含む。さらに、核酸分子は、ウイルスベクターにより哺乳動物細胞へ導入されうる。細胞を形質転換する方法は当技術分野において周知である。例えば、米国特許第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号および第4,959,455号(それらの特許は参照により本明細書に組み入れられている)を参照。植物細胞を形質転換する方法は、当技術分野において周知であり、例えば、アグロバクテリウム媒介形質転換、微粒子銃形質転換、直接的注入、電気穿孔法、およびウイルス形質転換を含む。細菌および酵母細胞を形質転換する方法もまた当技術分野において周知である。

【0119】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は、当技術分野において周知であり、American Type Culture Collection(ATCC)から入手できる多くの不死化細胞系を含む。これらは、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NS0、SP2細胞、HEK-293T細胞、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)、A549細胞、3T3細胞、およびいくつかの他の細胞系を含む。哺乳動物宿主細胞は、ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマおよびハムスター細胞を含む。特に好ましい細胞系は、どの細胞系が高発現レベルをもつかを測定することを通して選択される。用いられうる他の細胞系は、Sf9細胞のような昆虫細胞系、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞および真菌細胞である。重鎖またはその抗原結合部分、軽鎖および/またはその抗原結合部分をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞へ導入される場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現、または、より好ましくは、宿主細胞が増殖する培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な時間、宿主細胞を培養することにより、産生される。抗体は、標準的タンパク質精製方法を用いて培地から回収されうる。植物宿主細胞は、例えば、タバコ(Nicotiana)、シロイヌナズナ(Arabidopsis)、ウキクサ、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモなどを含む。細菌宿主細胞は、大腸菌(E. coli)およびストレプトマイセス(Streptomyces)種を含む。酵母宿主細胞は、シゾサッカロマイセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)およびピチア・パストリス(Pichia pastoris)を含む。

【0120】

さらに、産生細胞系からの本発明の抗体(またはそれら由来の他の部分)の発現は、いくつかの公知の技術を用いて増強されうる。例えば、グルタミンシンテターゼ遺伝子発現系(GS系)は、ある特定の条件下で発現を増強させるための一般的なアプローチである。GS系は、欧州特許第0 216 846号、第0 256 055号、第0 338 841号および第0 323 997号に関連して全部または一部として、考察されている。

【0121】

異なる細胞系によりまたはトランスジェニック動物において発現される抗体は、お互いに異なるグリコシル化をもつ可能性が高い。しかしながら、本明細書に提供された核酸分

子によりコードされる、または本明細書に提供されたアミノ酸配列を含むすべての抗体は、抗体のグリコシル化に関わらず、本発明の一部である。

【0122】

トランスジェニック動物および植物

本発明はまた、本発明の抗体を産生するために用いられうる1つまたは複数の本発明の核酸分子を含むトランスジェニック非ヒトの動物およびトランスジェニック植物を提供する。抗体は、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ラット、マウス、ウサギ、ハムスターもしくは他の組織または哺乳動物の乳、血液もしくは尿のような体液に産生され、かつ回収されうる。例えば、例えば、米国特許第5,827,690号、第5,756,687号、第5,750,172号および第5,741,957号を参照。上記のように、ヒト免疫グロブリン座を含む非ヒトのトランスジェニック動物は、MAdCAMまたはその部分で免疫されうる。植物において抗体を作製するための方法は、例えば、参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,046,037号および第5,959,177号に記載されている。

【0123】

もう一つの態様において、非ヒトのトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物は、標準的トランスジェニック技術により、本発明の1つまたは複数の核酸分子を動物または植物へ導入することにより作製される。Hogan、前記を参照。トランスジェニック動物を作製するために用いられるトランスジェニック細胞は、胚性幹細胞、体細胞、または受精卵細胞でありうる。トランスジェニックの非ヒトの生物体は、キメラ、非キメラのヘテロ接合体、および非キメラのホモ接合体でありうる。例えば、Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual 2ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); およびPinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999)を参照。もう一つの態様において、トランスジェニックの非ヒトの生物体は、対象となる重鎖および/または軽鎖をコードする、ターゲットされた破壊ならびに置換をもちうる。好ましい態様において、トランスジェニック動物または植物は、組み合わせでMAdCAM、好ましくはヒトMAdCAMへ特異的に結合する重鎖および軽鎖をコードする核酸分子を含みかつ発現させる。もう一つの態様において、トランスジェニック動物または植物は、一本鎖抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体のような改変抗体をコードする核酸分子を含む。抗MAdCAM抗体は、任意のトランスジェニック動物において産生されうる。好ましい態様において、非ヒトの動物は、マウス、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマである。非ヒトのトランスジェニック動物は、血液、乳、尿、唾液、涙、粘液、および他の体液にそのコードされたポリペプチドを発現させる。

【0124】

ファージディスプレイライブラリー

本発明は、ファージにおけるヒト抗体のライブラリーを合成する段階、MAdCAMまたはその部分でライブラリーをスクリーニングする段階、MAdCAMと結合するファージを単離する段階、およびファージから抗体を得る段階を含む、抗MAdCAM抗体またはその抗原結合部分を作製するための方法を提供する。抗体のライブラリーを調製しうる一つの方法は、ヒト免疫グロブリン座を含む非ヒトの宿主動物をMAdCAMまたは免疫応答を引き起こしうるその抗原性部分で免疫する段階、抗体の産生を担う細胞を宿主動物から抽出する段階；抽出された細胞からRNAを単離する段階、RNAを逆転写してcDNAを生じる段階、プライマーを用いてcDNAを増幅する段階、および抗体がファージ上に発現されるようにファージディスプレイベクターへcDNAを挿入する段階を含む。本発明の組換え抗MAdCAM抗体は、このようにして得られうる。

【0125】

本明細書に開示された抗MAdCAM抗体に加えて本発明の組換え抗MAdCAMヒト抗体は、ヒトリンパ球から単離されたmRNAから調製されたヒトVLおよびVH cDNAを用いて調製された、組換え組み合わせ抗体ライブラリー、好ましくはscFvファージディスプレイライブラリー、のスクリーニングにより単離されうる。そのようなライブラリーを調製およびスクリー

ニングするための方法は、当技術分野において公知である。ファージディスプレイライブラリーを作製するための市販されているキットがある(例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01; およびStratagene SurfZAP(商標)ファージディスプレイキット、カタログ番号240612)。抗体ディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするのに用いられうる他の方法および試薬もある(例えば、米国特許第5,223,409号; PCT公開第WO 92/18619号; PCT公開第WO 91/17271号; PCT公開第WO 92/20791号; PCT公開第WO 92/15679号; PCT公開第WO 93/01288号; PCT公開第WO 92/01047号; PCT公開第WO 92/09690号; Fuchs et al. (1991) *Biotechnology*, 9:1369-1372; Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Biotechnology*, 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc Acid Res*, 19:4133-4137 (1991); およびBarbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991)を参照)。

10

【0126】

好ましい態様において、所望の特性をもつヒト抗MadCAM抗体を単離するために、本明細書に記載されているようなヒト抗MadCAM抗体は、Hoogenboom et al., PCT公開第WO 93/06213号に記載されたエピトープ刷り込み方法を用いて、まず、MadCAMへの類似した結合活性をもつヒト重鎖および軽鎖を選択するために用いられる。この方法に用いられる抗体ライブラリーは、好ましくは、McCafferty et al., PCT公開第WO 92/01047号、McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); およびGriffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993)に記載されているように調製およびスクリーニングされたscFvライブラリーである。scFv抗体ライブラリーは、好ましくは、抗原としてヒトMadCAMを用いてスクリーニングされる。

20

【0127】

いったん、最初のヒトVLおよびVHセグメントが選択されたならば、最初に選択されたVLおよびVHセグメントの異なる対がMadCAM結合についてスクリーニングされる、「混合および組み合わせ」実験は、好ましいVL/VH対組み合わせを選択するために行われる。さらに、抗体の質をさらに向上させるために、好ましいVL/VH対のVLおよびVHセグメントは、天然の免疫応答中の抗体の親和性成熟に關与するインビボの体細胞突然変異過程に類似した過程において、好ましくはVHおよび/またはVLのCDR3領域内に、ランダムに突然変異されうる。このインビトロ親和性成熟は、VH CDR3またはVL CDR3、それぞれに相補的なPCRプライマーを用いてVHおよびVL領域を増幅することにより達成されうるが、それらのプライマーは、結果として生じたPCR産物が、ランダム突然変異がVHおよび/またはVL CDR3へ導入されているVHならびにVLセグメントをコードするように、特定の位置において4つのヌクレオチド塩基のランダム混合物で「スパイク」されている。これらのランダムに突然変異したVHおよびVLセグメントは、MadCAMへの結合について再スクリーニングされうる。

30

【0128】

組換え免疫グロブリンディスプレイライブラリーからの本発明の抗MadCAM抗体のスクリーニングおよび単離後、選択された抗体をコードする核酸は、ディスプレイパッケージから(例えば、ファージゲノムから)回収され、標準的組換えDNA技術により他の発現ベクターへサブクロニングされうる。必要に応じて、核酸は、下記のように、本発明の他の抗体型を作製するためにさらに操作されうる。組み合わせライブラリーのスクリーニングにより単離された組換えヒト抗体を発現させるために、抗体をコードするDNAは、上記のように、組換え発現ベクターへクロニングされ、哺乳動物宿主細胞へ導入される。

40

【0129】

クラススイッチ

本発明のもう一つの局面は、抗MadCAM抗体のクラスが別のものへスイッチされうる機構を提供することである。本発明の一つの局面において、VLまたはVHをコードする核酸分子

50

は、それが、CLまたはCHをコードするいずれのヌクレオチド配列も含まないように、当技術分野において周知の方法を用いて単離される。VLまたはVHをコードする核酸分子は、その後、免疫グロブリン分子の異なるクラス由来のCLまたはCHをコードするヌクレオチド配列と機能的に連結される。これは、上記のように、CLまたはCHコード配列を含むベクターまたは核酸分子を用いて達成されうる。例えば、本来IgMであった抗MadCAM抗体は、IgGへクラススイッチされうる。さらに、クラススイッチは、1つのIgGサブクラスを別のものへ、例えば、IgG₄からIgG₂へ、変換するために用いられうる。所望のアイソタイプまたは抗体サブクラスを含む本発明の抗体を作製するための好ましい方法は、抗MadCAM抗体の重鎖をコードする核酸および抗MadCAM抗体の軽鎖をコードする核酸を単離する段階、重鎖の可変領域を得る段階、重鎖の可変領域を所望のアイソタイプの重鎖の定常ドメインとライゲーションする段階、細胞において軽鎖およびライゲーションされた重鎖を発現させる段階、ならびに所望のアイソタイプをもつ抗MadCAM抗体を収集する段階を含む。

10

【0130】

抗体誘導体

当業者に公知の技術および方法を用いて抗体誘導体を作製するために上記の核酸分子を用いうる。

【0131】

ヒト化抗体

非ヒト抗体の免疫原性は、ヒト化の技術を用いて、場合によっては、適切なライブラリーを用いるディスプレイ技術を使用して、ある程度まで低減されうる。マウス抗体または他の種由来の抗体は、当技術分野において周知の技術を用いてヒト化または霊長類化されうることが認識されていると思われる。例えば、Winter and Harris, Immunol Today, 14:43-46 (1993)およびWright et al., Crit. Reviews in Immunol., 12:125-168 (1992)を参照。対象となる抗体は、C_H1、C_H2、C_H3、ヒンジドメインおよび/またはフレームワークドメインを対応するヒト配列に置換しうる組換えDNA技術により操作されうる(WO 92/02190ならびに米国特許第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,761号、第5,693,792号、第5,714,350号、および第5,777,085号参照)。もう一つの態様において、非ヒトの抗MadCAM抗体は、C_H1、ヒンジドメイン、C_H2、C_H3および/またはフレームワークドメインを本発明の抗MadCAM抗体の対応するヒト配列に置換することによりヒト化されうる。

20

【0132】

突然変異型抗体

もう一つの態様において、核酸分子、ベクターおよび宿主細胞は、突然変異した抗MadCAM抗体を作製するために用いられうる。抗体は、抗体の結合性質を変化させるために重鎖および/または軽鎖の可変ドメインにおいて突然変異されうる。例えば、突然変異は、抗体のMadCAMについてのK_dを増加または減少させるようにCDR領域の1つまたは複数においてなされうる。部位特異的突然変異誘発における技術は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrook et al., and Ausubel et al., 前記を参照。好ましい態様において、突然変異は、抗MadCAM抗体の可変領域において生殖系列と比較して変化していることが知られているアミノ酸残基になされる。より好ましい態様において、1つまたは複数の突然変異は、抗MadCAM抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modもしくは7.26.4-modの1つの可変領域またはCDR領域において生殖系列と比較して変化していることが知られているアミノ酸残基になされる。もう一つの態様において、1つまたは複数の突然変異は、アミノ酸配列が、SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、52、54、56、58、62、64、66、もしくは68に示されている、またはヌクレオチド配列が、SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、51、53、55、57、61、63、65、もしくは67に示されている、可変領域またはCDR領域において生殖系列と比較して変化していることが知られているアミノ酸残基になされる。もう一つの態様において、核酸分子は、フレームワーク領域の1つまたは複数において突然変異

30

40

50

している。突然変異は、抗MadCAM抗体の半減期を増加させるためにフレームワーク領域または定常ドメインにおいてなされうる。例えば、参照により本明細書に組み入れられている、2000年2月24日に公開されたWO 00/09560を参照。一つの態様において、1個、3個、または5個または10個の点突然変異、およびわずか15個の点突然変異がありうる。フレームワーク領域または定常ドメインにおける突然変異はまた、抗体の免疫原性を変化させるために、別の分子への共有結合性もしくは非共有結合性結合のための部位を供給するために、または補体結合のような性質を変化させるために、なされうる。突然変異は、単一突然変異型抗体におけるフレームワーク領域、定常ドメインおよび可変領域のそれぞれにおいてなされうる。または、突然変異は、単一突然変異型抗体におけるフレームワーク領域、可変領域、または定常ドメインのうちのたった1つにおいてなされうる。

10

【0133】

一つの態様において、突然変異前の抗MadCAM抗体と比較して、突然変異した抗MadCAM抗体のVHまたはVL領域のいずれかにおいて15個以下のアミノ酸変化がある。より好ましい態様において、突然変異した抗MadCAM抗体のVHもしくはVL領域のいずれかにおいて、わずか10個のアミノ酸変化、より好ましくはわずか5個のアミノ酸変化、またはよりいっそう好ましくはわずか3個のアミノ酸変化がある。もう一つの態様において、定常ドメインにおいて、わずか15個のアミノ酸変化、より好ましくは、わずか10個のアミノ酸変化、よりいっそう好ましくはわずか5個のアミノ酸変化がある。

【0134】

改変抗体

20

もう一つの態様において、もう一つのポリペプチドへ連結された抗MadCAM抗体の全部または一部を含む融合抗体またはイムノアドヘシニングが、作製されうる。好ましい態様において、抗MadCAM抗体の可変領域のみがポリペプチドに連結される。もう一つの好ましい態様において、VHおよびVLドメインが抗体結合部位を形成するようにお互いに相互作用できる様式で、抗MadCAM抗体のVHドメインは、第一ポリペプチドに連結され、一方、抗MadCAM抗体のVLドメインは、第一ポリペプチドと会合する第二ポリペプチドに連結されている。もう一つの好ましい態様において、VHおよびVLドメインがお互いに相互作用できるように、VHドメインが、リンカーによりVLドメインから分離されている(下の一本鎖抗体の項目下を参照)。VH-リンカー-VL抗体は、その後、対象となるポリペプチドに連結される。融合抗体は、ポリペプチドをMadCAM発現細胞または組織へ方向づけるために有用である。ポリペプチドは、毒素、成長因子もしくは他の制御タンパク質のような治療剤でありうる、または西洋ワサビのペルオキシダーゼのような、容易に可視化されうる酵素のような診断剤でありうる。さらに、2つ(またはそれ以上)の一本鎖抗体がお互いに連結されている融合抗体が、作製されうる。これは、単一のポリペプチド鎖上に二価もしくは多価抗体を作製したい場合、または二重特異性抗体を作製した場合には、有用である。

30

【0135】

一本鎖抗体(scFv)を作製するために、VLおよびVH領域が可動性リンカーにより連結されて、VHおよびVL配列が連続した一本鎖タンパク質として発現されうるように、VHおよびVLコード化DNA断片は、可動性リンカーをコードする、例えば、アミノ酸配列(Gly₄-Ser)₃をコードする、もう一つの断片に機能的に連結される(例えば、Bird et al., Science, 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)を参照)。一本鎖抗体は、単一のVHおよびVLが用いられる場合には、一価、2つのVHおよびVLが用いられる場合には、二価、または2つより多いVHおよびVLが用いられる場合には、多価でありうる。

40

【0136】

もう一つの態様において、他の改変抗体は、抗MadCAMコード化核酸分子を用いて調製されうる。例えば、「カップポディ」(Ill et al., Protein Eng, 10:949-57 (1997))、「ミニポディ」(Martin et al., EMBO J, 13:5303-9 (1994))、「ダイアポディ」(Holliger et al., PNAS USA, 90:6444-6448 (1993))、または「ジャヌシン(Janusin)」(Traunecker et al., EMBO J, 10:3655-3659 (1991)およびTraunecker et al., "Janusin: new mole

50

cular design for bispecific reagents, " Int J Cancer Suppl, 7:51-52 (1992))が、本明細書の教示に従って、標準的な分子生物学的技術を用いて調製されうる。

【0137】

もう一つの局面において、キメラおよび二重特異性抗体が作製されうる。異なる抗体由来のCDRおよびフレームワーク領域を含むキメラ抗体が、作製されうる。好ましい態様において、キメラ抗体のCDRは、ヒト抗MAdCAM抗体の軽鎖または重鎖の可変領域のCDRの全部を含むが、一方、フレームワーク領域は、1つ以上の異なる抗体由来である。より好ましい態様において、キメラ抗体のCDRは、ヒト抗MAdCAM抗体の軽鎖および重鎖の可変領域のCDRの全部を含む。フレームワーク領域は、もう一つの種由来であり、好ましい態様において、ヒト化されうる。または、フレームワーク領域は、もう一つのヒト抗体由来でありうる。

10

【0138】

1つの結合ドメインを通してMAdCAMへ、および第二の結合ドメインを通して第二分子へ、特異的に結合する二重特異性抗体が、作製されうる。二重特異性抗体は、組換え分子生物学的技術により産生されうる、または物理的にいっしょに結合されうる。さらに、MAdCAMへおよびもう一つの分子へ特異的に結合する、1つより多いVHおよびVLを含む一本鎖抗体が、作製されうる。そのような二重特異性抗体は、周知である技術、例えば、(i)および(ii)に関連して、例えば、Fanger et al., Immunol Methods 4:72-81 (1994)およびWright and Harris, 前記を参照、ならびに(iii)に関連して、例えば、Trunecker et al., Int. J. Cancer(Suppl.) 7:51-52 (1992)参照、を用いて作製されうる。好ましい態様において、二重特異性抗体は、MAdCAMへ、および内皮細胞上で高レベルで発現されたもう一つの分子へ、結合する。より好ましい態様において、他の分子は、VCAM、ICAMまたはL-セレクチンである。

20

【0139】

様々な態様において、上記の改変抗体は、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modまたは7.26.4-modから選択された抗体の1つ由来の、可変領域の1つもしくは複数または1つもしくは複数のCDR領域を用いて調製される。もう一つの態様において、改変抗体は、アミノ酸配列がSEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、52、54、56、58、62、64、66、もしくは68に示されている、またはヌクレオチド配列がSEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、51、53、55、57、61、63、65、もしくは67に示されている、可変領域の1つもしくは複数または1つもしくは複数のCDR領域を用いて調製される。

30

【0140】

誘導体化および標識抗体

本発明の抗体または抗体部分は、誘導体化されうる、またはもう一つの分子(例えば、もう一つのペプチドまたはタンパク質)に連結されうる。一般的に、抗体またはその部分は、MAdCAM結合が誘導体化または標識化により不利に影響されないように、誘導体化される。従って、本発明の抗体および抗体部分は、本明細書に記載されたヒト抗MAdCAM抗体の無傷型および改変型の両方を含むように意図される。例えば、本発明の抗体または抗体部分は、もう一つの抗体(例えば、二重特異性抗体またはダイアボディ)、検出剤、細胞傷害性物質、薬剤、および/または、抗体もしくは抗体部分のもう一つの分子(ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグのような)との結合を仲介することができるタンパク質もしくはペプチドのような、1つまたは複数の他の分子実体へ機能的に連結されうる(化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性結合またはそうでないものにより)。

40

【0141】

誘導体化抗体の1つの型は、2つまたはそれ以上の抗体(例えば、二重特異性抗体を作製するために、同じ型の、または異なる型の)を架橋することにより作製される。適した架橋剤は、適切なスペーサーにより分離された2つの別個の反応性基を有するヘテロ二官能

50

性(例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)、またはホモ二官能性(例えば、ジスクシンイミジルスベレート)であるものを含む。そのようなリンカーは、Pierce Chemical Company, Rockford, IIIから入手できる。

【0142】

誘導体化抗体のもう一つの型は、標識抗体である。本発明の抗体または抗体部分が誘導体化されうる有用な検出剤は、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリン、ラントニドリン光体などを含む。抗体はまた、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどのような検出に有用である酵素で標識されうる。抗体が検出可能な酵素で標識されている場合、それは、酵素が用いて識別されうる反応生成物を生成する、追加の試薬を添加することにより検出される。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ剤が存在している場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの追加が、検出できる着色反応生成物へ導く。抗体はまた、ビオチンで標識され、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的測定を通して検出されうる。抗体は、ガドリニウムのような磁気剤で標識されうる。抗体はまた、二次レポーターにより認識されるあらかじめ決定されたポリペプチドエピトープで標識されうる(例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体についての結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)。いくつかの態様において、標識は、可能性のある立体障害を低減させるために様々な長さのスペーサーアームにより付着される。

【0143】

抗MadCAM抗体はまた、放射性標識化アミノ酸で標識されうる。放射性標識は、診断および治療の両方の目的に用いられうる。例えば、放射性標識は、X線または他の診断技術によりMadCAM発現組織を検出するために用いられうる。さらに、放射性標識は、罹患組織またはMadCAM発現腫瘍に対する毒素として治療的に用いられうる。ポリペプチドについての標識の例は、限定されるわけではないが、以下の放射性同位体または放射性核種 -- ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、を含む。

【0144】

抗MadCAM抗体はまた、ポリエチレングリコール(PEG)、メチルもしくはエチル基、または糖基のような化学基で誘導体化されうる。これらの基は、抗体の生物学的特性を改善するために、例えば、血清半減期を増加させるために、または組織結合を増加させるために、有用でありうる。この方法はまた、抗MadCAM抗体の任意の抗原結合断片またはバージョンに適用される。

【0145】

薬学的組成物およびキット

さらなる局面において、本発明は、阻害性ヒト抗MadCAM抗体を含む組成物、およびそのような組成物で被験者を処置するための方法を提供する。いくつかの態様において、処置の被験者はヒトである。他の態様において、被験者は、獣医学的対象である。いくつかの態様において、獣医学的対象は、イヌまたは非ヒトの霊長類である。

【0146】

処置は、本発明の1つまたは複数の阻害性抗MadCAMモノクローナル抗体、またはそれらの抗原結合断片の、単独または薬学的に許容される担体と共での、投与を含む。本発明の阻害性抗MadCAM抗体およびそれらを含む組成物は、1つまたは複数の他の治療剤、診断剤または予防剤と組み合わせて投与されうる。追加の治療剤は、抗炎症性剤または免疫調節剤を含む。これらの薬剤は、限定されるわけではないが、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、NCX-1015またはブデソニドのような局所的小および経口コルチコステロイド；メサラジン、オルサラジン、バルサラジドまたはNCX-456のようなアミノサリチラート；アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキセート、シクロスポリン、FK506、IL-10(イロデカキン)、IL-11(Oporelevkin)、IL-12、MIF/CD74アンタゴニスト、TNX-100/5-D12のようなCD40アンタゴニスト、OX40Lアンタゴニスト、GM-CSF、ピメクロリムスまたはラパマイシンのような免疫調節物質のクラス；イフリキシマブ、アダリムマブ、CDP-870、

オネルセプト、エタネルセプトのような抗TNF α 剤のクラス；PDE-4阻害剤(ロフルミラストなど)、TACE阻害剤(DPC-333、RDP-58など)およびICE阻害剤(VX-740など)、ならびにダクリツマブのようなIL-2受容体アンタゴニストのような抗炎症性剤のクラス、ナタリツマブ、MLN-02またはアリカホルセンのような選択性接着分子アンタゴニストのクラス、限定されるわけではないが、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、セレコキシブのようなCOX-2阻害剤、ガバペンチンおよびプレガバリンのようなP/Q型電位感受性チャネル($\alpha 2\delta$)調節剤NK-1受容体アンタゴニスト、カナビノイド受容体調節剤、およびデルタオピオイド受容体アゴニスト、ならびに抗新生物剤、抗腫瘍剤、抗血管形成剤または化学療法剤を含む。そのような追加の薬剤は、同じ組成物に含まれる、または別々に投与される。いくつかの態様において、本発明の1つまたは複数の阻害性抗MAdCAM抗体は、ワクチンとして、またはワクチンへのアジュバントとして用いられる。特に、MAdCAMがリンパ組織に発現されているため、ワクチン抗原は、抗原を本発明の抗MAdCAM抗体へ結合することによりリンパ組織へ有利にターゲットされる。

10

【0147】

本明細書で用いられる場合、「薬学的に許容される担体」とは、生理学的に適合性のあるありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張性および吸収促進または遅延剤などを意味する。薬学的に許容される担体のいくつかの例は、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、塩化ナトリウム、デキストロース、グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノールなどを含む酢酸緩衝液、およびそれらの組み合わせである。多くの場合、等張性剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコ

20

【0148】

本発明の組成物は、様々な形、例えば、液体溶液(例えば、注射可能および注入可能な溶液)、分散液または懸濁液、錠剤、ピル、凍結乾燥ケーキ、乾燥粉末、リポソームおよび坐剤のような液体、半固体および固体剤形をとりうる。好ましい形は、投与および治療的適用の意図された様式に依存する。典型的な好ましい組成物は、ヒトの受動免疫化に用いられるものと類似した組成物のような注射可能または注入可能溶液の形をとる。好ましい投与様式は、非経口(例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、皮内)である。好ましい態様において、抗体は、静脈内注入または注射により投与される。もう一つの好ましい態様において、抗体は、筋肉内、皮内または皮下注射により投与される。

30

【0149】

治療用組成物は、典型的には、製造および保存の条件下で無菌および安定でなければならない。組成物は、溶液、凍結乾燥ケーキ、乾燥粉末、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高薬物濃度に適した他の規則正しい構造として製剤化される。滅菌注射可能溶液は、要求に応じて上で列挙された成分の1つまたは組み合わせを含む適切な溶媒に、必要とされる量の抗MAdCAM抗体を組み入れ、続いて滅菌することにより調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分プラス任意の追加の望ましい成分の粉末をそれらのあらかじめ滅菌した溶液から生じる真空乾燥および凍結乾燥である。一般的に、分散液は、基本的な分散媒および上で列挙されたものからの必要とされる他の成分を含む滅菌媒体へ活性化化合物を組み入れることにより調製される。溶液の望ましい特性は、例えば、界面活性剤の使用により、および分散液の場合における必要とされる粒子サイズは、界面活性剤、リン脂質およびポリマーの使用により、維持される。注射可能組成物の長時間吸収は、吸収を遅らせる作用物質、例えば、モノステアリン酸塩、高分子材料、油およびゼラチン、を組成物に含むことにより引き起こされる。

40

【0150】

本発明の抗体は、当技術分野において公知の様々な方法により投与されるが、多くの治療的適用について、好ましい投与経路/様式は、皮下、筋肉内、皮内または静脈内の注

50

入である。当業者により認識されているように、投与経路および/または様式は、所望の結果に依存して変わりうる。

【0151】

特定の態様において、抗体組成物は、インプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達系を含む徐放性製剤のような、抗体を急速な放出から保護する担体で調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような生分解性、生体適合性高分子が用いられる。そのような製剤の調製のための多くの方法は、特許化されている、または当業者に一般的に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978))を参照。

10

【0152】

特定の態様において、本発明の抗MadCAM抗体は、例えば、不活性な希釈剤または同化できる食用担体と共に、経口で投与されうる。化合物(および必要に応じて、他の成分)はまた、硬カプセルまたは軟カプセルに入れる、錠剤へと圧縮する、または被験者の食事へ直接的に組み入れられうる。経口治療的投与について、抗MadCAM抗体は、賦形剤と混合され、摂取できる錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、カシェ剤などの形で用いられうる。非経口以外の投与により本発明の化合物を投与するために、その不活性化を防ぎうる材料で、化合物をコーティングする、または化合物と同時投与することが必要である場合がある。

【0153】

本発明の組成物は、本発明の抗体もしくは抗原結合部分の「治療的有效量」または「予防的有效量」を含みうる。「治療的有效量」とは、必要な用量および期間における、所望の治療的結果を達成するのに有効な量を指す。抗体または抗体部分の治療的有效量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発しうる抗体または抗体部分の能力のような因子に従って変わりうる。治療的有效量はまた、治療的有益な効果が、抗体または抗体部分のいずれの毒性または有害作用をも上回るものである。「予防的有效量」とは、必要な用量および期間における、所望の予防的結果を達成するのに有効な量を指す。典型的には、予防的用量は疾患の前または初期において被験者に用いられるため、予防的有效量は、治療的有效量より少なくありうる。

20

【0154】

投与計画は、最適な所望の応答(例えば、治療的または予防的応答)を提供するように調整されうる。例えば、単一ボラスが投与されうる、数回に分割された用量が長い期間をかけて投与されうる、または用量は、治療的状況の緊急性により示されるように比例して低減もしくは増加されうる。投与の簡便性および用量の均一性のために非経口組成物を用量単位で製剤化することは、特に有利である。本明細書に用いられる場合の用量単位型とは、処置されるべき哺乳動物対象についての単位の用量として適した物理的に別個の単位を指す；各単位は、必要とされる薬学的担体に付随して、所望の治療効果を生じるように計算された活性化合物のあらかじめ決められた量を含む。本発明の用量単位型についての特定化は、(a)抗MadCAM抗体またはその部分の固有の特性および達成されるべき特定の治療的または予防的効果、ならびに(b)個体における感受性についての処置のためのそのような抗体を調合することの当技術分野に内在する制限により、決定され、かつ直接的に依存する。

30

40

【0155】

本発明の抗体もしくは抗体部分の治療的または予防的有效量についての例示的な、非限定的範囲は、0.025~50 mg/kg、より好ましくは0.1~50 mg/kg、より好ましくは0.1~25 mg/kg、0.1~10 mg/kg、または0.1~3 mg/kgである。いくつかの態様において、製剤は、20 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.5、140 mM NaCl、および0.2 mg/mL ポリソルベート80の緩衝液に5 mg/mLの抗体を含む。用量値は、緩和されるべき状態の型および重症度で異なりうることは留意されるべきである。何か特定の被験者について、特定の投与計画は、個体の必要性および化合物の投与を施すまたは指揮する人のプロとしての判断に従って時間

50

とともに調整されるべきであること、ならびに本明細書に示された用量範囲は、例示的であるのみで、主張された組成物の範囲または実施を限定することを意図されないことは、さらに理解されるべきである。

【0156】

本発明のもう一つの局面は、本発明の抗MadCAM抗体もしくは抗体部分、またはそのような抗体を含む組成物を含むキットを提供する。キットは、抗体または組成物に加えて、診断剤または治療剤を含みうる。キットはまた、診断または治療方法における使用についての使用説明書を含みうる。好ましい態様において、キットは、抗体またはそれを含む組成物、および下記の方法に用いられうる診断剤を含む。もう一つの好ましい態様において、キットは、抗体またはそれを含む組成物、および下記の方法に用いられうる1つまたは複数の治療剤を含む。

10

【0157】

遺伝子治療

本発明の核酸分子は、遺伝子治療を介してそれを必要としている患者へ投与されうる。治療は、インビボまたはエクスピボのいずれかでありうる。好ましい態様において、重鎖および軽鎖の両方をコードする核酸分子が、患者へ投与される。より好ましい態様において、核酸分子は、B細胞が抗体を産生することについて特定化されているため、それらがB細胞の染色体へ安定的に組み込まれるように投与される。好ましい態様において、前駆体B細胞は、エクスピボでトランスフェクションされるまたは感染し、それを必要としている患者へ再移植される。もう一つの態様において、前駆体B細胞または他の細胞は、対象となる細胞型を感染させることが知られた組換えウイルスを用いてインビボで感染する。遺伝子治療に用いられる典型的ベクターは、リボソーム、プラスミドおよびウイルスベクターを含む。例示的なウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスである。インビボまたはエクスピボのいずれかでの感染後、抗体発現のレベルは、処置された患者から試料を採取し、当技術分野において公知の、または本明細書に考察された、任意のイムノアッセイ法を用いることによりモニターされうる。

20

【0158】

好ましい態様において、遺伝子治療法は、抗MadCAM抗体の重鎖またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子を投与する段階、および核酸分子を発現させる段階を含む。もう一つの態様において、遺伝子治療法は、抗MadCAM抗体の軽鎖またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子を投与する段階、および核酸分子を発現させる段階を含む。より好ましい方法において、遺伝子治療法は、本発明の抗MadCAM抗体の重鎖またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子および軽鎖またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子を投与する段階、ならびに核酸分子を発現させる段階を含む。遺伝子治療法はまた、もう一つの抗炎症性剤または免疫調節剤を投与する段階を含みうる。

30

【0159】

使用の診断方法

抗MadCAM抗体は、インビトロまたはインビボで生体試料においてMadCAMを検出するために用いられうる。抗MadCAM抗体は、非限定的に、ELISA、RIA、FACS、組織免疫組織化学、ウェスタンブロットまたは免疫沈降を含む通常のイムノアッセイ法に用いられうる。本発明の抗MadCAM抗体は、ヒトからMadCAMを検出するために用いられうる。もう一つの態様において、抗MadCAM抗体は、カニクイザルおよびアカゲザル、チンパンジーならびに無尾猿のような旧世界霊長類からMadCAMを検出するために用いられうる。本発明は、生体試料を本発明の抗MadCAM抗体と接触させる段階、およびMadCAMに結合した抗体を検出する段階を含む、生体試料においてMadCAMを検出するための方法を提供する。一つの態様において、抗MadCAM抗体は、検出可能な標識で直接的に誘導体化されている。もう一つの態様において、抗MadCAM抗体(第一抗体)は標識されず、その抗MadCAM抗体と結合することができる第二抗体または他の分子が標識されている。当業者に周知であるように、第一抗体の特定の種およびクラスと特異的に結合する能力がある第二抗体が、選択される。例えば、抗MadC

40

50

AM抗体がヒトIgGである場合には、第二抗体は、抗ヒトIgGでありうる。抗体に結合できる他の分子は、非限定的に、プロテインAおよびプロテインGを含み、それらの両方とも、例えば、Pierce Chemical Co.から、市販されている。

【0160】

抗体または二次的なものについての適切な標識は、前記に開示されており、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、磁気剤、および放射性物質を含む。適切な酵素の例は、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含む；適切な補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含む；適切な蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンを含む；発光物質の例は、ルミノールを含む；磁気剤の例は、ガドリニウムを含む；および適切な放射性物質の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H を含む。

【0161】

代替の態様において、MadCAMは、検出可能な物質で標識されたMadCAM標準および標識されていない抗MadCAM抗体を利用する競合イムノアッセイ法により生体試料においてアッセイされうる。このアッセイ法において、生体試料、標識MadCAM標準および抗MadCAM抗体が混合され、非標識抗体に結合した標識MadCAM標準の量が測定される。生体試料におけるMadCAMの量は、抗MadCAM抗体に結合した標識MadCAM標準の量に反比例する。

【0162】

いくつかの目的のために上で開示されたイムノアッセイ法を用いる。一つの態様において、抗MadCAM抗体は、細胞培養中の細胞においてMadCAMを検出するために用いられうる。好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、細胞表面MadCAM発現のレベルを、様々な化合物での細胞の処理後に測定するために用いられうる。この方法は、MadCAMを活性化するかまたは阻害するために用いられうる化合物を試験するために用いられうる。この方法において、細胞の1つの試料が、一時期、試験化合物で処理され、一方、もう一つの試料は未処理のままであり、その後、細胞表面発現がフローサイトメトリー、免疫組織化学、ウェスタンブロット、ELISAまたはRIAにより測定されうる。さらに、イムノアッセイ法は、MadCAMの活性化または阻害のいずれかについて多数の化合物を試験するために高処理量スクリーニングのためにスケールアップされうる。

【0163】

本発明の抗MadCAM抗体はまた、組織上または組織由来の細胞においてMadCAMのレベルを測定するために用いられうる。好ましい態様において、組織は罹患組織である。より好ましい態様において、組織は、炎症を起こしている胃腸管またはその生検である。好ましい方法の態様において、組織またはその生検は、患者から切除される。組織または生検は、その後、例えば、MadCAMレベル、MadCAMの細胞表面レベル、またはMadCAMの局在性を上で考察された方法により測定しうるイムノアッセイ法に用いられる。方法は、炎症を起こしている組織がMadCAMを高レベルで発現させているかどうかを決定するために用いられうる。

【0164】

上記診断方法は、組織が抗MadCAM抗体での処理に対して良く応答していることを示しうるのだが、組織が高レベルのMadCAMを発現させているかどうかを決定するために用いられうる。さらに、診断方法はまた、抗MadCAM抗体での処理が、組織に、MadCAMのより低いレベルを発現させているかどうかを決定するために用いられうる、および、それに従って、処理が成功であるかどうかを決定するために用いられうる。

【0165】

本発明の抗体はまた、MadCAMを発現させる組織および器官の位置を特定するためにインビボで用いられうる。好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、炎症を起こしている組織の位置を特定するために用いられうる。本発明の抗MadCAM抗体の利点は、それらが投与により免疫応答を生じないことである。方法は、抗MadCAM抗体またはその薬学的組成物をそ

のような診断検査を必要としている患者へ投与する段階、およびMadCAM発現組織の位置を測定するために画像解析に患者をかける段階を含む。画像解析は、医学分野において周知であり、非限定的に、X線分析、 γ シンチグラフィ、磁気共鳴画像化(MRI)、陽電子放出断層撮影法またはコンピュータ断層撮影法(CT)を含む。方法のもう一つの態様において、生検は、患者を画像解析にかけるよりむしろ、対象となる組織がMadCAMを発現させているかどうかを測定するために患者から得られる。好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、患者において画像化されうる検出可能な作用物質で標識されうる。例えば、抗体は、X線分析に用いられうるバリウムのような造影剤、またはMRIもしくはCTに用いられうるガドリニウムキレートのような磁気造影剤で標識されうる。他の標識剤は、非限定的に、 ^{99}Tc のような放射性同位体を含む。もう一つの態様において、抗MadCAM抗体は、標識されず、検出できかつ抗MadCAM抗体と結合することができる二次抗体または他の分子を投与することにより画像化される。

10

【0166】

本発明の抗MadCAM抗体はまた、ドナーの血液、血清、血漿、または、限定されるわけではないが、便、尿、痰もしくは生検試料を含む他の生物流体に存在する可溶性MadCAMのレベルを測定するために用いられうる。好ましい態様において、生物流体は血漿である。その後、生物流体は、可溶性MadCAMのレベルを測定するためにイムノアッセイ法に用いられる。可溶性MadCAMは、進行中の胃腸炎症についての代理のマーカーでありうり、検出の方法は、疾患重症度を測定するための診断マーカーとして用いられうる。

【0167】

20

上記診断方法は、個体が抗MadCAM抗体での処理に良く応答していることを示しうるのだが、個体が高レベルの可溶性MadCAMを発現させているかどうかを決定するために用いられうる。さらに、診断方法はまた、抗MadCAM抗体(下記参照)または疾患の他の薬剤での処理が、個体にMadCAMのより低いレベルを発現させているかどうかを測定するために用いられうり、それに従って、処理が成功したかどうかを決定するために用いられうる。

【0168】

抗MadCAM抗体による $\alpha_4\beta_7$ /MadCAM依存性接着の阻害

もう一つの態様において、本発明は、MadCAMと結合し、かつ $\alpha_4\beta_7$ -インテグリンを有している細胞のMadCAMへの、またはL-セレクトリンのような他の同族リガンドのMadCAMへの結合および接着を阻害する抗MadCAM抗体を提供する。好ましい態様において、MadCAMはヒトであり、かつ可溶性型か、または細胞の表面上に発現されているかのいずれかである。もう一つの好ましい態様において、抗MadCAM抗体はヒト抗体である。もう一つの態様において、抗体またはその部分は、 $\alpha_4\beta_7$ とMadCAMの間の結合をわずか50 nMの IC_{50} 値で阻害する。好ましい態様において、 IC_{50} 値は、わずか5 nMである。より好ましい態様において、 IC_{50} 値は5 nM未満である。より好ましい態様において、 IC_{50} 値は、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 未満、0.04 $\mu\text{g/mL}$ 未満または0.03 $\mu\text{g/mL}$ 未満である。もう一つの好ましい態様において、 IC_{50} 値は、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 未満、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 未満または0.3 $\mu\text{g/mL}$ 未満である。 IC_{50} 値は、当技術分野において公知の任意の方法により測定されうる。典型的には、 IC_{50} 値は、ELISAまたは接着アッセイ法により測定されうる。好ましい態様において、 IC_{50} 値は、天然でMadCAMを発現させる細胞もしくは組織か、またはMadCAMを発現させるように操作されている細胞もしくは組織のいずれかを用いて接着アッセイ法により測定される。

30

40

【0169】

抗MadCAM抗体による腸管付属リンパ組織へのリンパ球補充の阻害

もう一つの態様において、本発明は、天然で発現されているMadCAMと結合して、リンパ球の特定化された胃腸リンパ組織への結合を阻害する抗MadCAM抗体を提供する。好ましい態様において、天然で発現されているMadCAMはヒトまたは霊長類MadCAMであり、可溶性型かまたは細胞の表面上に発現されているかのいずれかである。もう一つの好ましい態様において、抗MadCAM抗体は、ヒト抗体である。もう一つの態様において、抗体またはその部分は、腸栄養性 $\alpha_4\beta_7^+$ リンパ球のMadCAMを発現させている組織への補充をわずか5 mg/kgの IC_{50} 値で阻害する。好ましい態様において、 IC_{50} 値は、わずか1 mg/kgである。より好

50

ましい態様において、 IC_{50} 値は、0.1 mg/kg未満である。一つの態様において、 IC_{50} 値は、 γ シンチグラフィまたは単一陽電子放出コンピュータ断層撮影法を用いて、テクネチウム標識末梢血リンパ球の胃腸管への補充の用量効果関係を測定することにより決定される。もう一つの態様において、 IC_{50} 値は、抗MadCAM抗体の用量の関数として、フローサイトメトリーを用いて、末梢循環において、限定されるわけではないが、 $CD4^+ \alpha_4 \beta_7^+$ メモリーT細胞のような腸栄養性 $\alpha_4 \beta_7^+$ リンパ球における増加を測定することにより決定される。

【0170】

本発明がより良く理解されうるために、以下の実施例が示されている。これらの実施例は、例証の目的のためのみであって、いかなる方法によっても本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0171】

実施例1：

抗MadCAM産生ハイブリドーマの作製

本発明の抗体は、本実施例に従って調製、アッセイおよび選択された。

【0172】

一次免疫原調製：

2つの免疫原が、XenoMouse(商標)マウスの免疫化のために調製された：(i)MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質および(ii)MadCAMで安定的にトランスフェクションされた細胞から調製された細胞膜。

【0173】

(i)MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質

発現ベクター構築：

MadCAMの成熟細胞外の免疫グロブリン様ドメインをコードするEcoRI/BglIII cDNA断片がpINCY Incyteクローン(3279276)から切除され、インフレームのIgG₁ Fc融合を生じるように、pIG1ベクターのEcoRI/BamHI部位ヘクローニングされた(Simmons, D.L. (1993), Cellular Interactions in Development: A Practical Approach, ed. Hartley, D.A. (Oxford Univ. Press, Oxford), pp. 93-127)。結果として生じた挿入断片は、EcoRI/NotIで切除され、pCDNA3.1+(Invitrogen)ヘクローニングされた。ベクターにおけるMadCAM-IgG₁ Fc cDNAは、配列確認された。MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質のアミノ酸配列は、下に示されている：

MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質：

**MDFGLALLLLAGLLGLLLGQSLQVKPLQVEPPEPVVAVALGASRQLTCRLACADRG
ASVQWRGLDTSLGAVQSDTGRSVLTVRNASLSAAGTRVCVGSCGGRTFQHTVQLL
VYAFPDQLTVSPAALVPGDPEVACTAHKVTPVDPNALSFSLLVGGQELEGAQALG
PEVQEEEEEPQGDDEVLFRVTERWRLPPLGTPVPPALYCQATMRLPGLELSHRQA
IPVLHSPTSPEPPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPESPDTTSPQEPDTTSPQEPDTTSPQEPD
TSPEPPDKTSPEPAPQQGSTHTPRSPGSTRTRRPEIQPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 107)**

下線：シグナルペプチド

太字：MadCAM細胞外ドメイン

【0174】

組換えタンパク質発現/精製：

CHO-DHFR細胞は、MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質cDNAを含むpCDNA3.1+ベクターでトランスフェクションされ、MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質を発現させる安定なクローンが、600 μ g/mL G418および100 ng/mL メトトレキセートを含むIscoveの培地において選択さ

10

20

30

40

50

れた。タンパク質発現のために、中空繊維バイオリアクターに、10% 低IgGウシ胎児血清(Gibco)、非必須アミノ酸(Gibco)、2 mM グルタミン(Gibco)、ピルビン酸ナトリウム(Gibco)、100 μ g/mL G418および100 ng/mL メトトレキサートを含むIscoveの培地においてMAdCAM-IgG₁ Fcを安定的に発現させるCHO細胞を蒔いた。MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーにより、収集された上清から精製された。簡単には、上清は、HiTrap Protein G Sepharose(5 mL, Pharmacia)カラムにかけられ(2 mL/min)、25 mM トリス pH 8、150 mM NaCl(5カラム容量)で洗浄され、100 mM グリシン pH 2.5で溶出されて(1 mL/min)、すぐに画分を1 M トリス pH 8でpH 7.5へ中和された。MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質を含む画分は、SDS-PAGEにより同定され、いっしょにプールされ、35 mM ビス-トリス pH 6.5、150 mM NaClであらかじめ平衡化されたSephacryl S100カラム(Pharmacia)にかけられた。ゲル濾過は0.35 mL/minで行われ、約3x5 mL画分においてMAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質のピークを収集した。これらの試料はプールされ、35 mM ビス-トリス pH 6.5であらかじめ平衡化されたResource Q(6 mL, Pharmacia)カラムにかけられた。カラムは、35 mM ビス-トリス pH 6.5、150 mM NaClの5カラム容量で洗浄され(6 mL/min)、MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質は、35 mM ビス-トリス pH 6.5、400 mM NaClで4~6 mL 画分へ溶出された。この段階において、タンパク質は90%純粋で、SDS-PAGEにより約68 kDでの単一バンドとして移動した。免疫原としての使用およびすべてのその後のアッセイ法のために、材料は、25 mM HEPES pH 7.5、1 mM EDTA、1 mM DTT、100 mM NaCl、50% グリセロールへと緩衝液交換され、-80℃でアリコートとして保存された。

【0175】

(ii)MAdCAMを安定的に発現させる細胞膜

公開されたMAdCAM配列(Shyjan AM, et al., J Immunol., 156, 2851-7 (1996))のヌクレオチド645位~1222位を含むSacI/NotI断片は、大腸cDNAライブラリーからPCR増幅され、pIND-Hygroベクター(Invitrogen)のSacI/NotI部位へクローニングされた。追加の5'コード配列を含むSacI断片は、pCDNA3.1 MAdCAM-IgG₁ Fcからのこの構築物へサブクローニングされ、完全長MAdCAM cDNAを生じた。MAdCAM cDNAを含むKpnI/NotI断片は、その後、pEF5FRTV5GWCATベクター(Invitrogen)における対応する部位へクローニングされ、CATコード配列を置換した。cDNA挿入断片は、配列確認され、製造会社の使用説明書に従って、FlpリコンビナーゼテクノロジーによりFlpIn NIH 3T3細胞(Invitrogen)において単一の安定的に発現させるクローンを作製するように、トランスフェクションに用いられた。安定的に発現させるクローンは、下に概略が説明されているが、 $\alpha_4\beta_7^+$ JYヒトBリンパ芽球腫細胞系(Chan BM, et al., J. Biol. Chem., 267:8366-70 (1992))の結合を支持するそれらの能力により選択された。MAdCAMを発現させるCHO細胞の安定なクローンは、FlpIn CHO細胞(Invitrogen)を用いて同様に調製された。

【0176】

MAdCAM発現FlpIn NIH-3T3細胞を、2 mM L-グルタミン、10% ドナー子ウシ血清(Gibco)および200 μ g/mL ハイグロマイシンB(Invitrogen)を含むダルベッコの改変イーグル培地(Gibco)で増殖させ、ローラーボトルで拡大した。MAdCAM発現FlpIn CHO細胞を、2 mM L-グルタミン、10% ドナー子ウシ血清(Gibco)および350 μ g/mL ハイグロマイシンB(Invitrogen)を含む、ハムのF12/ダルベッコの改変イーグル培地(Gibco)で増殖させ、ローラーボトルで拡大した。細胞は、非酵素的細胞解離溶液(Sigma)の使用および削り取りにより収集され、リン酸緩衝食塩水において遠心分離により洗浄した。細胞膜は、25 mM ビス-トリス pH 8、10 mM MgCl₂、0.015%(w/v) アプロチニン、100 U/mL バシトラシンにおけるポリトロンホモジナイゼーションおよび遠心分離の2ラウンドにより細胞ペレットから調製された。最終のペレットを同じ緩衝液に再懸濁し、50x10⁶個の細胞等価物を厚肉エッペンドルフへ等分し、>100,000gで回転させて、XenoMouseマウス免疫化のための細胞膜ペレットを生じた。上清はデカントされ、膜は、必要とされるまで-80℃でエッペンドルフ中で保存された。細胞膜におけるタンパク質発現の確認は、SDS-PAGE、およびMAdCAMのN末端残基([C]-KPLQVEPPEP)に対して産生されたウサギ抗ペプチド抗体でのウェスタンブロッティングにより測定された。

【0177】

免疫化およびハイブリドーマ作製：

週齢8～10週間のXENOMOUSE(商標)マウスは、精製された組換えMAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質(10 μg/用量/マウス)か、または安定的に発現させているMAdCAM-CHO細胞もしくはNIH 3T3細胞(10x10⁶細胞/用量/マウス)のいずれかから調製された細胞膜のいずれかで、腹腔内にまたはそれらの後部足蹠において免疫された。この用量は、3～8週間かけて5～7回、繰り返された。融合の4日前に、マウスは、PBS中のヒトMAdCAMの細胞外ドメインの最終注射を受けた。免疫化マウス由来の脾臓およびリンパ節リンパ球を、非分泌性骨髓腫P3-X63-Ag8.653細胞系と融合させ、以前に記載されているように(Galfre and Milstein, Methods Enzymol. 73:3-46 (1981))、HAT選択にかけた。MAdCAM特異的ヒトIgG₂κおよびIgG₄κ抗体を分泌するハイブリドーマすべてのパネルが回収され、サブクロニングされた。MAdCAMに特異的なモノクローナル抗体を産生する12個のハイブリドーマサブクローン、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、および9.8.2、が回収され、下記のアッセイ法で検出された。サブクローンハイブリドーマ系、1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、および9.8.2、が由来している親の系、1.7、1.8、6.14、6.22、6.34、6.67、6.73、6.77、7.16、7.20、7.26および9.8、はすべて抗MAdCAM活性を有した。

【0178】

ELISA法：

マウス血清およびハイブリドーマ上清における抗原特異的抗体の検出は、記載されているように(Coligan et al., Unit 2.1 "Enzyme-linked immunosorbent assays," Current Protocols in Immunology(1994))、抗体を捕獲しうるMAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質を用いるELISAにより測定された。MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質で免疫された動物について、抗体は、ヒトIgG₁に対する非特異的反応性について、およびFlpIn CHO MAdCAM細胞に結合しうる能力についてフローサイトメトリーによりスクリーニングされた。

【0179】

好ましいELISA法において、以下の技術が用いられる。

【0180】

ELISAプレートを、緩衝液(100 mM 炭酸/重炭酸ナトリウム緩衝液pH 9.6)を含むプレート内のMAdCAM-IgG₁ Fc融合(4.5 μg/mL)の100 μL/ウェルで4℃、一晚、コーティングした。インキュベーション後、コーティング緩衝液を除去し、プレートを200 μL/ウェルブロッキング緩衝液(リン酸緩衝食塩水中に5% BSA、0.1% ツイーン20)でブロックし、室温で1時間、インキュベートした。ブロッキング緩衝液を除去し、50 μL/ウェルのハイブリドーマ上清または他の血清もしくは上清(例えば、陽性対照)を室温で2時間、加えた。インキュベーション後、プレートをPBS(3x100 μL/ウェル)で洗浄し、ハイブリドーマモノクローナル抗体(mAb)の結合を、PBSに希釈されたHRP結合二次抗体(すなわち、IgG₂抗体について1:1000マウス抗ヒトIgG₂-HRP(SBカタログ番号9060-05)またはIgG₄抗体について1:1000マウス抗ヒトIgG₄-HRP(Zymedカタログ番号3840)で検出した。プレートを室温で1時間、インキュベートし、PBS中で洗浄し、最終的に、100 μL OPD(o-フェニレンジアミン(DAKO S2405))+5 μL 30% H₂O₂/12 mL)で発色させた。プレートを10～20分間、発色するようにさせておき、100 μL 2 M H₂SO₄で反応を停止した。プレートを490 nmで読み取った。

【0181】

接着アッセイ法：

MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質への結合をELISAにより実証した抗体は、α₄β₇⁺ JY細胞、および(i)MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質かまたは(ii)MAdCAM-CHO細胞のいずれかとの接着アッセイ法におけるアンタゴニスト活性について評価された。

【0182】

(i)MAdCAM-IgG₁ Fc融合アッセイ法

ダルベッコのPBS中の精製されたMAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質の4.5 μg/mL 溶液の10

0 μL を、96ウェルのBlack Microfluor "B"U底(Dynex #7805)へ4°Cで一晩、吸着させた。MadCAMコーティング化プレートをその後、10% BSA/PBS中で37°Cで少なくとも1時間、ブロッキングする前に、反転させて、余分な液体を取り去った。この時間中、培養されたJY細胞をトリパンブルー排除を用いて数え(約 8×10^5 細胞/mLであるはず)、 20×10^6 細胞/アッセイプレートを50 mL遠心分離管へピペティングした。JY細胞を、2 mM L-グルタミンおよび10% 熱不活性化ウシ胎児血清(Life Technologies #10108-165)を含むRPMI1640培地(Gibco)で培養し、培養物が分化するのを防ぐために2~3日ごとに $1 \sim 2 \times 10^5$ /mLで蒔いた。細胞を、2 mM L-グルタミン(Gibco)を含むRPMI 1640培地(Gibco)で遠心分離により2回、洗浄し、Calcein AM添加のためにRPMI 1640に 2×10^6 細胞/mLの最終細胞ペレットを再懸濁した。Calcein AM(molecular Probes #C-3099)を、DMSOにおいて1:200希釈(およそ最終濃度5 μM)として細胞へ加え、細胞をインキュベーション(37°Cで30 min)の過程において光から保護した。この細胞インキュベーション段階中、試験されるべき抗体は、以下のように希釈された。単一用量試験について、抗体は、PBS中0.1 mg/mL BSA(Sigma #A3059)においてに3 $\mu\text{g/mL}$ (1 $\mu\text{g/mL}$ 最終)へ作製された。完全 IC_{50} 曲線について、抗体は、3 $\mu\text{g/mL}$ (1 $\mu\text{g/mL}$ 最終)が最高濃度で、0.1 mg/mL BSA/PBSに希釈され、その後、プレートに渡って希釈を2倍(1:2比)にした。列の最後のウェルは、総結合を測定するために用いられ、それゆえ、PBS中0.1 mg/mL BSAが用いられた。

【0183】

ブロッキング後、プレート内容物をはじき飛ばし、50 μL の抗体/対照を各ウェルへ添加し、プレートを37°Cで20 min、インキュベートした。この時間中、Calcein添加JY細胞を、遠心分離により、10% ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地で1回、および1 mg/mL BSA/PBSで1回、洗浄し、最終細胞ペレットを1 mg/mL BSA/PBS中 1×10^6 /mLへと再懸濁した。100 μL の細胞をU底プレートの各ウェルへ添加し、プレートを密封し、短時間だけ遠心分離し(1000 rpm、2 min)、その後、プレートを37°Cで45 min、インキュベートした。この時間の終わりに、プレートをSkatronプレート洗浄装置で洗浄し、蛍光をWallac Victor² 1420 Multilabel Readerを用いて測定した(励起 λ 485 nm、通常の発光開口で0.1 sec、上面、プレートの底から8 mm、から発光 λ 535 nmカウント)。各抗体濃度について、パーセント接着は、非特異的結合に関連した蛍光を引いた、いずれの抗体も存在しない場合における最大蛍光応答のパーセンテージとして表された。 IC_{50} 値は、接着応答が、抗MadCAM抗体の非存在下における応答の50%まで減少している抗MadCAM抗体濃度として定義される。JY細胞のMadCAM-IgG₁ Fc融合体への結合を IC_{50} 値 <0.1 $\mu\text{g/mL}$ で阻害することができた抗体は、強いアンタゴニスト活性を有するとみなされ、MadCAM-CHO接着アッセイ法へと進められた。すべての12個の試験された抗体は、強いアンタゴニスト活性を示した(表3)。モノクローナル抗体1.7.2、1.8.2、7.16.6、7.20.5および7.26.4は、IgG₂ κ 系列由来であり、モノクローナル抗体6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、および9.8.2はIgG₄ κ 系列由来であった。

【0184】

(ii)MadCAM-CHO細胞接着アッセイ法

JY細胞は上のように培養された。MadCAM発現CHO細胞は、上記のように、pEF5FRT MadCAM cDNA構築物で、Flpリコンビナーゼテクノロジー(Invitrogen)を用いて作製された。MadCAM発現CHO細胞の単一の安定なクローンは、JY細胞の接着を支持するそれらの能力、およびMadCAMのN末端に対して産生されかつ上で記載されているウサギ抗ペプチド抗体のフローサイトメトリーによる結合に基づいて選択された。MadCAM発現CHO細胞は、2 mM L-グルタミン、10% ウシ胎児血清(Gibco)および350 $\mu\text{g/mL}$ ハイグロマイシンB(Invitrogen)を含むDMEM/F12培地(Gibco #21331-020)で培養され、2/3日間ごとに1:5に分割された。接着アッセイ法について、MadCAM発現CHO細胞は、200 μL 培地において96ウェル黒色プレート-透明底(Costar #3904)に 4×10^4 細胞/ウェルで蒔かれ、37°C/5% CO_2 で一晩、培養された。

【0185】

次の日、ハイブリドーマ上清または精製されたモノクローナル抗体を、上記のように、1 mg/mL BSA/PBSに30 $\mu\text{g/mL}$ (10 $\mu\text{g/mL}$ の最終濃度と等価)の出発濃度から希釈した。Mad

CAM CHOプレートについて、プレート内容物をはじき飛ばし、50 μ Lの抗体/対照を各ウェルへ添加し、プレートを37°Cで20 min、インキュベートした。列の最後のウェルは、総結合を測定するために用いられ、それゆえ、PBS中0.1 mg/mL BSAが用いられた。1 mg/mL BSA/PBSにおける 1×10^6 /mLの最終濃度へのCalcein AM添加JY細胞は、上のように調製され、その後、抗体との20 minインキュベーション時間後に100 μ Lが添加された。プレートを、その後、37°Cで45 min、インキュベートし、その後、Tecanプレート洗浄装置(PW 384)で洗浄し、上記のように、Wallacプレートリーダーを用いて蛍光を測定した。各抗体濃度について、パーセント接着は、非特異的結合に関連した蛍光を引いた、いずれの抗体も存在しない場合における最大蛍光応答のパーセンテージとして表された。JY細胞のMAdCAM CHO細胞への結合を IC_{50} 値 <1 μ g/mLで阻害することができた抗体は、強いアンタゴニスト活性を有するとみなされた。前述のように、 IC_{50} 値は、接着応答が、抗MAdCAM抗体の非存在下における応答の50%まで減少している抗MAdCAM抗体濃度として定義される。このアッセイ法における1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、および9.8.2についての IC_{50} 効力は、下の表3に記載されている。

【0186】

【表3】

クローン	MAdCAM IgG ₁ Fc 融合体		MAdCAM FlpIn CHO アッセイ法	
	平均 IC_{50} (μ g/mL)	n	平均 IC_{50} (μ g/mL)	n
1.7.2	0.030 $\pm$ 0.011	6	0.502 $\pm$ 0.280	9
1.8.2	0.027 $\pm$ 0.011	4	0.424 $\pm$ 0.107	8
7.16.6	0.019 $\pm$ 0.009	7	0.389 $\pm$ 0.093	16
7.20.5	0.025 $\pm$ 0.027	7	0.387 $\pm$ 0.202	9
7.26.4	0.021 $\pm$ 0.040	4	0.574 $\pm$ 0.099	15
6.14.2	0.011 $\pm$ 0.005	4	0.291 $\pm$ 0.096	6
6.22.2	0.018 $\pm$ 0.011	4	0.573 $\pm$ 0.168	7
6.34.2	0.013 $\pm$ 0.008	4	0.285 $\pm$ 0.073	7
6.67.1	0.013 $\pm$ 0.070	4	0.298 $\pm$ 0.115	8
6.73.2	0.020 $\pm$ 0.010	4	0.369 $\pm$ 0.103	8
6.77.1	0.022 $\pm$ 0.004	4	0.520 $\pm$ 0.100	4
9.8.2	0.020 $\pm$ 0.050	4	0.440 $\pm$ 0.342	8

IgG2

IgG4

例示された抗MAdCAM抗体の IC_{50} 値

【0187】

腸管付属リンパ組織に貢献する高内皮性細静脈上の微小血管環境を模倣するように設計されたずり応力条件下で、フローに基づいたアッセイ法において抗MAdCAMモノクローナル抗体のアンタゴニスト効力を測定するために、MAdCAMを発現させるCHO細胞をマイクロスライドガラス(50x4 mm)に蒔き、集密的な単層(約 2.5×10^5 細胞)を形成するように接着させておいた。その後、細胞を、フローアッセイ系へ接続される前に、濃度(0.1~10 μ g/mL)の範囲に渡ってアフィニティー精製されたモノクローナル抗体と37°Cで20 min、インキュベートした。アイソタイプ適合IgG₂またはIgG₄モノクローナル抗体(10 μ g/mL)が陰性対照として用いられた。正常なドナー末梢血リンパ球(PBL)を0.05 Paの一定のずり応力で細胞単層一面に灌流した。実験はビデオに撮られ、リンパ球の総接着(ローリング+常時接着)が計算された。試験されたモノクローナル抗体のすべては、記載された条件下で強いアンタゴニストであることが示された。

【0188】

(iii) スタンパー-ウッドラフ(Stamper-Woodruff)アッセイ法

MadCAM⁺脈管を可視化するために、ビオチン化抗MadCAMモノクローナル抗体を、製造会社の使用説明書に従って、リン酸緩衝食塩水におけるビオチン-NHS(Pierce)の20モル過剰を用いて1~2 mgのアフィニティー精製されたタンパク質上に作製した。反応を室温でそのままにさせておき(30 min)、PD-10(Pharmacia)カラムで脱塩し、タンパク質濃度を測定した。

【0189】

正常な肝臓リンパ節をドナー器官から取り出し、液体窒素中で急速凍結し、使用まで-70°Cで保存した。10 μm クリオスタット切片を切断し、ポリ-L-リシンでコーティングされたスライド上で空気乾燥させ、アッセイ法の前にアセトン中に固定した。切片を、アビジン-ビオチンブロッキングシステム(DAKO)を用いてブロッキングし、その後、室温で濃度(1~50 μg/mL)の範囲に渡って、ビオチン化抗MadCAMモノクローナル抗体とインキュベートした(2 hrs)。アイソタイプ適合IgG₂またはIgG₄モノクローナル抗体(50 μg/mL)が陰性対照として、ブロッキング抗β₇抗体(50 μg/mL)が陽性対照として用いられた。

【0190】

正常なドナーから採取された末梢血リンパ球は、その後の接着細胞の可視化を可能にするためにマウス抗ヒトCD2モノクローナル抗体(DAKO)で標識された。5x10⁵個のPBLを各リンパ節切片へ添加し、接着細胞の脱離を避けるように穏やかにすすぎ落とす前に30 mins、インキュベートした。その後、切片をアセトン中に再固定し、ビオチン化抗MadCAMモノクローナル抗体(10 μg/mL)と、続いてビオチン化ヤギ抗マウスモノクローナル抗体(CD2標識PBLおよび非染色MadCAM⁺脈管を認識するために)、およびその後、streptABcomplex/HRP(DAKO)と、再インキュベートした。最後に、MadCAM⁺脈管&CD2標識PBLを、切片へのDAB基質(DAKO)の添加により可視化したが、茶色の反応生成物が陽性染色の領域を示している。リンパ球接着は、門脈路、静脈または類洞の50個のMadCAM-1⁺脈管へのリンパ球接着の数を数えることにより定量された。データは、平均値として表されているのだが、その後、いずれの抗体も存在しない場合におけるPBLの接着を100%として用いて、パーセント接着に標準化された。データは、n=3の異なるPBLドナーに基づき、かつ異なる肝臓リンパ節ドナーについて、編集された。ビオチン化精製モノクローナル抗体1.7.2および7.16.6についての代表的なデータは、ブロッキング抗β₇抗体対照と比較して図4に描かれている。

【0191】

選択アッセイ法：

VCAMおよびフィブロネクチンは、MadCAMと近い構造的および配列相同体である。アフィニティー精製された抗MadCAMモノクローナル抗体は、MadCAM特異性について、α₄β₁⁺/α₅β₁⁺ジャーカットT細胞(ATCC)のそれらの同族細胞接着分子への結合を阻害するそれらの能力を測定することにより、評価された。フィブロネクチン細胞結合断片またはVCAMのダルベッコのPBSにおける4.5 μg/mL溶液の100 μLを96ウェルのBlack Microfluor "B" U底(Dynex #7805)へ4°Cで一晩、吸着させた。コーティングされたプレートその後、10% BSA/PBS中で37°Cで少なくとも1時間、ブロッキングする前に、反転させて、余分な液体を取り去った。この時間中、培養されたジャーカットT細胞をトリパンブルー排除を用いて数え、上のJY細胞について前に記載されているように、Calcein AM色素を添加した。試験されるべき抗体は、PBS中の0.1 mg/mL BSAにおける10 μg/mLの最高濃度から希釈された。列の最後のウェルは、総結合を測定するために用いられ、それゆえ、PBS中0.1 mg/mL BSAが用いられた。PBS中に調製されたエチスタチン(Bachem、カタログ番号H-9010)は、α₅β₁/フィブロネクチン相互作用をブロックするために100 nMの最高濃度で用いられた。1 μg/mLの最高濃度での抗CD106モノクローナル抗体(Clone 51-10C9、BD Pharmingenカタログ番号555645)がα₄β₁/VCAM相互作用をブロックするために用いられた。

【0192】

ブロッキング後、プレート内容物をはじき飛ばし、50 μLの抗体/対照を各ウェルへ添加し、プレートを37°Cで20 min、インキュベートした。Calcein添加ジャーカットT細胞を

、前述のように、1回、洗浄し、最終細胞ペレットを1 mg/mL BSA/PBS中 1×10^6 /mLへと再懸濁した。100 μ Lの細胞をU底プレートの各ウェルへ添加し、プレートを密封し、短時間だけ遠心分離し(1000 rpm、2 min)、その後、プレートを37°Cで45 min、インキュベートした。この時間の終わりに、プレートをSkatronプレート洗浄装置で洗浄し、蛍光をWallac Victor² 1420 Multilabel Readerを用いて測定した(励起 λ 485 nm、通常の発光開口で0.1 sec、上面、プレートの底から8 mm、から発光 λ 535 nmカウント)。各抗体について、阻害の程度は、下の表4に絵で表されている(－接着の無視できる阻害、***接着の完全な阻害)。例示されたすべてのモノクローナル抗体は、強力かつ選択的な抗MAdCAMアンタゴニストであり、MAdCAMに対して、VCAMおよびフィブロネクチンと比較して実質的に100倍より大きい選択性を実証した。

10

【0193】

【表4】

クローン	$\alpha 5\beta 1$ /フィブロネクチン アッセイ法における阻害 (10 μ g/mL)	$\alpha 4\beta 1$ /VCAM アッセイ 法における阻害 (10 μ g/mL)	$\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM アッセイ法における阻害 (0.1 μ g/mL)
1.7.2	-	-	***
1.8.2	-	-	***
7.16.6	-	-	***
7.20.5	-	-	***
7.26.4	-	-	***
6.14.2	-	-	***
6.22.2	-	-	***
6.34.2	-	-	***
6.67.1	-	-	***
6.73.2	-	-	***
6.77.1	-	-	***
9.8.2	-	-	***

20

IgG2
IgG4

30

他の細胞接着分子、フィブロネクチンおよびVCAMと比較した、MAdCAMに対する抗MAdCAM抗体の相対的な選択性

【0194】

以下の寄託番号のハイブリドーマは、CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JGにおけるEuropean Collection of Cell Cultures(ECACC), H.P.Aに2003年9月9日に寄託された。

【0195】

<u>ハイブリドーマ</u>	<u>寄託番号</u>
1.7.2	03090901
1.8.2	03090902
6.14.2	03090903
6.22.2	03090904
6.34.2	03090905
6.67.1	03090906
6.73.2	03090907
6.77.1	03090908
7.16.6	03090909
7.20.5	03090910
7.26.4	03090911
9.8.2	03090912

10

20

【0196】

実施例II：BIAcoreによる、完全ヒト抗MadCAMモノクローナル抗体の親和性定数(K_d)の測定

本発明者らは、製造会社のプロトコールに従って、BIAcore 3000装置を用いる表面プラズモン共鳴により精製抗体の親和性測定を行った。

【0197】

プロトコール1

動態解析を行うために、CM5 BIAcoreセンサーチップ上の高密度マウス抗ヒト(IgG₂およびIgG₄)抗体表面が日常的なアミンカップリングを用いて調製された。ハイブリドーマ上清は、100 μ g/mL BSAおよび10 mg/mL カルボキシメチルデキストランを含むHBS-P(10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、0.005% Surfactant P20)ランニング緩衝液に、10倍、5倍、2倍希釈された、または希釈せずに用いられた。各モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体ベースラインの安定化のために1 min接触時間および5 min洗浄を用いて別々の表面上へ捕獲された。MadCAM-IgG₁ Fc(141 nM)融合タンパク質を、その後、表面全体において1分間、注入し、続いて、3 min、解離させた。データは、各表面上に捕獲された抗体の量について標準化され、BIAcoreにより提供されたBIAevaluationソフトウェア上で利用可能なベースラインドリフトモデルを用いて、広域適合(global fit) ラングミュア1:1で評価された。

30

【0198】

プロトコール2

アフィニティー精製されたモノクローナル抗体は、アミンカップリングを用いて、CM5 バイオセンサーチップのデキストラン層上へ固定化された。チップは、固定化緩衝液としてpH 4.5 酢酸緩衝液を用いて調製され、2.5~5.5 kRUのタンパク質密度が達成された。ランニング緩衝液におけるMadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質の試料は、0.2~55 nMの範囲である濃度で調製された(ランニング緩衝液のみを含む0 nM 溶液は、ゼロ参照として含まれた)。試料は、ランダム化され、ランニング緩衝液としてHBS-EP(10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P20)を用いて、4フロー細胞に渡って、それぞれ、3 min、二連で注入された。100 μ L/minの流速が、物質輸送制限を最小限にするために用いられた。MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質の解離は、180 mins、モニターされ、表面は、25 mM H₃PO₄(50 μ L/min)、10 mM(6.22.2)、20 mM(6.67.1、6.73.2、6.77.1)~25

40

50

mM(6.34.2)、および45 mM NaOH(6.14.2)の6 sec注入により再生され、データは、BIAevaluation(v3.1)ソフトウェアパッケージを用いて解析された。

【0199】

表5は、本発明の代表的な抗MadCAM抗体についての親和性測定を列挙している。

【0200】

【表5】

クローン	プロトコール1			プロトコール2		
	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
1.7.2	2.4×10^5	1×10^{-5}	42	5.5×10^3	1.3×10^{-7}	23.6
1.8.2	2.9×10^5	1×10^{-5}	35	1.8×10^5	2.3×10^{-5}	128
7.16.6	1.5×10^6	2.2×10^{-6}	1.5	2.9×10^5	1.4×10^{-6}	4.8
7.20.5	4.5×10^5	1.9×10^{-5}	42.2	1.6×10^5	1.2×10^{-5}	75
7.26.4	9.6×10^5	2.6×10^{-4}	271	1.5×10^5	1.2×10^{-5}	80
6.14.2	1.3×10^5	1×10^{-5}	7.7	5×10^5	$< 5 \times 10^{-6}$	< 10
6.22.2	1.5×10^6	1.4×10^{-5}	9.3	2.3×10^5	8.7×10^{-7}	3.8
6.34.2	1.2×10^6	1.9×10^{-5}	15.8	3.3×10^5	$< 5 \times 10^{-6}$	< 15
6.67.1	5.9×10^5	1×10^{-5}	17	2.4×10^5	$< 5 \times 10^{-6}$	< 20
6.73.2	1.4×10^5	1.3×10^{-4}	93			
6.77.1	1.5×10^5	1×10^{-5}	6.7			
9.8.2	2.3×10^6	2.3×10^{-4}	100	4.4×10^5	1.4×10^{-5}	32.5

IgG2
IgG4

表面プラズモン共鳴(BIAcore)による親和性定数、 K_d 、の測定

【0201】

動態解析は、本発明に従って調製された抗体が、MadCAMの細胞外ドメインに対して高親和性および強い結合定数を有することを示している。

【0202】

実施例III：

抗MadCAMモノクローナル抗体のエピトープ選択性および種交差反応性の同定

抗体は、線状(一次)配列または構造(二次)配列の領域としての抗原上の表面露出エピトープを認識する。Luminexエピトープビニング(binning)、BIAcoreビニングおよび種免疫組織化学的分析が、抗MadCAM抗体の機能性エピトープ景観を定義するために、合わせて用いられた。

【0203】

Luminexに基づいたエピトープビニング

MxhlgG2,3,4-結合ビーズ(Calbiochem M1 1427)を未知の一次抗MadCAM抗体ヘカップリングさせた。未知の一次抗体希釈液(ハイブリドーマ培地に希釈された $0.1 \mu\text{g/mL}$)の $150 \mu\text{L}$ を96ウェルの組織培養プレートのウェルヘ添加した。ビーズストックを穏やかにボルテックスし、上清において 0.5×10^5 ビーズ/mLの濃度ヘ希釈した。ビーズを上清において、振盪機上、 4°C 、暗闇で一晩、インキュベートした。

【0204】

96ウェルマイクロタイターフィルタープレート(Millipore #MABVN1250)の各ウェルを、 $200 \mu\text{L}$ 洗浄緩衝液(0.05% ツイーン20を含むPBS)を加えることによりあらかじめ湿らせ、吸引により除去した。次に、 0.5×10^5 ビーズ/mLストックの $50 \mu\text{L}$ /ウェルをフィルタープレートヘ加え、ウェルを洗浄緩衝液($2 \times 100 \mu\text{L}$ /ウェル)で洗浄した。ハイブリドーマ培

地に希釈されたMadCAM-IgG₁ Fc抗原(0.1 μg/mL)の60 μL/ウェルを加えた。プレートを覆い、室温で穏やかに振盪させながら、1時間、インキュベートした。ウェルを、100 μL/ウェル 洗浄緩衝液の添加により2回洗浄し、続いて吸引した。次に、ハイブリドーマ培地に希釈された未知の二次抗MadCAM抗体(0.1 μg/mL)の60 μL/ウェルを加えた。プレートを室温で暗闇において2時間、振盪させた。次に、ウェルを、100 μL/ウェル 洗浄緩衝液の添加により2回洗浄し、続いて吸引した。次に、ビオチン化MxhIgG2,3,4(0.5 μg/mL)の60 μL/ウェルを加えた。プレートを室温で暗闇において1時間、振盪させた。ウェルを、100 μL/ウェル 洗浄緩衝液の添加により2回洗浄し、続いて吸引した。各ウェルへ、ハイブリドーマ培地に希釈された1 μg/mL MxhIgG2,3,4ストレプトアビジン-PE(Pharmacia #554061)の60 μLを加えた。プレートを室温で暗闇において20分間、振盪させた。ウェルを、100 μL/ウェル 洗浄緩衝液の添加により2回洗浄し、続いて吸引した。次に、各ウェルを、80 μL/ウェル ブロッキング緩衝液(0.5% ウシ血清アルブミン、0.1% ツイーンおよび0.01% チメロサルを含むPBS)に、ビーズを再懸濁させるように入念に上下にピペティングして、再懸濁させた。

10

【0205】

Luminex 100およびその添付のソフトウェア(Luminex(登録商標) Corporation)を用いて、プレートをルミネセンス読み取りを決定するように読み取った。試験された様々な抗MadCAM抗体について得られたルミネセンスデータに基づいて、抗MadCAM抗体をそれらの結合特異性により分類した。試験された抗MadCAM抗体は、表8に示された、一連のエピトープビンに分類される。

20

【0206】

BIAcoreビニング：

上で記載されたものと類似した方法において、BIAcoreもまた、本発明により例示された抗MadCAM抗体のエピトープ排他性を決定するために用いられた。9つの抗MadCAM抗体クローン6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.77.1、7.20.5、9.8.2、1.7.2、7.26.4、および7.16.6は、アミンカップリングを用いてCM5バイオセンサーチップの別々のフローセルのデキストラン層上へ固定化された。固定化緩衝液は、10 mM 酢酸緩衝液pH 4.5(クローン6.22.2、6.34.2、7.20.5、9.8.2、1.7.2、7.26.4および7.16.6)かまたは10 mM 酢酸緩衝液pH 5.5(クローン6.67.1および6.77.1)のいずれかであった。約3750 RUのタンパク質密度がすべての場合において達成された。反応していないN-ヒドロキシスクシンイミドの不活性化は、1 M 塩酸エタノールアミン、pH 8.5を用いて行われた。

30

【0207】

MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質は、HBS-EPランニング緩衝液(0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% Polysorbate 20)に1.5 μg/mL(約25 nM)の濃度へ希釈された。それは、その後、5 μL/minの速度で50 μLの容量において、第一フローセルに渡って注入された。注入が完了した後、第一抗体プローブが、同じフローセルへ添加された。すべての試験抗体は、HBS-EPにおいて約20 μg/mLの濃度へ希釈され、また、5 μL/minの流速で50 μLの容量において注入された。試験抗体の結合が観察されなかった場合、次の試験クローンがすぐ後に注入された。結合が生じた場合、センサー表面は、MadCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質および試験抗体の両方を除去するように再生された。様々な再生溶液は、固定化抗体および存在する試験抗体に依存して用いられた。用いられる再生条件の概要は、表6に描かれている。

40

【0208】

【表 6】

固定化抗体	除去されるべき抗体プローブ	再生溶液	注入容量
7.16.6	6.22.2	40 mM リン酸	20 μ L
	6.34.2	40 mM リン酸	40 μ L
	7.20.5	40 mM リン酸	20 μ L
6.77.1	9.8.2	40 mM リン酸	10 μ L
	1.7.2	40 mM リン酸	5 μ L
	7.16.6	40 mM リン酸	10 μ L
1.7.2	6.77.1	25 mM リン酸	5 μ L
	9.8.2	25 mM リン酸	5 μ L
	7.20.5	25 mM リン酸	5 μ L
	6.22.2	25 mM リン酸	5 μ L
	6.34.2	25 mM 水酸化ナトリウム	5 μ L
	6.67.1	25 mM 水酸化ナトリウム	5 μ L
6.22.2	9.8.2	25 mM 水酸化ナトリウム	20 μ L
	7.26.4	25 mM 水酸化ナトリウム	5 μ L
6.34.2	9.8.2	25 mM 水酸化ナトリウム	70 μ L
	1.7.2	40 mM 水酸化ナトリウム	5 μ L
	7.26.4	40 mM 水酸化ナトリウム	5 μ L
6.67.1	9.8.2	40 mM 水酸化ナトリウム	5 μ L
	1.7.2	40 mM 水酸化ナトリウム	5 μ L
7.20.5	9.8.2	25 mM リン酸	5 μ L
	1.7.2	25 mM リン酸	5 μ L
	7.26.4	25 mM リン酸	5 μ L
7.26.4	9.8.2	40 mM 水酸化ナトリウム	20 μ L
	6.22.2	75 mM リン酸	20 μ L
	7.20.5	75 mM リン酸	20 μ L
	7.16.6	75 mM リン酸	20 μ L
9.8.2	9.8.2	25 mM リン酸	15 μ L
	6.22.2	25 mM リン酸	10 μ L
	7.20.5	25 mM リン酸	20 μ L
	7.16.6	25 mM リン酸	10 μ L

BIACoreエピトープマッピングを行うために用いられた再生条件の概要
(流速は、すべての再生手順中、50 μ L/minであった)

【0209】

再生後、MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質を再び、結合させ、さらなる試験抗体を注入した。これらの手順は、クローンのパネル全体が、結合したMAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質を有する固定化抗体の表面一面に注入されるまで、実行された。異なる固定化抗体および結合したMAdCAMを含む新しいフローセルは、その後、9つの試験クローンで探索するために用いられた。抗MAdCAM抗体1.7.2および1.8.2は、それらの重鎖および κ 軽鎖、それぞれ、SEQ ID NO:2、4、6、8、の近い一次アミノ酸配列相同性に基づいて、同じMAdCAMエピトープを認識することが予想された。従って、1.7.2のみが、BIACore応答マトリックスを通して評価された。抗体6.14.2および6.73.2は、この分析から除外されたが、抗MAdCAM抗体ペアのすべての他の組み合わせは、このように試験された。100 RUの任意レベルが、結合/非結合の間の閾値として選択され、応答マトリックス(表7)は、結合が観察されたかどうかに基づいて作成された。

【0210】

【表 7】

固定化抗体	二次抗体								
	6.22.2	6.34.2	6.67.1	6.77.1	7.20.5	9.8.2	1.7.2	7.26.4	7.16.6
6.22.2	-	-	-	-	-	X	X	X	X
6.34.2	-	-	-	-	-	X	X	X	X
6.67.1	-	-	-	-	-	X	X	-	-
6.77.1	-	-	-	-	-	X	X	-	X
7.20.5	-	-	-	-	-	X	X	X	X
9.8.2	X	X	X	X	X	X	-	-	X
1.7.2	X	X	X	X	X	X	-	-	X
7.26.4	X	X	-	-	X	X	-	-	X
7.16.6	X	X	-	-	X	-	-	-	X

10

BIACoreエピトープビニング応答マトリクス

抗体ペアのすべての組み合わせについての応答マトリクス。-は、抗体プローブの結合なしを示す、xは、結合が観察されたことを示す(100 RUの選択された閾値レベルより上)。

【0 2 1 1】

表7におけるマトリクス対角線(斜線を施された灰色)は、同一のプローブペアについての結合データを有する。すべての例において、2つのクローン7.16.6および9.8.2を除き、抗体は自己ブロッキングされた。抗体7.16.6および9.8.2は、交差競合しない。自己ブロッキングの欠如は、モノクローナル抗体のMAdCAM-IgFc上の第二部位への追加の結合を可能にする、モノクローナル抗体に引き起こされた融合タンパク質における立体構造的変化のためでありうると思われる。

20

【0 2 1 2】

同じ反応性パターンを示すクローンを分類することにより、図表示、図5、に示されているように、少なくとも6つの異なるエピトープピンが生じる。

【0 2 1 3】

抗MAdCAM抗体が相互作用するMAdCAMエピトープ配列のさらなる正確な同定は、限定されるわけではないが、スポットされたペプチドライブラリーアレイのウェスタン分析(Reinke et al., Curr. Topics in Microbiol. and Immunol 243:23-36 (1999), M. Famulok, E-L Winnacker, C-H Wong eds., Springer-Verlag, Berlin)、ファージもしくは細菌フラジェリン/fliC発現ライブラリーディスプレイ、または制限タンパク分解後の結合したタンパク質断片の単純MALDI-TOF分析を含むいくつかの方法のいずれかにより測定されうる。

30

【0 2 1 4】

免疫組織化学的アッセイ法：

回腸(パイエル板)、腸間膜リンパ節、脾臓、胃、十二指腸、空腸および結腸のOCTまたはショ糖包埋凍結組織検体は、抗MAdCAMモノクローナル抗体についての陽性染色対照として用いられた。ヒト切片をヒトIgG₂モノクローナル抗体で染色するために、抗MAdCAMモノクローナル抗体のビオチン化誘導体が作製された。10 μmの凍結組織切片は、ポリL-リシンでコーティングされたスライド上で切断され、100% アセトン、4°C(10 min)、その後メタノール中3% 過酸化水素(10 min)へ直接的に置かれ、段階の間、PBSで洗浄された。スライドを、PBS中での一次抗体(1:100~1:1000)とのインキュベーション(1 hr)の前にBiotin Blocking System(DAKOカタログ番号X0590)でブロッキングし、PBS-ツイーン20(0.05%)で洗浄し、その後、結合をHRP-ストレプトアビジン(BD Bioscienceカタログ番号550946、30 min)およびDAB基質(Sigmaカタログ番号D5905)で発色させた。IgG₄モノクローナル抗体について、HRP結合のマウス抗ヒトIgG₄(Zymedカタログ番号3840)二次抗体が用いられた。スライドは、マイアーのヘマラムで対比染色され(1 min)、洗浄され、その後、DPXに載せられた。

40

50

【0215】

結合親和性は、いくつかの種(マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、カニクイザルおよびヒト組織)について比較された。免疫組織化学によりラット、ウサギおよびブタ組織に対する反応性はなく、ELISAにより分析された場合、組換えマウスMAdCAMに対する抗MAdCAM抗体の交差反応性はなかった。ヒト、カニクイザルおよびイヌ組織についてのデータは、表形式、下の表8に示されている。

【0216】

【表8】

クローン	Luminex ピン	IHC 交差反応性			
		ヒト	カニクイザル	マーモセット	イヌ
		回腸	回腸	回腸	回腸
1.7.2	3a				
1.8.2	3a				
7.16.6	3b				
7.20.5	2b			n.d	
7.26.4	3b			n.d	
6.14.2	2			n.d	
6.22.2	2			n.d	
6.34.2	6			n.d	
6.67.1	5			n.d	
6.73.2	3		n.d	n.d	
6.77.1	1			n.d	
9.8.2	3a		n.d		

IgG2	結合なし
IgG4	結合
	n.d: 測定されず

抗MAdCAM抗体のMAdCAM種 オースログへの交差反応性のパターン

【0217】

特定化された内皮構造およびリンパ組織への抗MAdCAM結合は、そのキーに従って、濃淡により示されている。Luminexエピトープ分析に基づいたエピトープピンおよびMAdCAM交差反応性のパターンは、各抗体について示されている。フォント文字における違いにより示されているように、抗MAdCAM抗体6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.3および6.77.1について(イタリック体)のLuminexエピトープピニングデータは、1.7.2、1.8.2、7.16.6、7.20.5、7.26.4、および9.8.2について(太字)のものとは別の実験由来であった。

【0218】

試験されたすべての抗MAdCAM抗体は、胃腸管の脈管内皮区画上に発現されたヒトMAdCAMエピトープを認識する能力を有した。1.7.2および1.8.2は別として、試験されたすべての他の抗MAdCAM抗体は、カニクイザルの胃腸管の脈管内皮区画と特異的に結合することができた。特定の他の抗MAdCAM抗体、すなわち、6.14.2および6.67.1、はまたカニクイザルMAdCAMに加えて、イヌMAdCAMオースログを特異的に認識する能力を有した。

【0219】

機能活性のあるキメラのカニクイザル/ヒトMAdCAM発現CHO細胞系の作製：

特定の抗MAdCAM抗体のヒトおよびカニクイザルMAdCAMに対する結合親和性における差が、この観察についての構造的基盤が構成されうるかどうかを決定させた。

【0220】

マカクMAdCAMについての公開されたアミノ酸配列に基づいて(Shyjan AM, et al., J Immunol., 156, 2851-7 (1996))、プライマーは、カニクイザルMAdCAM $\alpha_4\beta_7$ 結合ドメイン配列をPCR増幅するように設計された。全RNAは、Trizol方法(Invitrogen)を用い、製造会社の使用説明書に従って、凍結した切除されたカニクイザル腸間膜リンパ節(約200 mg)か

ら調製された。1~2 μ gは、オリゴ-dTプライミングされ、AMV逆転写酵素(Promega)で逆転写された。ある割合の逆転写産物は、フォワードプライマー

5'-AGC ATG GAT CGG GGC CTG GCC-3' (SEQ ID NO: 67)

およびリバースプライマー

5'-GTG CAG GAC CGG GAT GGC CTG-3' (SEQ ID NO: 68)

で1 M GC melt(Clontech)におけるGC-2ポリメラーゼを用いる、62°Cのアニール温度でのPCRにかけられた。適切なサイズのRT-PCR産物が切除され、電気泳動後1% アガロースゲルから精製され、pCR2.1のEcoRI部位間をTOPO-TAクローニング(Invitrogen)された。挿入断片は、配列確認された。ヌクレオチドおよび推定の翻訳されたアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NO:49および50に示されている。 10

【0221】

$\alpha_4\beta_7$ 結合ドメインについての推定のヒトおよびカニクイザルのMAdCAMアミノ酸配列は、整列された場合(図3はこの配列アラインメントを提供する)、高程度の配列同一性(90.8%)を示す。表8により示された抗MAdCAM結合パターンを模倣する機能活性のあるカニクイザルMAdCAM発現細胞系を作製するために、pCR2.1におけるカニクイザル $\alpha_4\beta_7$ 結合ドメイン配列に対応するSacI断片を、上で記載された、カルボキシル末端のムチン柄および膜貫通ドメインを含むC末端ヒトMAdCAM pIND-Hygro構築物へ直接的にサブクローニングした。配列および配向は検証され、その後、KpnI/NotI断片が、CATコード配列を置換して、pEF5 FRTV5GWCATベクター(Invitrogen)へクローニングされ、Flp In CHO細胞(Invitrogen)において、製造会社の使用説明書に従って、単一の安定に発現させるクローンを作製するようにトランスフェクションに用いられた。 20

【0222】

カニクイザル/ヒトMAdCAMキメラを発現させるCHO細胞への抗MAdCAM抗体クローンの結合は、フローサイトメトリーにより評価され、抗MAdCAM抗体の機能活性は、上で記載されたものと非常に類似したJY細胞接着アッセイ法を用いて測定された。抗MAdCAM抗体の結合および機能活性は、表9に表されている。

【0223】

【表9】

クローン	機能性 IC ₅₀ (μ g/mL)	FACS 結合	
		ヒト	カニクイザル/ヒト
1.7.2	不活性		
1.8.2	不活性		
7.16.6	0.72		
7.20.5	0.62		
7.26.4	0.96		
6.14.2	0.53		
6.22.2	0.83		
6.34.2	0.47		
6.67.1	0.75		
6.73.2	不活性		
6.77.1	0.64		
9.8.2	0.83		

IgG2	結合なし
IgG4	結合

一連の抗MAdCAM抗体についての、カニクイザル/ヒトMAdCAM-CHO/JY接着アッセイ法におけ 50

る機能活性と、FACSにより測定された場合のヒトおよびカニクイザル/ヒトMAdCAM CHO細胞結合との間の相関

【0224】

総合すれば、組換え細胞に基づいた結合に関して、免疫組織化学により検出されるような(表8)、ヒトまたはカニクイザルMAdCAMと結合する与えられた抗MAdCAM抗体の能力と、機能活性(表9)の間に良い相関がある。例えば、抗MAdCAM抗体1.7.2、1.8.2および6.73.2は、カニクイザル組織およびキメラのカニクイザル/ヒトMAdCAMタンパク質を発現させる細胞への結合の一貫した欠如を示した。抗MAdCAM抗体1.7.2、1.8.2および6.73.2はまた、カニクイザル/ヒトMAdCAM/JY接着アッセイ法において機能的なブロッキング活性を検出する能力を有しなかった。

10

【0225】

類似したアプローチは、イヌMAdCAMを認識する抗MAdCAM抗体6.14.2および6.67.1のエピトープを限定するために用いられうる。

【0226】

実施例IV：

疾患診断方法として、循環可溶性MAdCAMの検出における抗MAdCAMモノクローナル抗体の使用

抗MAdCAM抗体は、循環可溶性MAdCAM(sMAdCAM)の検出のために用いられうる。臨床的血漿、血清試料、または限定されるわけではないが、便、尿、痰のような他の生物流体におけるsMAdCAMの検出は、限定されるわけではないが、炎症性腸疾患を含む潜在する疾患についての有用な代理の疾患バイオマーカーである可能性が高い。

20

【0227】

エピトープマッピングデータ(表7および8)に基づいて、抗MAdCAM抗体1.7.2および7.16.6は、ヒトMAdCAM上の異なるエピトープを認識するように思われる。ELISAプレートを、リン酸緩衝食塩水(PBS)における1.7.2の50 $\mu\text{g/mL}$ 溶液の100 μL /ウェルで4°Cで一晩、コーティングした。インキュベーション後、プレートを、10% ミルクを含むPBSブロッキング緩衝液(200 μL /ウェル)で1.5時間、ブロッキングした。インキュベーション後、プレートをPBS(2x100 μL /ウェル)で洗浄し、100 μL の最終容量への、PBS中50 $\mu\text{g/mL}$ の最高濃度から約5 ng/mL に至るまでのMAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質の段階希釈液を、室温での2時間のインキュベーション間、プレートへ添加した。類似したアプローチにおいて、MAdCAM-IgG₁ Fcタンパク質を血漿もしくは血清、または何か他のそのような関連した生物流体に希釈されて、下記のように、臨床試料において可溶性MAdCAMの発現を測定するために用いられうる。陰性対照として、緩衝液のみを、一次抗MAdCAM抗体を含むウェルへ添加した。この後、プレートをPBS(3x100 μL /ウェル)で洗浄し、その後、プレートをAlexa488標識7.16.6(100 μL 、5 $\mu\text{g/mL}$)と暗闇でインキュベートした。Alexa488標識7.16.6は、市販されているキット(Molecular Probe, A-20181)を用いて製造会社のプロトコールに従って作製された。

30

【0228】

プレートを、0.05% ツイーン-20を含むPBSで洗浄し、標識7.16.6の捕獲された可溶性MAdCAMへの結合を、蛍光を測定することにより(Wallac Victor² 1420 Multilabel Reader、励起 λ 485 nm、通常の発光開口で0.1 sec、上面、プレートの底から3 mm、から発光 λ 535 nmカウント)、決定された。蛍光を、MAdCAM-IgG₁ Fc融合タンパク質の濃度の関数としてプロットする場合(図6)、それは、1.7.2および標識7.16.6が、生物流体または臨床試料において発現された循環可溶性MAdCAMのレベルを測定する診断的目的のために用いられうることを示している。このサンドイッチELISAアプローチは、1.7.2および7.16.6の使用に限定されず、表7および図5のデータならびに解釈により概略を示されているように、MAdCAM上の異なるエピトープを認識する抗MAdCAM抗体の任意の組み合わせである。類似したストラテジーは、記載された他の抗MAdCAM抗体で、異なるパートナー、変異体、標識などを用いる、免疫組織化学およびウェスタンブロットのような類似したアッセイ法の開発に適用されうると思われる。

40

50

【0229】

実施例V:

本発明に従って調製された抗MadCAMモノクローナル抗体のアミノ酸構造

以下の考察において、本発明に従って調製された抗MadCAMモノクローナル抗体に関連した構造情報が提供されている。

【0230】

本発明に従って作製されたモノクローナル抗体の構造を分析するために、特定のハイブリドーマクローンからの重鎖および軽鎖断片をコードする遺伝子をクローニングした。遺伝子クローニングおよびシーケンシングは以下のように成し遂げられた。

【0231】

ポリ(A)+ mRNAは、Fast-Trackキット(Invitrogen)を用いて免疫されたXenoMouseマウス由来の約 2×10^5 個のハイブリドーマ細胞から単離された。ランダムにプライミングされたcDNAの生成後、続いてPCRを行った。ヒトVHもしくはV κ ファミリー特異的プライマー(Markset al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes"; Eur. J. Immunol., 21, 985-991 (1991))、またはユニバーサルヒトVHプライマー、MG-30

(5'-CAG GTG CAG CTG GAG CAG TCI GG-3 (SEQ ID NO: 108)

は、ヒトC γ 2、MG40-d

(5'-GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA-3 (SEQ ID NO: 109)

もしくはC γ 4定常領域、MG-40d

(5'GCT GAG GGA GTA GAG TCC TGA GGA CTG T -3 (SEQ ID NO: 110)

またはC κ 定常領域(h κ P2; Green et al., 1994に前に記載されているような)に特異的なプライマーと共に用いられた。ハイブリドーマからのヒトモノクローナル抗体由来重鎖および κ 鎖転写産物の配列は、上記のプライマーを用いてポリ(A+)RNAから作製されたPCR産物の直接的シーケンシングにより得られた。PCR産物は、TOPO-TAクローニングキット(Invitrogen)を用いてpCR2.1へクローニングされ、両方の鎖は、PrismダイターミネーターシーケンシングキットおよびABI 377シーケンシング装置を用いてシーケンシングされた。すべての配列は、"V BASE配列ディレクトリ"(Tomlinson, et al., J. Mol. Biol., 227, 776-798 (1992); Hum. Mol. Genet., 3, 853-860 (1994); EMBO J., 14, 4628-4638 (1995))へのアラインメントにより解析された。

【0232】

さらに、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-modのそれぞれは、完全長DNAシーケンシングにかけられた。そのために、全RNAを、RNeasyキット(Qiagen)を用いて約 $3 \sim 6 \times 10^6$ 個のハイブリドーマ細胞から単離した。mRNAをオリゴdTおよびAMVに基づいた逆転写酵素系(Promega)を用いて逆転写した。V BASEは、表10に描かれているような特定の重鎖および κ 鎖についての、最適なコザック配列およびATG開始コドン(下線を引いた)を含む5'特異的増幅プライマー、ならびに3'リバースプライマーを設計するために用いられた。

【0233】

【表 10】

	オリゴ配列
VH1-18	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATCCTT 3' (SEQ ID NO: 70)
VH3-15	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGATT 3' (SEQ ID NO: 71)
VH3-21	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAACTGGGGCTCCGCTGGGTT 3' (SEQ ID NO: 72)
VH3-23	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTT 3' (SEQ ID NO: 73)
VH3-30	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTT 3' (SEQ ID NO: 74)
VH3-33	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTT 3' (SEQ ID NO: 75)
VH4-4	5' TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTC 3' (SEQ ID NO: 76)
A2/A3	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTG 3' (SEQ ID NO: 77)
A26	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGTTGCCATCACAACCTCATTGGG 3' (SEQ ID NO: 78)
B3	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGTGTTCAGACCCAGGTCTTC 3' (SEQ ID NO: 79)
O12	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG 3' (SEQ ID NO: 80)
O18	5' TATCTAAGCTTCTAGACCCGGGCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAG 3' (SEQ ID NO: 81)

10

20

	オリゴ配列
	81)
RevIgG2	5'-TTCTCTGATCAGAATTCTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG 3' (SEQ ID NO: 82)
RevIgG4	5'-TTCTTTGATCAGAATTCTCACTAACACTCTCCCTGTTGAAGC 3' (SEQ ID NO: 83)
RevKappa	5'-TTCTCTGATCAGAATTCTATCATTTACCCAGAGACAGGGAGAG 3' (SEQ ID NO: 84)
6.22.2VK_F1	5'-GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACC CTC ACC ATC AAT AGC CTG GAA GC-3' (SEQ ID NO: 85)
6.22.2VK_R1	5'-GCT TCC AGG CTA TTG ATG GTG AGG GTG AAA TCT GTC CCA GAT CC-3' (SEQ ID NO: 86)
6.22.2VH_F1	5'-GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC-3' (SEQ ID NO: 87)
6.22.2VH_R1	5'-GCT ACT GAA GGT GAA TCC AGA CGC TGC-3' (SEQ ID NO: 88)
6.22.2VH_CS*	5'-CGG AGG TGC TTC TAG AGC AGG GCG-3' (SEQ ID NO: 89)
6.34.2VK_F1	5'-GCA AGT CAG AGT ATT AGT AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CC-3' (SEQ ID NO: 90)
6.34.2VK_R1	5'-GGT TTC TGC TGA TAC CAA TTT AAA TAG CTA CTA ATA CTC TGA CTT GC-3' (SEQ ID NO: 91)
6.34.2VK_F2	5'-CCA TCA GTT CTC TGC AAC CTG AGG ATT TTG CAA CTT ACT ACT GTC ACC-3' (SEQ ID NO: 92)
6.34.2VK_R3	5'-GGT GAC AGT AGT AAG TTG CAA AAT CCT CAG GTT GCA GAG AAC TGA TGG-3' (SEQ ID NO: 93)
6.34.2VH_F16.34.2VH_R1	5'-GCA AAT GAA CAG CCT GCG CGC TGA GGA CAC G-3' (SEQ ID NO: 94)
	5'-CGT GTC CTC AGC GCG CAG GCT GTT CAT TTG C-3' (SEQ ID NO: 95)
6.67.1VK_F1	5'-CAA TAA GAA CTA CTT AGC TTG GTA CCA ACA GAA ACC AGG ACA GCC-3' (SEQ ID NO: 96)
6.67.1VK_R1	5'-GGC TGT CCT GGT TTC TGT TGG TAC CAA GCT AAG TAG TTC TTA TTG-3' (SEQ ID NO: 97)
6.67.1VH_F1	5'-CCC TCA GGG GTC GAG TCA CCA TGT CAG TAG ACA CGT CCA AGA ACC-3' (SEQ ID NO: 98)
6.67.1VH_R1	5'-GGT TCT TGG ACG TGT CTA CTG ACA TGG TGA CTC GAC CCC TGA GGG-3' (SEQ ID NO: 99)
6.67.1VH_CS*	5'-ATT CTA GAG CAG GGC GCC AGG-3' (SEQ ID NO: 100)
6.77.1VK_F1	5'-CCA TCT CCT GCA AGT CTA GTC AGA GCC TCC-3' (SEQ ID NO: 101)
6.77.1VK_R1	5'-GGA GGC TCT GAC TAG ACT TGC AGG AGA TGG-3' (SEQ ID NO: 102)
6.77.1VK_F2	5'-GGT TTA TTA CTG CAT GCA AAG TAT ACA GCT TAT GTC CAG TTT TGG CC -3' (SEQ ID NO: 103)
6.77.1VK_R2	5'-GGC CAA AAC TGG ACA TAA GCT GTA TAC TTT GCA TGC AGT AAT AAA CC -3' (SEQ ID NO: 104)
7.26.4K_F1	5'-CCT GCA AGT CTA GTC AGA GCC TCC-3' (SEQ ID NO: 105)
7.26.4K_R1	5'-GGA GGC TCT GAC TAG ACT TGC AGG-3' (SEQ ID NO: 106)

10

20

30

抗MadCAMモノクローナル抗体発現ハイブリドーマからcDNA増幅のためのPCRプライマー対および抗MadCAM抗体の改変バージョンの構築に用いられるプライマー

【0234】

プライマー対は、Expand High Fidelity Taqポリメラーゼ(Roche)を用いてcDNAを増幅するために用いられ、PCR産物は、その後のシーケンシングのためにpCR2.1 TOPO-TA(Invitrogen)へクローニングされた。重鎖およびκ軽鎖配列を検証されたクローンは、その後、pEE6.1およびpEE12.1ベクター(LONZA)へ、それぞれ、XbaI/EcoRIおよびHindIII/EcoRI部位を用いてクローニングされた。

40

【0235】

遺伝子利用分析

表11は、本発明で概略を述べられた各ハイブリドーマについての重鎖およびκ軽鎖遺伝子利用を示している。

【0236】

【表 1 1】

クローン	重鎖			κ 軽鎖	
	VH	D	JH	Vκ	Jκ
1.7.2	VH3-15	D6-19	JH4b	A3	JK5
1.8.2	VH3-15	D6-19	JH4b	A3	JK5
7.16.6	VH1-18	D6-6	JH6b	A2	JK1
7.20.5	VH4-4	D3-10	JH6b	A3	JK4
7.26.4	VH1-18	D6-6	JH6b	A2	JK1
6.14.2	VH3-23	D5-5	JH4b	O12	JK5
6.22.2	VH3-33	D5-12	JH6b	A26	JK4
6.34.2	VH3-30	D4-23	JH6b	O12	JK3
6.67.1	VH4-4	D3-10	JH4b	B3	JK4
6.73.2	VH3-23	D6-19	JH6b	O12	JK2
6.77.1	VH3-21	D6-19	JH6b	A2	JK2
9.8.2	VH3-33	D3-10またはD3-16	JH4b	O18	JK5

IgG2
IgG4

10

20

30

40

50

重鎖およびκ軽鎖遺伝子利用

【0237】

配列分析

抗体構造をさらに調べるために、抗体の推定アミノ酸配列を、クローンから得られたcDNAから得た。

【0238】

配列識別番号(SEQ ID NO:)1~48および51~68は、抗MadCAM抗体1.7.2(SEQ ID NO:1~4)、1.8.2(SEQ ID NO:5~8)、6.14.2(SEQ ID NO:9~12)、6.22.2(SEQ ID NO:13~16)、6.34.2(SEQ ID NO:17~20)、6.67.1(SEQ ID NO:21~24)、6.73.2(SEQ ID NO:25~28)、6.77.1(SEQ ID NO:29~32)、7.16.6(SEQ ID NO:33~36)、7.20.5(SEQ ID NO:37~40)、7.26.4(SEQ ID NO:41~44)、9.8.2(SEQ ID NO:45~48)、ならびに改変抗MadCAM抗体6.22.2-mod(SEQ ID NO:51~54)、6.34.2-mod(SEQ ID NO:55~58)、6.67.1-mod(SEQ ID NO:59~62)、および6.77.1-mod(SEQ ID NO:63~66)および7.26.4-mod(SEQ ID NO:41~42、67~68)の重鎖ならびにκ軽鎖のヌクレオチド配列ならびにアミノ酸配列を提供している。クローニングされた各抗MadCAM抗体配列について、シグナルペプチド配列(または同じものをコードする塩基)の配列は、小文字で示され、かつ下線が引かれている。

【0239】

図1A~1Jは、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、および9.8.2の推定重鎖アミノ酸配列と、それぞれの生殖系列遺伝子産物のアミノ酸配列の間の配列アラインメントを提供している。抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列の位置は、下線が引かれ、発現された配列と対応する生殖系列配列の間の違いは、太字で示され、生殖系列と比較して発現された配列において付加がある場合、これらは、生殖系列配列において(-)として示されている。

【0240】

図1K~1Tは、抗体1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、および9.8.2の推定κ軽鎖アミノ酸配列と、それぞれの生殖系列遺伝子産物のアミノ酸配列の間の配列アラインメントを提供している。抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列の位置は、下線が引かれ、発現された配列と対応する生殖系列の間の違いは、太字で示され、生殖系列と比較して発現された配列において付加がある場合、これらは、生殖系列配列において(-)として示されている。

【0241】

翻訳後修飾：グリコシル化および脱アミドの存在：

発現された抗MadCAM抗体配列における、派生する生殖系列配列と比較しての変化の一部

の効果は、N結合型グリコシル化(Asn-X-Ser/Thr)および/または脱アミド(Asn-Gly)を受けやすい可能性がありうる残基を導入することである(表12参照)。抗MadCAM抗体6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.26.4、および9.8.2のκ軽鎖可変ドメインアミノ酸配列(SEQ ID NO:16、20、24、28、32、44および48)ならびに抗体6.14.2、(SEQ ID NO:10)の重鎖可変ドメインをコードする核酸配列は、N結合型グリコシル化の存在を予測する。この翻訳後修飾の存在は、モノクローナル抗体6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.26.4、および9.8.2に関して、SDS-PAGEならびにPro-Q(登録商標)Emerald 488 Glycoprotein(Molecular Probes)染色の組み合わせを用いて調べられた。

【0242】

簡単には、約2 μgの還元された抗MadCAM抗体を、MOPS緩衝液を用いる4~12% SDS-ポリ
10
アクリルアミドゲル上へ添加した。電気泳動後、ゲルを、50% MeOH、5% 酢酸中で固定し、3% 酢酸中で洗浄した。ゲル上のいずれの糖もその後、過ヨウ素酸で酸化し、Pro-Q(登録商標)Emerald 488 Glycoprotein stain Kit(Molecular Probes)を用いて染色した。最後の洗浄段階後、糖タンパク質染色を、473 nmの波長に設定された蛍光スキャナを用いて可視化した。

【0243】

糖タンパク質染色後、ゲルを、SYPRO Rubyタンパク質ゲル染色を用いて総タンパク質について染色し、473 nmの波長に設定された蛍光スキャナを用いて分析した。抗MadCAM抗体
20
6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.26.4、および9.8.2のκ軽鎖は、すべて、グリコシル化の存在について陽性に染色された。さらなる確認として、抗MadCAM抗体7.26.4を、トリプシン/キモトリプシンによる消化に曝し、LC-MS/MS分析が、修飾されたトリプシンによるペプチドの存在を確認し、κ軽鎖グリコシル化のさらなる確認を与えた。

【0244】

抗MadCAM抗体、1.7.2、1.8.2、6.22.2および7.20.5、のCDR1領域における特有のAsn-Gly配列は、これらの領域を脱アミドに対して感受性にする。中性pHにおける脱アミドは、負電荷を導入し、またβ-異性化へと導きうり、抗体の性質に影響を与えうる。抗MadCAM抗体1.7.2、1.8.2および7.20.5について、脱アミド化Asn-イソアスパラギン酸残基の存在は、イソアスパラギン酸側鎖をMeOHでトラップした後、質量分光法により評価された。

【0245】

簡単には、抗MadCAM抗体1.7.2について、トリプシン/Asp-NによるペプチドSSQSLLQSNGY
30
NYL(SEQ ID NO:69)(1573.7 Da)の状態が、LC-MS/MSによりモニターするために選択された。抗MadCAM抗体1.7.2を、10 mM DTTにおいて還元し、5 mM ヨウ化酢酸Naにおいてアルキル化し、その後、トリプシン消化緩衝液(50 mM トリス-HCl、1 mM CaCl₂、pH 7.6)へ緩衝液交換した。その後、抗体を、1:20のプロテアーゼ：タンパク質比においてシーケンシンググレード改変トリプシン(sequencing grade modified trypsin)(Promega)と混合した。タンパク質を、トリプシンにおいて、30℃で15時間、消化し、その結果として生じたペプチドを、Ettan LCシステムにおいてC-18 RPCを用いるHPLCにより分離した。³³Asn含有ペプチド(4032 Da)をカラムから収集し、Asp-N消化緩衝液(50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.0)に希釈した。エンドプロテイナーゼAsp-N(Roche)をその後、10:1の適切なペプチド：酵素比で添加した。
40

【0246】

塩化アセチル(100 μL)をメタノールの試料(1 mL、-20℃)へ添加し、混合物を室温まで温めた。トリプシン+Asp-N消化物をSpeed-Vacにおいて乾燥させ、その後、5 μLのメタノール/塩化アセチルを添加し(45 min、室温)、その後、再び、Speed-Vacにおいて乾燥させた。結果として生じた残基を0.1% TFAにおいて再構築させ、ペプチドを、最初に、ニトロセルロース薄層試料調製方法かまたはC18 Zip Tips(Millipore)を用いる逆相精製かのいずれかを用いてVoyager-DE STR MALDI-TOF質量分析計上で分析し、続いて、α-シアノマトリックスとの液滴混合を行った。メチル化ペプチド混合物もまた、上のように、Deca XP Plus Ion Trap質量分析計上でLC-MS/MSを用いて分析した。溶出液を、Ion Trap MS中へまっすぐ垂直に落とし、ペプチドをその後、MSおよびMS/MSにより分析した。MSは、300
50

Daと2000 Daの間のすべてのイオンを分析するように設定された。どんな特定のスキャンにおいても最強イオンが、その後、MS/MS分析にかけられた。

【0247】

【表12】

クローン	重鎖		κ 軽鎖			
	グリコシル化 (NXS/T)	確認	グリコシル化 (NXS/T)	確認	脱アミド (NG)	確認
1.7.2	TFNNSAMT	N.D	CKSNQSLLY	MS/PAGE	LQSNQYN	MS
1.8.2					LQSNQYN	MS
7.16.6					HGNGYNY	MS
7.20.5						
7.26.4			SGTNFTLTI	PAGE	LTINGLEA	N.D
6.14.2						
6.22.2						
6.34.2						
6.67.1						
6.73.2						
6.77.1						
9.8.2						

IgG2
IgG4

抗MadCAM抗体の翻訳後修飾

【0248】

突然変異誘発研究：

本発明において例示された抗MadCAM抗体の一次アミノ酸配列は、翻訳後修飾(例えば、グリコシル化、脱アミド)の可能性のある部位を除去するため、またはアイソタイプバックグラウンドを変化させるため、または治療的利用を向上させる他の変化を操作するために、部位特異的突然変異誘発により改変されうる。例として、PCRが、抗MadCAM抗体6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.77.1、および7.26.4への変化を操作するため、特定のフレームワーク配列を生殖系列へ復帰させるため、可能性のあるグリコシル化部位を除去するため、および/またはヒトIgG₂のアイソタイプバックグラウンドを変化させるために、用いられた。重鎖ヌクレオチドSEQ ID NO:13、17、21および29、ならびにκ軽鎖ヌクレオチドSEQ ID NO:15、19、23、31および43に対応するpCR2.1 TOPO-TAクローニングされたcDNA(100 ng)は、重複-伸長および表10に記載されたプライマーセットのパネルを用いる一連のPCRにおける鋳型として用いられた。

【0249】

6.22.2重鎖：

PCRプライマーセット6.22.2_VH_F1および6.22.2VH_CS^{*}(1)ならびにVH3-33および6.22.2_VH_R1(2)が、Expand Taqポリメラーゼおよびヌクレオチド配列SEQ ID NO:13により表されたpCR2.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて、別々のPCR産物(1)および(2)を作製するために用いられた。産物(1)および(2)は、精製され、VH3-33およびVK6.22.2_CS^{*}プライマーと共に第三PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、改変された6.22.2重鎖V-ドメインを生じた。この改変されたバージョンは、FR1にHis/Phe突然変異を含み、対応するヒトIgG₂定常ドメインを含む、pEE6.1CHと名付けられた、pEE6.1由来ベクターヘインフレームでのクローニングを可能にするXbaI制限部位を導入する。最終PCR断片を、pEE6.1CHのXbaI部位へクローニングし、配向についてチェックし、挿入断片を全配列検証した。改変6.22.2重鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:51に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:52に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列にお

ける変化が示されている。

【0250】

6.22.2κ軽鎖：

PCRプライマーセット6.22.2_VK_F1およびrevκ(1)、ならびにA26および6.22.2_VK_R1(2)は、Expand Taqポリメラーゼ、およびヌクレオチド配列SEQ ID NO:15により表されたpCR2.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて別々のPCR産物(1)および(2)を作製するために用いられた。産物(1)および(2)は、精製され、A26およびrevκプライマーと共に第三PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、改変された6.22.2κ軽鎖V-ドメインを生じた。この改変されたバージョンは、FR3配列へのAsn/AspおよびGly/Serの変化を含む。結果として生じたPCR産物を、HindIII/EcoRI部位を用いてpEE12.1へクローニングし、完全に配列検証した。改変6.22.2κ軽鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:53に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:54に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列における変化が示されている。

10

【0251】

6.34.2重鎖：

PCRプライマーセット6.34.2_VH_F1および6.22.2VH_CS*(1)ならびにVH3-30および6.34.2_VH_R1(2)が、Expand Taqポリメラーゼおよびヌクレオチド配列SEQ ID NO:17により表されたpCR2.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて、別々のPCR産物(1)および(2)を作製するために用いられた。産物(1)および(2)は、精製され、VH3-30およびVK6.22.2_CS*プライマーと共に第三PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、改変された6.34.2重鎖V-ドメインを生じた。この改変されたバージョンは、FR3にSer/Arg突然変異を含み、対応するヒトIgG2定常ドメインを含む、pEE6.1CHと名付けられた、pEE6.1由来ベクターヘインフレームでのクローニングを可能にするXbaI制限部位を導入する。最終PCR断片を、pEE6.1CHのXbaI部位へクローニングし、配向についてチェックし、挿入断片を全配列検証した。改変6.34.2重鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:55に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:56に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列における変化が示されている。

20

【0252】

6.34.2κ軽鎖：

PCRプライマーセット012および6.34.2_VK_R1(1)、6.34.2_VK_F1および6.34.2_VK_R2(2)、加えて6.34.2_VK_F2およびrevκ(3)は、Expand Taqポリメラーゼ、およびヌクレオチド配列SEQ ID NO:19により表されたpCR2.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて別々のPCR産物(1)、(2)および(3)を作製するために用いられた。産物(1)、(2)および(3)は、精製され、(1)および(2)は、012および6.34.2_VK_R2プライマーと共に第三PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、PCR産物(4)を生じた。PCR産物(2)および(3)は、6.34.2_VK_F1およびrevκと共に第四PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、PCR産物(5)を生じた。PCR産物(4)および(5)は、精製され、プライマー012およびrevκでいっしょに組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、改変された6.34.2κ軽鎖V-ドメインを生じた。この改変されたバージョンは、CDR1におけるAsn/Ser変化、FR2におけるPhe/Tyr変化、ならびにFR3配列へのArg-Thr/Ser-Ser、Asp/GluおよびSer/Tyr変化を含む。結果として生じたPCR産物を、HindIII/EcoRI部位を用いてpEE12.1へクローニングし、完全に配列検証した。改変6.34.2κ軽鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:57に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:58に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列における変化が示されている。

30

40

【0253】

6.67.1重鎖：

PCRプライマーセット6.67.1_VH_F1および6.67.1VH_CS*(1)ならびにVH4-4および6.67.1_VH_R1(2)が、Expand Taqポリメラーゼおよびヌクレオチド配列SEQ ID NO:21により表されたpCR2.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて、別々のPCR産物(1)および(2)を作製するために用いられた。産物(1)および(2)は、精製され、VH4-4およびVK6.67.1_CS*プライマー

50

と共に第三PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、改変された6.67.1重鎖V-ドメインを生じた。この改変されたバージョンは、FR3にIle-Leu-Ala/Met-Ser-Val変換を含み、対応するヒトIgG2定常ドメインを含む、pEE6.1CHと名付けられた、pEE6.1由来ベクターヘインフレームでのクローニングを可能にするXbaI制限部位を導入する。最終PCR断片を、pEE6.1CHのXbaI部位ヘクローニングし、配向についてチェックし、挿入断片を全配列検証した。改変6.67.1重鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:59に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:60に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列における変化が示されている。

【0254】

6.67.1κ軽鎖：

PCRプライマーセット6.67.1_VK_F1およびrevκ(1)、ならびにB3および6.67.1_VK_R1(2)は、Expand Taqポリメラーゼ、およびヌクレオチド配列SEQ ID NO:23により表されたpCR2.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて別々のPCR産物(1)および(2)を作製するために用いられた。産物(1)および(2)は、精製され、B3およびrevκプライマーと共に第三PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、改変された6.67.1κ軽鎖V-ドメインを生じた。この改変されたバージョンは、CDR1におけるThr/Asn変化、およびFR2におけるArg/Gly変化を含む。結果として生じたPCR産物を、HindIII/EcoRI部位を用いてpEE12.1ヘクローニングし、完全に配列検証した。改変6.67.1κ軽鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:61に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:62に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列における変化が示されている。

【0255】

6.77.1重鎖：

PCRプライマーセットVH3-21および6.22.2VH_CS*が、Expand Taqポリメラーゼおよびヌクレオチド配列SEQ ID NO:29により表されたpCR2.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて、単一のPCR産物を作製するために用いられた。PCR産物を、XbaIで消化し、ゲル精製し、pEE6.1CHのXbaI部位ヘクローニングして、配向をチェックした。挿入断片は、完全に配列検証された。改変6.77.1重鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:63に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:64に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列における変化が示されている。

【0256】

6.77.1κ軽鎖：

PCRプライマーセットA2および6.77.1_VK_R1(1)、6.77.1_VK_VK_F1および6.77.1_R2(2)、加えて6.77.1_VK_F2およびrevκ(3)は、Expand Taqポリメラーゼ、およびヌクレオチド配列SEQ ID NO:31により表されたpCR2.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて別々のPCR産物(1)、(2)および(3)を作製するために用いられた。産物(1)、(2)および(3)は、精製され、(1)および(2)は、A2および6.77.1_VK_R2プライマーと共に第三PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、PCR産物(4)を生じた。PCR産物(2)および(3)は、6.77.1_VK_F1およびrevκプライマーと共に第四PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、PCR産物(5)を生じた。PCR産物(4)および(5)は、精製され、プライマーA2およびJK2でいっしょに組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、改変された6.77.1κ軽鎖V-ドメインを生じた。この改変されたバージョンは、CDR1におけるAsn/Lys変化、FR3におけるSer/Tyr変化、およびCDR3配列におけるCys/Ser残基変化を含む。結果として生じたPCR産物を、HindIII/EcoRI部位を用いてpEE12.1ヘクローニングし、完全に配列検証した。改変6.77.1κ軽鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:65に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:66に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列における変化が示されている。

【0257】

7.26.4κ軽鎖：

PCRプライマーセット7.26.4_VK_F1およびrevκ(1)、ならびにA2および7.26.4_VK_R1(2)は、Expand Taqポリメラーゼ、およびヌクレオチド配列SEQ ID NO:43により表されたpCR2

.1 TOPO-TA cDNA鋳型(100 ng)を用いて別々のPCR産物(1)および(2)を作製するために用いられた。産物(1)および(2)は、精製され、A2およびrev κ プライマーと共に第三PCR段階において組み合わされ(それぞれ、約50 ng)、改変された7.26.4 κ 軽鎖V-ドメインを生じた。この改変されたバージョンは、CDR1におけるAsn/Ser変化を含む。結果として生じたPCR産物を、HindIII/EcoRI部位を用いてpEE12.1へクローニングし、完全に配列検証した。改変7.26.4 κ 軽鎖についてのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:67に、対応するアミノ酸配列は、SEQ ID NO:68に見出される。親と比較してのヌクレオチドおよびアミノ酸配列における変化が示されている。

【0258】

6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-modと呼ばれ、かつそれぞれ、重鎖ヌクレオチド配列SEQ ID NO:51、55、59、63、および41、ならびに対応するアミノ酸配列SEQ ID NO:52、56、60、64および42、加えて κ 軽鎖ヌクレオチド配列SEQ ID NO:53、57、61、65および67、ならびに対応するアミノ酸配列SEQ ID NO:54、58、62、66および68を表している、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.77.1および7.26.4の改変バージョンのそれぞれのための機能性真核生物発現ベクターは以下のように構築された。6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、および6.77.1-modに対応する重鎖cDNA挿入断片は、NotI/SalIでpEE6.1CHベクターから切除され、7.26.4の重鎖の親バージョンは、NotI/SalIでpEE6.1ベクターから切除され、精製された断片は、 κ 軽鎖配列の改変バージョン6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-modを含む対応するpEE12.1ベクターへ同一部位へクローニングされた。ベクターの配列は確認され、精製された量が、HEK 293T細胞での一過性トランスフェクションに用いられた。簡単には、トランスフェクションの前日にT165フラスコに播種され、Optimemへ洗浄された 9×10^6 個のHEK 293T細胞を、Lipofectamine PLUS(Invitrogen)を用いて製造会社の使用説明書に従い、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-modに対応するベクターcDNA(40 μ g)で一過性にトランスフェクションした。細胞を3 hrs、インキュベートし、その後、トランスフェクション培地を10% 超低IgGウシ胎児血清(Invitrogen 16250-078)およびL-グルタミン(50 mL)を含むDMEM(Invitrogen 21969-035)培地と交換した。5日後、培地上清を収集し、濾過殺菌し、抗MadCAM抗体を、上に記載されたものと類似した方法で、プロテインGセファロースアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。回収された抗体の量(20~100 μ g)は、ブラッドフォードアッセイ法により定量された。

【0259】

6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-modに対応するアフィニティー精製された抗体の抗MadCAM活性は、前に記載されているように、MadCAM-IgG₁ Fc融合体アッセイ法において評価された。これらの抗MadCAM抗体の、それらが由来する親の抗MadCAM抗体と比較した、IC₅₀が表13に示されている。改変された抗MadCAM抗体の、それらの親と比較した、活性への上記のアミノ酸置換の極小の効果があった。抗体はまた、組換えヒトMadCAMまたはカニクイザル/ヒトMadCAMキメラを発現させるCHO細胞へのそれらの結合を維持した。

【0260】

【表13】

クローン	MAdCAM IgG1 Fc 融合体アッセイ法平均 IC ₅₀ (μ g/mL)	
	親	改変
6.22.2	0.018	0.058
6.34.2	0.013	0.049
6.67.1	0.013	0.037
6.77.1	0.022	0.077
7.26.4	0.021	0.033

10

20

30

40

50

抗MAdCAM抗体の改変バージョン、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-modのそれらの親と比較した活性

【0261】

実施例VI

抗MAdCAM抗体をブロックすることによる末梢循環における β_7^+ リンパ球における増加

抗MAdCAM抗体の機制的効果およびその血液中の循環レベルを同定かつ相関させるためにアッセイ法が開発された。阻害性抗MAdCAM抗体は、 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを発現させる白血球の胃腸管への補充を阻害する効果を生じるはずである。 $\alpha_4\beta_7$ インテグリンを有する白血球のクラスは、それゆえに、末梢循環に制限されるはずである。

【0262】

これは、カニクイザルにおいて、完全ヒト抗ヒトMAdCAMモノクローナル抗体7.16.6で実証された。

【0263】

精製された抗ヒトMAdCAMモノクローナル抗体7.16.6(1 mg/kg)または媒体(pH 5.5における、20 mM 酢酸Na、0.2 mg/mL ポリソルベート80、45 mg/mL マンニトール、および0.02 mg/mL EDTA)を、カニクイザルの2群(n=4/群)への伏在静脈を介しての静脈内投与により類似した方法で評価した。投薬後3日目において、血液試料を大腿静脈穿刺によりEDTAチューブに収集した。カニクイザル $\alpha_4\beta_7$ インテグリンと交差反応するLPAM特異的抗体は市販されておらず、それゆえ、抗 β_7 抗体($\alpha_4\beta_7$ および $\alpha_E\beta_7$ インテグリンを認識する)を代わりに用いた。以下の表、表15、による抗体(30 μ L)をカニクイザル血液の100 μ Lを含むチューブへ添加し、穏やかなボルテックスにより混合し、4°Cで20~30 mins、インキュベートした。

【0264】

【表15】

カタログ番号	抗体またはアイソタイプ
555748	mIgG1, k-FITC
555844	mIgG2a, k-PE
559425	mIgG1 - PerCP
555751	mIgG1, k-APC
555728	CD 28-FITC
555945	β_7 -PE
558814	CD 95-APC
550631	CD 4-PerCP

カニクイザル血液の免疫表現型検査に用いられる抗体(BD Pharmingen)

【0265】

各チューブへ、1:10 FACSlyse溶液(BD #349202)の1 mLを添加し、穏やかなボルテックスにより混合し、赤血球溶解が完了するまで暗闇において室温で約12分間、インキュベートした。その後、2 mLのBD染色緩衝液(#554656)を各チューブへ添加し、混合し、室温で6~7 mins、250 x gで遠心分離した。上清をデカントし、ペレットを3 mLの染色緩衝液に再懸濁し、再び混合し、室温で6~7 mins、250 x gで遠心分離した。w/v パラホルムアルデヒド(100 μ L)を含むCytofix緩衝液(BD #554655)をサル末梢血由来の細胞ペレットへ添加し、低/中速度のボルテックスにより入念に混合した。試料は、それらがFACSCalibur上に捕捉されるまで、暗闇において4°Cで保存された。捕捉直前に、PBS(100 μ L)を捕捉直前のすべてのチューブへ添加した。CD4⁺ β_7^+ CD95loCD28⁺(ナイーブ)、CD4⁺ β_7^+ CD95hiCD28⁺(セントラルメモリー)、CD4⁺ β_7^- CD95hiCD28⁺(セントラルメモリー)、CD4⁺ β_7^+ CD95hiCD28⁻(エフェクターメモリー)の絶対的細胞数は、適切なゲーティングおよび4象限解析により取得された。他のT細胞サブセット、例えば、CD8⁺Tセントラルメモリー細胞(β_7^+ CD8⁺CD28⁺CD95⁺)、およびMAdCAMリガンドを有する任意の他の白血球もまた、適切な抗体でこの方法により分析されうる。媒体対照と比較して、抗MAdCAMモノクローナル抗体7.16.6

は、図7に示されているように、循環 $CD4^+ \beta_7^+ CD95^{hi} CD28^+$ セントラルメモリーT細胞のレベルにおいて約3倍の増加を引き起こした。循環 $CD4^+ \beta_7^- CD95^{hi} CD28^+$ セントラルメモリーT細胞の集団上への影響はなく、抗MAdCAMモノクローナル抗体7.16.6の効果は、腸管ホーミングT細胞に特異的であることを示している。カニクイザルにおける抗MAdCAMモノクローナル抗体7.16.6の循環 $(\alpha_4) \beta_7^+$ リンパ球の集団への効果は、これが、特に臨床設定における実際の適用に関して、機構バイオマーカーの頑強な代理証拠であることを示している。

【0266】

配列

SEQ ID NO:1~48および51~68は、12個のヒト抗MAdCAM抗体についての重鎖および κ 軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列、カニクイザルMAdCAM $\alpha_4 \beta_7$ 結合ドメイン配列のヌクレオチドおよびアミノ酸配列、ならびに5個の改変ヒト抗MAdCAM抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を提供する。

10

【0267】

SEQ ID NO:1~48は、12個のヒトモノクローナル抗MAdCAM抗体：1.7.2(SEQ ID NO:1~4)、1.8.2(SEQ ID NO:5~8)、6.14.2(SEQ ID NO:9~12)、6.22.2(SEQ ID NO:13~16)、6.34.2(SEQ ID NO:17~20)、6.67.1(SEQ ID NO:21~24)、6.73.2(SEQ ID NO:25~28)、6.77.1(SEQ ID NO:29~32)、7.16.6(SEQ ID NO:33~36)、7.20.5(SEQ ID NO:37~40)、7.26.4(SEQ ID NO:41~44)、および9.8.2(SEQ ID NO:45~48)の重鎖および κ 軽鎖のヌクレオチドならびにアミノ酸配列を提供する。

20

【0268】

SEQ ID NO:49~50は、カニクイザルMAdCAM $\alpha_4 \beta_7$ 結合ドメインのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を提供する。

【0269】

SEQ ID NO:51~68は、改変されたモノクローナル抗MAdCAM抗体：6.22.2(SEQ ID NO:51~54)、改変6.34.2(SEQ ID NO:55~58)、改変6.67.1(SEQ ID NO:59~62)、改変6.77.1(SEQ ID NO:63~66)についての重鎖および κ 軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列、ならびに改変されたモノクローナル抗MAdCAM抗体：改変7.26.4(SEQ ID NO:67~68)についての κ 軽鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を提供する。SEQ ID NO:70~106および108~110は、様々なプライマー配列を提供する。

30

キー：

シグナル配列：下線を引いた小文字

親と比較しての改変された抗MAdCAM抗体配列におけるアミノ酸変化：下線を引いた大文字

SEQ ID NO. 1

1.7.2 重鎖ヌクレオチド配列

1	<u>atggagtttg</u>	<u>ggctgagctg</u>	<u>gatttttcctt</u>	<u>gctgctat</u>	<u>ttt</u>	<u>taaaagg</u>	<u>gt</u>	10
51	<u>ccagtgt</u>	<u>GAG</u>	<u>GTGCAGCTGG</u>	<u>TGGAGTCTGG</u>	<u>GGGAGGCTTG</u>	<u>GTGAAGCCTG</u>		
101	GGGGGTCCCT	TAGACTCTCC	TGTGTAGCCT	CTGGATTAC	TTTCACTAAC			
151	GCCTGGATGA	TCTGGGTCCG	CCAGGCTCCA	GGGAAGGGGC	TGGAGTGGGT			
201	TGGCCGTATT	AAAAGGAAAA	CTGATGGTGG	GACAACAGAC	TACGCTGCAC			
251	CCGTGAAAGG	CAGATTACAC	ATCTCAAGAG	ATGATTCAAA	AAACACGCTG			
301	TATCTGCAAA	TGAACAGCCT	GAAAACCGAG	GACACAGCCG	TGTATTACTG			
351	TACCACAGGG	GGAGTGGCTG	AGGACTACTG	GGGCCAGGGA	ACCCTGGTCA			
401	CCGTCTCCTC	AGCCTCCACC	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCGCCC			
451	TGCTCCAGGA	GCACCTCCGA	GAGCACAGCG	GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA			
501	GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAACCTCA	GGCGCTCTGA			
551	CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCAGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC			
601	TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAACTTCG	GCACCCAGAC			
651	CTACACCTGC	AACGTAGATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA			20
701	CAGTTGAGCG	CAAATGTTGT	GTGAGTGCC	CACCGTGCCC	AGCACCACCT			
751	GTGGCAGGAC	CGTCAGTCTT	CCTCTTCCCC	CCAAAACCCA	AGGACACCCT			
801	CATGATCTCC	CGGACCCCTG	AGGTCACGTG	CGTGGTGGTG	GACGTGAGCC			
851	ACGAAGACCC	CGAGGTCCAG	TTCAACTGGT	ACGTGGACGG	CGTGGAGGTG			
901	CATAATGCCA	AGACAAAGCC	ACGGGAGGAG	CAGTTCAACA	GCACGTTCCG			
951	TGTGGTCAGC	GTCTCACC	GTGTGCACCA	GGACTGGCTG	AACGGCAAGG			
1001	AGTACAAGTG	CAAGGTCTCC	AACAAAGGCC	TCCCAGCCCC	CATCGAGAAA			
1051	ACCATCTCCA	AAACCAAGG	GCAGCCCCGA	GAACCACAGG	TGTACACCCT			
1101	GGCCCCATCC	CGGGAGGAGA	TGACCAAGAA	CCAGGTCAGC	CTGACCTGCC			
1151	TGGTCAAAGG	CTTCTACCCC	AGCGACATCG	CCGTGGAGTG	GGAGAGCAAT			
1201	GGGCAGCCGG	AGAACAATA	CAAGACCACA	CCTCCCATGC	TGGACTCCGA			
1251	CGGCTCCTTC	TTCCTCTACA	GCAAGCTCAC	CGTGGACAAG	AGCAGGTGGC			
1301	AGCAGGGGAA	CGTCTTCTCA	TGCTCCGTGA	TGCATGAGGC	TCTGCACAAC			30
1351	CACTACACGC	AGAAGAGCCT	CTCCCTGTCT	CCGGGTAAAT	GA			

SEQ ID NO. 2

1.7.2 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mefglswifl aailkgvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CVASGFTFTN
51  AWMIWVRQAP GKGLEWVGRI KRKTDGGTTD YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL
101 YLQMNSLKTE DTAVYYCTTG GVAEDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
151 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
201 SLSSVVTVPV SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP
251 VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV
301 HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK
351 TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN
401 GQFENNYKTT PPMLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN
451 HYTQKSLSL S PGK

```

10

SEQ ID NO. 3

1.7.2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaagtctct gggtctctgg
51  atccagtgggg GATATTGTGA TGA CT CAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CAAAGTAATG GATACAATA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCTGATCT ATTTGGGTTT TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGATGG AGGCTGAGGA TGTTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACTATC ACCTTCGGCC AAGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAAC TG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAACTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAAATTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGGAAG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAC TCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

20

SEQ ID NO. 4

1.7.2 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mrlpagllgl lmlwvsgssg DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL
51  QSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQALQTI TFGQGTRLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
202 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

30

SEQ ID NO. 5

1.8.2 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggagtttg ggctgagctg gatttttcctt gctgctatatt taaaaggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTGAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT TAGACTCTCC TGTGTAGTCT CTGGATTAC TTTCACTAAC
151 GCCTGGATGA TCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 TGGCCGTATT AAAAGGAAAA CTGATGGTGG GACAACAGAC TACGCTGCAC
251 CCGTGAAAGG CAGATTCACC ATCTCAAGAG ATGATTCAAA AAACACGCTG
301 TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAAAACCGAG GACACAGCCG TGTATTACTG
351 TACCACAGGG GGAGTGGCTG AGGACTACTG GGGCCAGGGA ACCCTGGTCA
401 CCGTCTCCTC AGCCTCCACC AAGGGCCCAT CCGTCTTCCC CCTGGCGCCC
451 TGCTCCAGGA GCACCTCCGA GAGCACAGCG GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA
501 GGACTIONTC CCCGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAACCTA GGCGCTCTGA
551 CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCAGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC
601 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAACTTCG GCACCCAGAC
651 CTACACCTGC AACGTAGATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA
701 CAGTTGAGCG CAAATGTTGT GTCGAGTGCC CACCGTGCCC AGCACCACCT
751 GTGGCAGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAACCCA AGGACACCTT
801 CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACGTG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC
851 ACGAAGACCC CGAGGTCCAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
901 CATAATGCCA AGACAAAGCC ACGGGAGGAG CAGTTCAACA GCACGTTCCG
951 TGTGGTCAGC GTCCTCACC GGTGTCACCA GGACTIONTC AACGGCAAGG
1001 AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGGCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
1051 ACCATCTCCA AAACCAAGG GCAGCCCCGA GAACACAGG TGTACACCTT
1101 GCCCCATCC CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC
1151 TGGTCAGAG CTTCTACCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
1201 GGGCAGCCG AGAACAACTA GAACACCACA CCTCCATGC TGGACTCCGA
1251 CGGCTCCTTC TTCCTCTACA CCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC
1301 AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC
1351 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGTAAAT GA

```

10

20

SEQ ID NO. 6

1.8.2 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mefglswifl aailkgvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CTVSGFTFTN
51  AWMIWVRQAP GKGLEWVGRI KRKTDGGTTD YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL
101 YLQMNSLKTE DTAVYYCTTG GVAEDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP
151 CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY
201 SLSSVTVVPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP
251 VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV
301 HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTIVHQLDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK
351 TISKTKQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN
401 GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN
451 HYTQKSLSLG PGK

```

30

SEQ ID NO. 7

1.8.2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg
51  atccagtggg GATATTGTGA TGACTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CAAAGTAATG GATTCAACTA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGTTC TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGGTCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGT'TGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACTATC ACCTTCGGCC AAGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAAC TG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAC TCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCCTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

10

SEQ ID NO. 8

1.8.2 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mrlpaql lgl lmlwvsgssg DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL
51  QSNQFN YLDW YLQKPGQSPQ LLIYLG SNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAE DVG V YYCMQALQTI TFGQGT RLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASV VCLL NNFYPREK V QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S
202 STLTL S KADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 9

6.14.2 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggagttttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctatatt taaaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGACTCAC CTTTAACAAT
151 TCTGCCATGA CCTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCAACTACT AGTGGAAGTG GTGGTACCAC ATACTACGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGGTT CACCATCTCC AGAGACTCTC CCAAGAACAC GCTCTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCCGTATATT ACTGTGCGGC
351 CCGTGATAC AGCTATGGTA CGACCCCTTA TGAGTACTGG GGCCAGGGAA
401 CCCTGGTCAC CGTCTCCTCA GCTTCCACCA AGGGCCCATC CGTCTTCCCC
451 CTGGCGCCCT GTTCCAGGAG CACCTCCGAG AGCACAGCCG CCCTGGGCTG
501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCAGG GACGGTGTCT TGGAACTCAG
551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCCTCA
601 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG
651 CACGAAGACC TACACCTGCA ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
701 TGGACAAGAG AGTTGAGTCC AAATATGGTC CCCCATGCCC ATCATGCCCA
751 GCACCTGAGT TCCTGGGGGG ACCATCAGTC TTCCTGTTCC CCCCAAAACC
801 CAAGGACACT CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACG TGCGTGGTGG
851 TGGACGTGAG CCAGGAAGAC CCCGAGGTCC AGTTCAACTG GTACGTGGAT
901 GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTTCAA
951 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
1001 TGAACGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGG CCTCCCGTCC
1051 TCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAGCCACA
1101 GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCAGGAGGA GATGACCAAG AACCAGGTCA
1151 GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTACC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG
1201 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGAACA CGCCTCCCGT
1251 GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTTA CAGCAGGCTA ACCGTGGACA
1301 AGAGCAGGTG GCAGGAGGGG AATGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG
1351 GCTCTGCACA ACCACTACAC ACAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCTGGGTAA
1401 ATGA

```

10

20

SEQ ID NO. 10

6.14.2 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mefglswlfl vailkgvqce VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGLTFNN
51  SAMTWVRQAP GKGLEWVSTT SGSGGTTYIA DSVKGRFTIS RDSPKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCAARGY SYGTTPEYEW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP
151 LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
201 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP
251 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
351 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
401 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
451 ALHNHYTQKS LSLSLGK

```

30

40

SEQ ID NO. 11

6.14.2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgagggggcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT AGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCGGAGC
151 ATTAGCAGCT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCCTAA
201 AGTCCTGATC TTTTTTGTGT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC CCATCAAGGT
251 TCAGTGGCAG TGGCTCTGGG ACAGATTTCa CTCTCACCAT CAGCAGTCTG
301 CAACCTGAAG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CAACAGAATT ACATTCCCCC
351 TATTACCTTC GGCCAGGGGA CAGGACTGGA GATCAGACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTTCATCTT CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA G

```

10

SEQ ID NO. 12

6.14.2 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mdmrvpaql1 gl1111wlrga rcDIQMTQSP SLSASVGDV VTITCRASRS
51  ISSYLNWYQQ KPGKAPKVL I FFVSSLQSGV PSRFGSGSG TDFTLTISSL
101 QPEDFATYYC QQNYIPPITF GQGTRLEIRR TVAAPS VFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPRKAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST
202 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 13

6.22.2 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGACACAC CTTCAGTAGC
151 GATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATATTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTATATT ACTGTGCGAG
351 AGATCCCGGC TACTATTACG GTATGGACGT CTGGGGCCAA GGGACCACGG
401 TCACCGTCTC CTCAGCTTCC ACCAAGGGCC CATCCGTCTT CCCCCTGGCG
451 CCCTGCTCCA GGAGCACCTC CGAGAGCACA GCCGCCCTGG GCTGCCTGGT
501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC
551 TGACCAGCGG CGTGACACAC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACGAA
651 GACCTACACC TGCAACGTAG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
701 AGAGAGTTGA GTCCAAATAT GGTCCCCCAT GCCCATCATG CCCAGCACCT
751 GAGTTCTCTG GGGGACCATC AGTCTTCTTG TTCCCCCCTG AACCCAAGGA
801 CACTCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG
851 TGAGCCAGGA AGACCCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGATGGCGTG
901 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC
951 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCTT GCACCAGGAC TGGCTGAACG
1001 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGGCCTCCC GTCTCTCCATC
1051 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAGC CACAGGTGTA
1101 CACCCTGCCC CCATCCCAGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCTGTA
1151 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
1201 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCGCGCCTC CCGTGCTGGA
1251 CTCCGACGGC TCTTCTTCC TCTACAGCAG GCTAACCGTG GACAAGAGCA
1301 GGTGGCAGGA GGGGAATGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG
1351 CACAACCACT ACACACAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCTGG GTAAATGA

```

10

20

SEQ ID NO. 14

6.22.2 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQGRSLRLS CAASGHTFSS
51  DGMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDPG YYYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA
151 PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201 YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPSCPAP
251 EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
301 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
351 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
401 SNGQPENNYK TAPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHREAL
451 HNHYTQKSL SLSLGK

```

30

SEQ ID NO. 15

6.22.2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caggggtGAA ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC
101 CAAAAGAGAA AGTCACCATC ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG AATTGGTAGT
151 AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT CAGTCTCCAA AACTCCTCAT
201 CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG TTCAGTGGCA
251 GTGGATCTGG GACAAATTTC ACCCTACCA TCAATGGCCT GGAAGCTGAA
301 GATGCTGCAA CTTATTACTG TCATCAGAGT GGTCGTTTAC CGCTCACTTT
351 CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG
401 TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT
451 GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
501 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTACACAG
551 AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG
601 AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA
651 TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT
701 AGTGA

```

10

SEQ ID NO. 16

6.22.2 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mlpsqligfl llwvpasrge IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQRIGS
51  SLHWYQQKPD QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTNF TLTINGLEAE
101 DAATYYCHQS GRLPLTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

```

20

SEQ ID NO. 17

6.34.2 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttctctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTCAGTAGC
151 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAGTTATA TCAAATGATG GAAATAATAA ATACTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAAAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGCGC TGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATAGTACG GCGATAACCT ACTACTACTA CGGAATGGAC GTCTGGGGCC
401 AAGGGACCAC GGTCACCGTC TCCTCAGCTT CCACCAAGGG CCCATCCGTC
451 TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCCGCCCT
501 GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA
551 ACTCAGGCGC CCTGACCAGC GCGGTGCACA CCTTCCCGGC TGTCTTACAG
601 TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAG
651 CTTGGGCACG AAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA
701 CCAAGGTGGA CAAGAGAGTT GAGTCCAAAT ATGGTCCCCC ATGCCCATCA
751 TGCCCAGCAC CTGAGTTCCT GGGGGGACCA TCAGTCTTCC TGT'TCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACTCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAG GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901 GTGGATGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCGTCTCTCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 GCCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCA GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG ACAGCCGGAG AACAACTACA AGACCAGCC
1251 TCCCGTGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AGGCTAACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG GAGGGGAATG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACACAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCT
1401 GGGTAAATGA

```

10

20

SEQ ID NO. 18

6.34.2 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51  YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI SNDGNNKYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLSAEDT AVYYCARDST AITYYYYGMD VWGQGT'TVTV SSASTKGPSV
151 FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
201 SSGLYSLSSV VTPSSSLGT KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPS
251 CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM
451 HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

```

30

SEQ ID NO. 19

6.34.2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAAT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATTG GTTTCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCGGTTTGAA GCGTGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGGG ACAGATTTCa CTCTCACCAT CAGGACTCTG
301 CAACCTGATG ATTTTGCAAC TTACTCCTGT CACCAGAGTT ACAGTCTCCC
351 ATTCACTTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGGA TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA

```

10

SEQ ID NO. 20

6.34.2 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mdmrvpaql1 gl1llwlrge rcDIQMTQSP SLSASVGDR VTITCRASQN
51  ISSYLNWFQQ KPGKAPKLLI YAASGLKRGV PSRFGSGSG TDFTLTIRTL
101 QPDDFATYSC HQSYSLPFTF GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 21

6.67.1 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaaacacc tgtgggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtcccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCACTGTCT CTGGTGACTC CATCAGTAGT
151 AACTATTGGA GCTGGATCCG GCAGCCCGCC GGAAGGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGGCGTATC TATACCAGTG GGGGCACCAA CTCCAACCCC TCCCTCAGGG
251 GTCGAGTCAC CATTTTAGCA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCTCTGAAA
301 CTGAGTTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 TCGTATTACT ATAATTCGGG GACTTATTCC ATCCTTCTTT GACTACTGGG
401 GCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCCTCAG CTTCCACCAA GGGCCCATCC
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCCGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCTG
551 GGAAGTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCTTA
601 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAGCTTGGGC ACGAAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGAGA GTTGAGTCCA AATATGGTCC CCCATGCCCA
751 TCATGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC
801 CCAAAACCC AAGGACACTC TCATGATCTC CCGACCCCT GAGGTCACGT
851 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAACTGG
901 TACGTGGATG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
951 GCAGTTCAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
1001 AGGACTGGCT GAACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC
1051 CTCCCGTCTT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
1101 AGAGCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA
1151 ACCAGGTAGT CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC
1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC
1251 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTTAC AGCAGGCTAA
1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ATGTCTTCTC ATGCTCCGTG
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACA CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
1401 TCTGGGTAAA TGA

```

10

20

SEQ ID NO. 22

6.67.1 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mkhlwfflll vaaprwwlsQ VQLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGDSISS
51  NYWSWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGGTNSNP SLRGRVTILA DTSKNQFSLK
101 LSSVTAADTA VYYCARDRIT IIRGLIPSF DYWGQGTLLV VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP
251 SCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW
301 YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG
351 LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
401 AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV
451 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK

```

30

SEQ ID NO. 23

6.67.1 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggtggtgc agaccaggt cttcatttct ctggtgctct ggatctctgg
51  tgcctacggg GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAC CTACTTAGCT TGGTACCAAC AGAAACCAAG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTTACTGGGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCAGTGGC AGCGGGTCTG GGACAGATT TCACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTTCT GTCAACAATA
351 TTATAGTATT CCTCCCCTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG TGCTGCTGA ATAACCTCTA
501 TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA
651 AGTCTACGCC TCGGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGTGA

```

10

SEQ ID NO. 24

6.67.1 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mvlqtgvfis lllwisgay DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSNNKTYLA WYQQKPRQPP KLLIYWASIR EYGVPDFRFSG SGSGTDFTLT
101 ISSLQAEDVA VFYFCQQYYSI PPLTFGGGTK VEIKRTVAAP SVFIFPPSDE
151 QLKSGTASVV CLLNNFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY
201 SLSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRRGE C

```

20

SEQ ID NO. 25

6.73.2 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGT TGGAGTCTGG GGGAGACTTG GTCCAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTTAGAAGT
151 TATGCCATGA ACTGGGTCCG ACAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCAGTTATT AGTGGTCGTG GTGGTACTAC ATACTACGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGGTT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACGCG GCCGTATATT ACTGTGCGAA
351 GATAGCAGTG GCTGGAGAGG GGCTCTACTA CTACTACGGT ATGGACGCTCT
401 GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCCT CAGCTTCCAC CAAGGGCCCA
451 TCCGTCTTCC CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG AGAACACAGC
501 CGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT
551 CGTGGAACCT AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC
601 CTACAGTCCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC
651 TAGCAGCTTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCCA
701 GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCCATGC
751 CCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCCTGGGG GGACCATCAG TCTTCCTGTT
801 CCCCCCAAAA CCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTC AAC
901 TGGTACGTGG ATGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA
951 GGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCAAAGCCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCAGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCCCGCTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACGCCCTCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAGGC
1301 TAACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACACAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCTGGGT AAATGATAG

```

10

20

SEQ ID NO. 26

6.73.2 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mefglswlfl vailkgvqcE VQLLESGGDL VQPGSLRLS CAASGFTFRS
51  YAMNWRQAP GKLEWVSVI SGRGGTTYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDA AVYYCAKIAV AGEGLYYYG MDVWGQTTV TVSSASTKGP
151 SVFPLAPCSR STSENTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV
201 LQSSGLYSL SVVTPSSSL GTKTYTCNVD HKPSNTKVDK RVESKYGPPC
251 PSCPAPFLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
351 GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSGGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS
451 VMHEALHNHY TQKSLSLSLG K

```

30

SEQ ID NO. 27

6.73.2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT AGGTGACAGA GTCACCTTCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAAC
151 ATTACCAACT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AGGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCGT CCAGTTTGCC AAGAGGGGTC CCATCAAGGT
251 TCCGTGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGTCTG
301 CAACCTGAAG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CAACAGAGTT ACAGTAATCC
351 TCCGAGTGC GGTTTTGCC AGGGGACCAC GCTGGATATC AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAGT CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAGTCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCCTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

10

SEQ ID NO. 28

6.73.2 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mdmrvpaql1 gl1111wlr1a rcDIQMTQSP SLSASVGDR VTFTCRASQN
51  ITNYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASSLPRGV PSRFRGSGSG TDFTLTISL
101 QPEDFATYYC QQSYSNPPEC GFGQGTTLDI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREKAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 29

6.77.1 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggaactgg ggctccgctg ggttttcctt gttgctatatt tagaagggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTCAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAGTAGC
151 TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCATCCATT AGTAGTAGTA GTAGTTACAT ATACTACGCA GACTCAGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC ACTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATGGGTAT AGCAGTGGCT GGTCTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCTTC CACCAAGGGC
451 CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCCGGCT
601 GTCCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651 CTCCAGCAGC TTGGGCACGA AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGAGAGTTG AGTCCAAATA TGGTCCCCCA
751 TGCCCATCAT GCCCAGCACC TGAGTTCCTG GGGGGACCAT CAGTCTTCCT
801 GTTCCCCCCA AAACCAAGG AACTCTCAT GATCTCCCGG ACCCTGAGG
851 TCACGTGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCAGG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC
901 AACTGGTACG TGGATGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG
951 GGAGGAGCAG TTCAACAGCA CGTACCGTGT GGTACGCGTC CTCACCGTCC
1001 TGCAACAGGA CTGGCTGAAC GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
1051 AAAGGCCCTC CGTCCTCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA
1101 GCCCCGAGAG CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCAG GAGGAGATGA
1151 CCAAGAACCA GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCAGC
1201 GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA
1251 GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA
1301 GGCTAACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGG AGGGGAATGT CTTTTACGCG
1351 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACACAGA AGAGCCTCTC
1401 CCTGTCTCTG GGTAAATGAT AGGAATTCTG ATGA

```

10

20

SEQ ID NO. 30

6.77.1 推定重鎖タンパク質配列

```

1   melglrwvfl vailegvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTFSS
51  YSMNWVRQAP GKGLEWVSSI SSSSSYIYYA DSVKGRFTIS RDNANKNSLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDGY SSGWSYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
251 CPSCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
301 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
351 KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
401 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSR
451 SVMHEALHNN YTQKSLSLSL GK

```

30

SEQ ID NO. 31

6.77.1 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```
1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgca GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CTCTTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA ACTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CTTAGTGATG GAAAGACCTA TTTGAATTGG TACCTGCAGA AGCCCGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGACAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTCA ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGCGGTTT TATTCCTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTATG TGCAGTTTTG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA
```

10

SEQ ID NO. 32

6.77.1 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```
1   mrlpaqllg1 lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCNSSQSLL
51  LSDGKTYLW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNR FSGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YSCMQSIQLM CSFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC
```

20

SEQ ID NO. 33

7.16.6 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggactgga cctggagcat ctttttcttg gtggcagcag caacagggtgc
51  ccactcccCAG GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
151 TATGGTATCA ACTGGGTGCG ACAGGCCCTT GGACAAGGGC TTGAGTGGAT
201 GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGGTAACAC AAACATATGCA CAGAAGGTCC
251 AGGGCAGAGT CACCATGACC GCAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG
301 GACCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGAGGGTAGC AGCTCGTCCG GAGACTACTA TTACGGTATG GACGTCTGGG
401 GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT
551 GGAACTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCCTA
601 CAGTCCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751 CCGTGCCCAAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCCTGT TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCCTC
1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401 GGGTAAATGA

```

10

20

SEQ ID NO. 34

7.16.6 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mdwtwsilfl vaaatgahsQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTS
51  YGINWVRQAP GQGLEWMGWI SVYSGNTNYA QKVQGRVTMT ADTSTSTAYM
101 DLRLSLRSDDT AVYYCAREGS SSSGDYYYGM DVWGQGTTVT VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSNFG TQYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PAPIEK'TISK TKGQPREPQV YTLPPSRREM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYK'TTPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
451 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

30

SEQ ID NO. 35

7.16.6 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgca GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CATACTGATG GAACGACCTA TTTGTATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGATT TATTACTGCA TGCAAAATAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCTG ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

10

SEQ ID NO. 36

7.16.6 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mrlpaqlgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLI
51  HTDGTTYLYW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNR FSGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGI YYCMQNIQLP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

```

20

SEQ ID NO. 37

7.20.5 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCACCTGTCT CTGGTAGCTC CATCAGTAGT
151 TACCACTGGA ACTGGATCCG GCAGCCCGCC GGGAAGGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGGCGTATC TATACCACTG GGAGCACCAA CTACAACCCC TCCCTCAAGA
251 GTCGAGTCAC CATGTCTACTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAG
301 CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 GGGGGTCAGG TATTACTATG CTTGCGGGAG TTATTACTAC GGTCTGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGGC
451 CCATCGGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC AGGAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCAGCT
601 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651 CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTCGAG
751 TGCCCACCGT GCCCAGCACC ACCTGTGGCA GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
801 CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCGAGGT CCAGTTCAAC
901 TGGTACGTGG ACGGCGTGGG GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGGA
951 GGAGCAGTTC AACAGCAGT TCCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTTGTGC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCTCCCAG CCCCACATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACACCTCCC ATGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
1301 TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCCGGGT AAATGA

```

10

20

SEQ ID NO. 38

7.20.5 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mkhlwfflll vaaprwlslQ VQLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGSSISS
51  YHWNWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGSTNYNP SLKSRVTMSL DTSKNQFSLK
101 LSSVTAADTA VYYCAREGVR YYYASGSYYY GLDVWGQGT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQYTCNV DHKPSNTKVD KTVKCCVE
251 CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK
351 GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSDSGFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS
451 VMHEALHNYH TQKSLSLSPG K

```

30

SEQ ID NO. 39

7.20.5 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg
51  atccagtggg GATATTGTGA TGACTCAGTC TCCACTCTCC CTGCCCCGTCA
101 CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CATGGTAATG GATACAACTA TTTGGATTGG TACCTGCAGA AGCCAGGGCA
201 GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGTTC TAATCGGGCC TCCGGGGTCC
251 CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGTGCGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT
351 ACAAACCTCTC ACTTTCGGCG GAGGGACCAA GGTGGAGATC AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAC TGCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACCTCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

10

SEQ ID NO. 40

7.20.5 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mrlpaql lgl lmlwvsgssg DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL L
51  HGNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQALQTL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S
201 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 41

7.26.4 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc
51  ccactcccCAG GTTCAGCTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG
101 GGGCCTCAGT GAAGGTCTCC TGCAGGCTT CTGGTTACAC CTTTACCAGC
151 TATGGTATCG ACTGGGTGCG ACAGGCCCCCT GGACAAGGGC TTGAGTGGAT
201 GGGATGGATC AGCGTTTACA GTGGTAACAC AAAGTATGCA CAGAAGCTCC
251 AGGGCAGAGT CACCATGTCC ACAGACACAT CCACGAGCAC AGCCTACATG
301 GAGCTGAGGA GCCTGAGATC TGACGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGAGGGTAGC AGCTCGTCCG GAGACTACTA CTACGGTATG GACGTCTGGG
401 GCCAAGGGAC CACGGTCACC GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCAGGTG ACGGTGTCTG
551 GGAAGTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTTA
601 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAAGTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCA
751 CCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCCCTCA TGATCTCCCC GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAAGTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCCTT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCAGCCCCCA TTGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCCTG CCCCATCCCC GGAGGAGATG ACCAAGAAC
1151 AGGTGAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAAGTACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CTTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1402 GGGTAAATGA

```

10

20

SEQ ID NO. 42

7.26.4 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mdwtwsilfl vaaatgahsQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CEASGYTFTS
51  YGIDWVRQAP GQGLEWMGWI SVYSGNTNYA QKLQGRVTMS TDTSTSTAYM
101 ELRSLRSDDT AVYYCAREGS SSSGDYYYGM DVWGQGTTVT VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLNISRTPE VTCVVDVSH EDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREQFNS TFRVSVSLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYKTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
451 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

30

SEQ ID NO. 43

7.26.4 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgagggtcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAATCA GAGCCTCCTG
151 TATAGTGATG GAAAGACCTA TTTGTTTTTG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGATTC TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGGGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTCC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

10

SEQ ID NO. 44

7.26.4 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mrlpaqlgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSNQSL
51  YSDGKTYLFW YLQKPGQPPQ LLIYEVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQSIQLP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 45

9.8.2 重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTCAC CTTCAGTAGC
151 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAGTTATA TGGTATGATG GAAGTAATGA ATACTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 GGGGGCGTAC CACTTTGCCT ACTGGGGCCA GGGAAACCCTG GTCACCGTCT
401 CCTCAGCTTC CACCAAGGGC CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCC
451 AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA
501 CTTCCCCGAA CCGGTGACGG TGTCTGGGAA CTCAGGCGCC CTGACCAGCG
551 GCGTGCACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC
601 AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACGA AGACCTACAC
651 CTGCAACGTA GATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGAGAGTTG
701 AGTCCAAATA TGGTCCCCCA TGCCCATCAT GCCCAGCACC TGAGTTCCCTG
751 GGGGGACCAT CAGTCTTCCT GTTCCCCCCA AAACCCCAAG ACACCTCAT
801 GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCAGG
851 AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGATGGCGT GGAGGTGCAT
901 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA CGTACCGTGT
951 GGTCCAGCTC CTCACGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAC GGCAAGGAGT
1001 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCCTC CGTCCTCCAT CGAGAAAACC
1051 ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCGAGAG CCACAGGTGT ACACCCTGCC
1101 CCCATCCAGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG
1151 TCAAAGGCTT CTACCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
1201 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG
1251 CTCCTTCTTC CTCTACAGCA GGCTAACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGG
1301 AGGGGAATGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC
1351 TACACACAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCTG GGTAAATGA

```

10

20

SEQ ID NO. 46

9.8.2 推定重鎖タンパク質配列

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51  YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGSNEYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARGAY HFAYWGQGL VTVSSASTKG PSVFPLAPCS
151 RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL
201 SSVVTVPSST LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP CPSCPAPEFL
251 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH
301 NAKTKPREEQ FNSTYRVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT
351 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
401 QPENNYKTPP PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN
451 YTQKSLSLSL GK

```

30

SEQ ID NO. 47

9.8.2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggacatga ggggtccctgc tcagctcctg ggggtccctgc tgctctggct
51  ctcagtcgca ggtgccagat gtGACATCCA GATGACCCAG TCTCCATCCT
101 CCCTGTCTGC ATCTGTAGGA GACAGAGTCA CCATCACTTG CCAGGCGAGT
151 CAGGACATTA GCAACTATTT AAATTGGTAT CAGCAGAAAC CAGGGAAAGC
201 CCCTAAGCTC CTGATCTACG ATGCATCCAA TTTGGAAACA GGGGTCCCAT
251 CAAGGTTTCAG TGGAAAGTGA TCTGGGACAG ATTTTACTTT CACCATCAGC
301 AGCCTGCAGC CTGAAGATAT TGCAACATAT TCCTGTCAAC ACTCTGATAA
351 TCTCTCGATC ACCTTCGGCC AGGGGACACG ACTGGAGATT AAACGAACTG
401 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
451 TCTGGAAC TGCTGTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ACCCCAGAGA
501 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAAC TCCC
551 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
601 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
651 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGA GTGTTAGTGA

```

10

SEQ ID NO. 48

9.8.2 推定 κ 軽鎖タンパク質配列

```

1   mdmrvpaql l gllllwlsva garcDIQMTQ SPSSLASASVG DRVITITCQAS
51  QDISNYLNWY QQKPGKAPKL LIYDASNLET GVPSRFSGSG SGTDFTFITIS
101 SLQPEDIATY SCQHSNLSI TFGQGRLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
151 SGTASVVCLL NNFYPREKAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
201 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 49

カニクイザルMAdCAMの $\alpha_4\beta_7$ 結合ドメインのヌクレオチド配列

```

1   ATGGATCGGG GCCTGGCCCT CCTGCTGGCG GGGCTTCTGG GGCTCCTCCA
51  GCCGGGCTGC GGCCAGTCCC TCCAGGTGAA GCCCCTGCAG GTGGAGCCCC
101 CGGAGCCGGT GGTGGCCGTG GCCCTGGGCG CCTCTCGCCA GCTCACCTGC
151 CGCCTGGA CT GCGCGGACGG CGGGGCCACG GTGCAGTGGC GGGGCCTGGA
201 CACCAGCCTG GCGCGGTGCG AGTCGGACGC GGGCCGCAGC GTCCCTACCG
251 TGGCGAACGC CTCGCTGTCTG CCGGCCGGGA CCCGTGTGTG CGTGGGCTCC
301 TGCGGGGGCC GCACCTTCCA GCACACCGTG CGGCTCCTTG TGTACGCCTT
351 CCCGGACCAG CTGACCATCT CCCCAGCAGC CCTGGTGCCT GGTGACCCGG
401 AGGTGGCCTG TACGGCTCAC AAAGTCACGC CTGTGGACCC CAATGCGCTC
451 TCCTTCTCCC TGCTCCTGGG GGACCAGGAA CTGGAGGGGG CCCAGGCTCT
501 GGGCCCGGAG GTGGAGGAGG AGGAGGAGCC CCAGGAGGAG GAGGACGTGC
551 TGTTTCAGGT GACAGAGCGC TGGCGGCTGC CGACCCTGGC AACCCTGTGC
601 CTGCCCCGCG TCTACTGCCA GGCCACGATG AGGCTGCCTG GCTTGGAGCT
651 CAGCCACCGC CAGGCCATCC CGGTCCTGCA C

```

30

SEQ ID NO. 50

カニクイザルMAdCAMの $\alpha_4\beta_7$ 結合ドメインのアミノ酸配列

```

1   MDRGLALLLA GLLGLLQPGC GQSLQVKPLQ VEPPEPVVAV ALGASRQLTC
51  RLDCADGGAT VQWRGLDTS L GAVQSDAGRS VLTVRNASLS AAGTRVCVGS
101 CGGRTFQHTV RLLVYAFPDQ LTISPAALVP GDPEVACTAH KVTPVPDNLAL
151 SFSLLLGDQE LEGAQLGPE VEEEEEPQEE EDVLFRTVTER WRLPTLATPV
201 LPALYCQATM RLPGLELSHR QAIPVLH

```

40

SEQ ID NO. 51

改変6. 22. 2重鎖ヌクレオチド配列

1	<u>atggagtttg</u>	<u>ggctgagctg</u>	<u>ggttttcctc</u>	<u>gttgctcttt</u>	<u>taagaggtgt</u>
51	<u>ccagtgtCAG</u>	<u>GTGCAGCTGG</u>	<u>TGGAGTCTGG</u>	<u>GGGAGGCGTG</u>	<u>GTCCAGCCTG</u>
101	<u>GGAGGTCCCT</u>	<u>GAGACTCTCC</u>	<u>TGTGCAGCGT</u>	<u>CTGGATTAC</u>	<u>CTTCAGTAGC</u>
151	<u>GATGGCATGC</u>	<u>ACTGGGTCCG</u>	<u>CCAGGCTCCA</u>	<u>GGCAAGGGGC</u>	<u>TGGAGTGGGT</u>
201	<u>GGCAATTATA</u>	<u>TGGTATGATG</u>	<u>GAAGTAATAA</u>	<u>ATATTATGCA</u>	<u>GACTCCGTGA</u>
251	<u>AGGGCCGATT</u>	<u>CACCATCTCC</u>	<u>AGAGACAATT</u>	<u>CCAAGAACAC</u>	<u>GCTGTATCTG</u>
301	<u>CAAATGAACA</u>	<u>GCCTGAGAGC</u>	<u>CGAGGACACG</u>	<u>GCTGTATATT</u>	<u>ACTGTGCGAG</u>
351	<u>AGATCCCGGC</u>	<u>TACTATTACG</u>	<u>GTATGGACGT</u>	<u>CTGGGGCCAA</u>	<u>GGGACCACGG</u>
401	<u>TCACCGTCTC</u>	<u>CTCAGCTTCC</u>	<u>ACCAAGGGCC</u>	<u>CATCCGTCTT</u>	<u>CCCCCTGGCG</u>
451	<u>CCCTGCTCTA</u>	<u>GAAGCACCTC</u>	<u>CGAGAGCACA</u>	<u>GCGGCCCTGG</u>	<u>GCTGCCTGGT</u>
501	<u>CAAGGACTAC</u>	<u>TTCCCCGAAC</u>	<u>CGGTGACGGT</u>	<u>GTCGTGGAAC</u>	<u>TCAGGCGCTC</u>
551	<u>TGACCAGCGG</u>	<u>CGTGACACAC</u>	<u>TTCCCAGCTG</u>	<u>TCCTACAGTC</u>	<u>CTCAGGACTC</u>
601	<u>TACTCCCTCA</u>	<u>GCAGCGTGGT</u>	<u>GACCGTGCCC</u>	<u>TCCAGCAACT</u>	<u>TCGGCACCCA</u>
651	<u>GACCTACACC</u>	<u>TGCAACGTAG</u>	<u>ATCACAAGCC</u>	<u>CAGCAACACC</u>	<u>AAGGTGGACA</u>
701	<u>AGACAGTTGA</u>	<u>GCGCAAATGT</u>	<u>TGTGTCGAGT</u>	<u>GCCCACCGTG</u>	<u>CCCAGCACCA</u>
751	<u>CCTGTGGCAG</u>	<u>GACCGTCAGT</u>	<u>CTTCCTCTTC</u>	<u>CCCCCAAAC</u>	<u>CCAAGGACAC</u>
801	<u>CCTCATGATC</u>	<u>TCCCGGACCC</u>	<u>CTGAGGTCAC</u>	<u>GTGCGTGGTG</u>	<u>GTGGACGTGA</u>
851	<u>GCCACGAAGA</u>	<u>CCCCGAGGTC</u>	<u>CAGTTCAACT</u>	<u>GGTACGTGGA</u>	<u>CGGCGTGGAG</u>
901	<u>GTGCATAATG</u>	<u>CCAAGACAAA</u>	<u>GCCACGGGAG</u>	<u>GAGCAGTTCA</u>	<u>ACAGCACGTT</u>
951	<u>CCGTGTGGTC</u>	<u>AGCGTCCTCA</u>	<u>CCGTTGTGCA</u>	<u>CCAGGACTGG</u>	<u>CTGAACGGCA</u>
1001	<u>AGGAGTACAA</u>	<u>GTGCAAGGTC</u>	<u>TCCAACAAAG</u>	<u>GCCTCCAGC</u>	<u>CCCCATCGAG</u>
1051	<u>AAAACCATCT</u>	<u>CCAAAACCAA</u>	<u>AGGGCAGCCC</u>	<u>CGAGAACCAC</u>	<u>AGGTGTACAC</u>
1101	<u>CCTGCCCCCA</u>	<u>TCCCGGGAGG</u>	<u>AGATGACCAA</u>	<u>GAACCAGGTC</u>	<u>AGCCTGACCT</u>
1151	<u>GCCTGGTCAA</u>	<u>AGGCTTCTAC</u>	<u>CCCAGCGACA</u>	<u>TCGCCGTGGA</u>	<u>GTGGGAGAGC</u>
1201	<u>AATGGGCAGC</u>	<u>CGGAGAACAA</u>	<u>CTACAAGACC</u>	<u>ACACCTCCCA</u>	<u>TGCTGGACTC</u>
1251	<u>CGACGGCTCC</u>	<u>TTCTTCCTCT</u>	<u>ACAGCAAGCT</u>	<u>CACCGTGGAC</u>	<u>AAGAGCAGGT</u>
1301	<u>GGCAGCAGGG</u>	<u>GAACGTCTTC</u>	<u>TCATGCTCCG</u>	<u>TGATGCATGA</u>	<u>GGCTCTGCAC</u>
1351	<u>AACCACTACA</u>	<u>CGCAGAAGAG</u>	<u>CCTCTCCCTG</u>	<u>TCTCCGGGTA</u>	<u>AATGATAG</u>

10

20

SEQ ID NO. 52

改変6. 22. 2重鎖アミノ酸配列

1	<u>mefglswvfl</u>	<u>vallrgvqcQ</u>	<u>VQLVESGGGV</u>	<u>VQPGRLRLS</u>	<u>CAASGFTFSS</u>
51	<u>DGMHWVRQAP</u>	<u>GKGLEWVAII</u>	<u>WYDGSNKYYA</u>	<u>DSVKGRFTIS</u>	<u>RDNSKNTLYL</u>
101	<u>QMNSLRAEDT</u>	<u>AVYYCARDPG</u>	<u>YYYGMDVWQ</u>	<u>GTTVTVSSAS</u>	<u>TKGPSVFPLA</u>
151	<u>PCSRSTSEST</u>	<u>AALGCLVKDY</u>	<u>FPEPVTVSWN</u>	<u>SGALTSGVHT</u>	<u>FPAVLQSSGL</u>
201	<u>YSLSSVTVTP</u>	<u>SSNFGTQTYT</u>	<u>CNVDHKPSNT</u>	<u>KVDKTVKRC</u>	<u>CVECPPCPAP</u>
251	<u>PVAGPSVFLF</u>	<u>PPKPKDTLMI</u>	<u>SRTPEVTCVV</u>	<u>VDVSHEDPEV</u>	<u>QFNWYVDGVE</u>
301	<u>VHNAKTKPRE</u>	<u>EQFNSTFRVV</u>	<u>SVLTVVHQDW</u>	<u>LNGKEYKCKV</u>	<u>SNKGLPAPIE</u>
351	<u>KTISKTKGQP</u>	<u>REPQVYTLPP</u>	<u>SREEMTKNOV</u>	<u>SLTCLVKGFY</u>	<u>PSDIAVEWES</u>
401	<u>NGQPENNYKT</u>	<u>TPPMLDS DGS</u>	<u>FFLYSKLTVD</u>	<u>KSRWQQGNVF</u>	<u>SCSVMHEALH</u>
451	<u>NHYTQKSLSL</u>	<u>SPGK</u>			

30

SEQ ID NO. 53

改変6. 22. 2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcttc
51  caggggtGAA ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC
101 CAAAAGAGAA AGTCACCATC ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG AATTGGTAGT
151 AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT CAGTCTCCAA AACTCCTCAT
201 CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG TTCAGTGGCA
251 GTGGATCTGG GACAGATTTC ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA
301 GATGCTGCAA CTATTACTG TCATCAGAGT GGTCGTTTAC CGCTCACTTT
351 CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT GCACCATCTG
401 TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG AACTGCCTCT
451 GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
501 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTACACAG
551 AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG
601 AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA
651 TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGTT
701 AGTGA

```

10

SEQ ID NO. 54

改変6. 22. 2 κ 軽鎖アミノ酸配列

```

1   mlpsqligfl llwvpasrge IVLTQSPDFQ SVTPKEKVTI TCRASQRIGS
51  SLHWYQQKPD QSPKLLIKYA SQSFSGVPSR FSGSGSGTDF TLTINSLEAE
101 DAATYYCHQS GRLPLTFGGG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS
151 VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
201 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC

```

20

SEQ ID NO. 55

改変6. 34. 2重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg
51  ccagtgtCAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTACAC CTTCAGTAGC
151 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 GGCAGTTATA TCAAATGATG GAAATAATAA ATACTATGCA GACTCCGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAAAACAC GCTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGCGCGC TGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATAGTACG GCGATAACCT ACTACTACTA CGGAATGGAC GTCTGGGGCC
401 AAGGGACCAC GGTCAACGTC TCCTCAGCTT CCACCAAGGG CCCATCCGTC
451 TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC TAGAAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT
501 GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCTGTGA
551 ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCCTGCACA CCTTCCCAGC TGTCTACAG
601 TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAA
651 CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA
701 CCAAGGTGGA CAAGACAGTT GAGCGCAAAAT GTTGTGTCTG GTGCCCACCG
751 TGCCCAGCAC CACCTGTGGC AGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA
801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG
851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG
901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
951 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTTGTG CACCAGGACT
1001 GGCTGAACGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCA
1051 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
1151 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA CATCGCCGTG
1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
1251 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CTTTCTTCTT CTACAGCAAG CTCACCGTGG
1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1351 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1401 TAAATGATAG

```

10

20

SEQ ID NO. 56

改変6. 34. 2重鎖アミノ酸配列

```

1   mefglswvfl vallrgvqcQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
51  YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI SNDGNNKYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDST AITYYYGMD VWGQGTTVTV SSASTKGPSV
151 FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
201 SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP
251 CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV
301 DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
351 APIEKTISKI KGQPREPQVY TLPPSRREMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401 EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451 EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

30

SEQ ID NO. 57

改変6. 34. 2 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctgggt
51  ccgaggtgcc agatgtGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT
101 CTGCATCTGT CGGAGACAGA GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGAGT
151 ATTAGTAGCT ATTTAAATTG GTATCAGCAG AAACCAGGGA AAGCCCCTAA
201 GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCGGTTTGAA GCGTGGGGTC CCATCACGGT
251 TCAGTGGTAG TGGATCTGGG ACAGATTTCa CTCTCACCAT CAGTCTCTTG
301 CAACCTGAGG ATTTTGCAAC TTACTACTGT CACCAGAGTT ACAGTCTCCC
351 ATTCACTTTC GGCCCTGGGA CCAAAGTGGA TATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
701 GAGAGTGTTA GTGA

```

10

SEQ ID NO. 58

改変6. 34. 2 κ 軽鎖アミノ酸配列

```

1   mdmrvpaql l gllllwlrga reDIQMTQSP SLSASVGDR VTITCRASQS
51  ISSYLNWYQQ KPGKAPKLLI YAASGLKRGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL
101 QPEDFATYYC HQSYSLPFTF GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201 LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 59

改変6.67.1重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt
51  cctgtcccCAG GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT
101 CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCACGTGCT CTGGTGACTC CATCAGTAGT
151 AACTATTGGA GCTGGATCCG GCAGCCCGCC GGGAAGGGAC TGGAGTGGAT
201 TGGGCGTATC TATACCAGTG GGGGCACCAA CTCCAACCCC TCCCTCAGGG
251 GTCGAGTCAC CATGTCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCTCTGAAA
301 CTGAGTTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCC GTGTATTACT GTGCGAGAGA
351 TCGTATTACT ATAATTCGGG GACTTATTCC ATCCTTCTTT GACTACTGGG
401 GCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCCTCAG CTTCCACCAA GGGCCCATCC
451 GTCTTCCCCC TGGCGCCCTG CTCTAGAAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGC
501 CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT
551 GGAACTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCCTA
601 CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAG
651 CAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCA
701 ACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCCA
751 CCGTGCCCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
801 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCG
851 TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTAC
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCA
951 GTTCAACAGC ACGTTCCTGT TGGTCAGCGT CCTCACCATT GTGCACCAGG
1001 ACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTC
1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGA
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC
1151 AGGTGAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCCAG CGACATCGCC
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACC
1251 TCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
1401 GGGTAAATGA TAG

```

10

20

SEQ ID NO. 60

改変6.67.1重鎖アミノ酸配列

```

1   mkhlwfflll vaaprwlsQ VQLQESGPGL VKPSETLSLT CTVSGDSISS
51  NYWSWIRQPA GKGLEWIGRI YTSGGTNSNP SLRGRVTMSV DTSKNQFSLK
101 LSSVTAADTA VYYCARDRII IIRGLIPSFF DYWGQGTLLV VSSASTKGPS
151 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
201 QSSGLYSLSS VVTVPSSNFG TQTYTCNVDH KPSNTKVDKT VERKCCVECP
251 PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVQFNWY
301 VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVSVLTV VHQDWLNGKE YKCKVSNKGL
351 PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
401 VEWESNGQPE NNYKTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSQSV
451 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

30

SEQ ID NO. 61

改変6. 67. 1 κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggtggttgc agacccaggt cttcatttct ctggttgcctt ggatctctgg
51  tgcctacggg GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT
101 CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA
151 TACAGCTCCA ACAATAAGAA CTAATTAGCT TGGTACCAAC AGAAACCAGG
201 ACAGCCTCCT AAATTGCTCA TTTACTGGGC ATCTATACGG GAATATGGGG
251 TCCCTGACCG ATTCAGTGCG AGCGGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC
301 ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA AGATGTGGCA GTTTATTTCT GTCAACAATA
351 TTATAGTATT CCTCCCTCA CTTTCGGCGG AGGGACCAAG GTGGAGATCA
401 AACGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG
451 CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACCTCTA
501 TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG
551 GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC
601 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA
651 AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA
701 AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGTGA

```

10

SEQ ID NO. 62

改変6. 67. 1 κ 軽鎖アミノ酸配列

```

1   mvlgtqvfis lllwisgayg DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL
51  YSSNNKNYLA WYQQKPGQPP KLLIYWASIR EYGVPRDFSG SGSCTDFTLT
101 ISSLQAEDVA VFYFCQQYYSI PPLTFGGGTK VEIKRTVAAP SVFIFPPSDE
151 QLKSGTASVV CLLNMFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY
201 SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C

```

20

SEQ ID NO. 63

改変6.77.1重鎖ヌクレオチド配列

```

1   atggaactgg ggctccgctg ggtttttcctt gttgctatatt tagaaggtgt
51  ccagtgtGAG GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTCAAGCCTG
101 GGGGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAGTAGC
151 TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT
201 CTCATCCATT AGTAGTAGTA GTAGTTACAT ATACTACGCA GACTCAGTGA
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAACG CCAAGAACTC ACTGTATCTG
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG
351 AGATGGGTAT AGCAGTGGCT GGTCCCTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG
401 TCTGGGGCCA AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAGCTTC CACCAAGGGC
451 CCATCCGTCT TCCCCCTGGC GCCCTGCTCT AGAAGCACCT CCGAGAGCAC
501 AGCGGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA CCGGTGACGG
551 TGTCTGTGGA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCAGCT
601 GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC
651 CTCCAGCAAC TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC
701 CCAGCAACAC CAAGGTGGAC AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTGCGAG
751 TGCCCAACCGT GCCCAGCACC ACCTGTGGCA GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
801 CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
851 CGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCGAGGT CCAGTTCAAC
901 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCACGGGA
951 GGAGCAGTTC AACAGCACGT TCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTTGTGC
1001 ACCAGGACTG GCTGAACGCG AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
1051 GGCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAACCA AAGGGCAGCC
1101 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
1151 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGAC
1201 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
1251 CACACCTCCC ATGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC
1301 TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
1351 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
1401 GTCTCCGGGT AAATGATAG

```

10

20

SEQ ID NO. 64

改変6.77.1重鎖タンパク質配列

```

1   melglrwvfl vailegvqcE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTFSS
51  YSMNWVRQAP GKGLEWVSSI SSSSYIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL
101 QMNSLRAEDT AVYYCARDGY SSGWSYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
201 VLQSSGLYSL SSVVIVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KIVERKCCVE
251 CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN
301 WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK
351 GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
401 IAVEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQGNVFSKS
451 VMHEALHNNH YQKSLSLSPG K

```

30

SEQ ID NO. 65

改変6.77.1κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CTCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 CTTAGTGATG GAAAGACCTA TTTGAATTGG TACCTGCAGA AGCCCGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGGTTT TCTGGAGTGC
251 CAGACAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTATG TGCAGTTTTC GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCTG ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

10

SEQ ID NO. 66

改変6.77.1κ 軽鎖アミノ酸配列

```

1   mrlpaqllgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  LSDGKTYLNW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNR FSGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YSCMQSIQLM SSFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSSLTLISKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

20

SEQ ID NO. 67

改変7.26.4κ 軽鎖ヌクレオチド配列

```

1   atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg
51  atccagtgcg GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCT CTGTCCGTCA
101 CCCCTGGACA GCCGGCCTCC ATCTCCTGCA AGTCTAGTCA GAGCCTCCTG
151 TATAGTGATG GAAAGACCTA TTTGTTTGG TACCTGCAGA AGCCAGGCCA
201 GCCTCCACAG CTCCTGATCT ATGAAGTTTC CAACCGATT C TCTGGAGTGC
251 CAGATAGGTT CAGTGGCAGC GGGTCAGGGA CAGATTTTAC ACTGAAAATC
301 AGCCGGGTGG AGGCTGAGGA TGTGTTGGGTT TATTACTGCA TGCAAAGTAT
351 ACAGCTTCCG TGGACGTTTC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAACGAA
401 CTGTGGCTGC ACCATCTGTC TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG
451 AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG CTGAATAACT TCTATCCCAG
501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA TCGGGTAACT
551 CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
601 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA
651 CGCCTGCGAA GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCCTG ACAAAGAGCT
701 TCAACAGGGG AGAGTGTTAG TGA

```

30

40

SEQ ID NO. 68

改変7.26.4κ 軽鎖アミノ酸配列

```

1   mrlpaqllgl lmlwipgssa DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL
51  YSDGKTYLFW YLQKPGQPPQ LLIYEVSNR FSGVPDRFSGS GSGTDFTLKI
101 SRVEAEDVGV YYCMQSIQLP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL
151 KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL
201 SSSLTLISKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

```

50

【図面の簡単な説明】

【0270】

【図1-1】12個のヒト抗MadCAMモノクローナル抗体の重鎖およびκ軽鎖可変領域の推定アミノ酸配列の、対応するヒト遺伝子の生殖系列アミノ酸配列とのアラインメントである。図1Aは、抗体1.7.2および1.8.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-15遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Bは、抗体6.14.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-23遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Cは、抗体6.22.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-33遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Dは、抗体6.34.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-30遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Eは、抗体6.67.1についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH4-4遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Fは、抗体6.73.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-23遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Gは、抗体6.77.1についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-21遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Hは、抗体7.16.6および7.26.4についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH1-18遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Iは、抗体7.20.5についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH4-4遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Jは、抗体9.8.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-33遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Kは、抗体1.7.2および1.8.2についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA3遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Lは、抗体6.14.2についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトO12遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Mは、抗体6.22.2についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA26遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Nは、抗体6.34.2についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトO12遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Oは、抗体6.67.1についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトB3遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Pは、抗体6.73.2についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトO12遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Qは、抗体6.77.1についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA2遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Rは、抗体7.16.6および7.26.4についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA2遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Sは、抗体7.20.5についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA3遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Tは、抗体9.8.2についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトO18遺伝子産物とのアラインメントを示す。

10

20

30

40

50

【図1-2】12個のヒト抗MadCAMモノクローナル抗体の重鎖およびκ軽鎖可変領域の推定アミノ酸配列の、対応するヒト遺伝子の生殖系列アミノ酸配列とのアラインメントである。図1Aは、抗体1.7.2および1.8.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-15遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Bは、抗体6.14.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-23遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Cは、抗体6.22.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-33遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Dは、抗体6.34.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-30遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Eは、抗体6.67.1についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH4-4遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Fは、抗体6.73.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-23遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Gは、抗体6.77.1についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-21遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Hは、抗体7.16.6および7.26.4についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH1-18遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Iは、抗体7.20.5についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH4-4遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Jは、抗体9.8.2についての重鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトVH3-33遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Kは、抗体1.7.2および1.8.2についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA3遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Lは、抗体6.14.2についてのκ軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖

系列ヒト012遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Mは、抗体6.22.2についての κ 軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA26遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Nは、抗体6.34.2についての κ 軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒト012遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Oは、抗体6.67.1についての κ 軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトB3遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Pは、抗体6.73.2についての κ 軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒト012遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Qは、抗体6.77.1についての κ 軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA2遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Rは、抗体7.16.6および7.26.4についての κ 軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA2遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Sは、抗体7.20.5についての κ 軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒトA3遺伝子産物とのアラインメントを示す。図1Tは、抗体9.8.2についての κ 軽鎖の推定アミノ酸配列の、生殖系列ヒト018遺伝子産物とのアラインメントを示す。

【図2A】ヒト抗MadCAM抗体の推定重鎖および κ 軽鎖アミノ酸配列のCLUSTALアラインメントである。図2Aは、抗MadCAM抗体 κ 軽鎖間の類似性の程度を示す、推定 κ 軽鎖アミノ酸配列のCLUSTALアラインメントおよび放射状樹である。図2Bは、抗MadCAM抗体重鎖間の類似性の程度を示す、推定重鎖アミノ酸配列のCLUSTALアラインメントおよび放射状樹である。

【図2B】ヒト抗MadCAM抗体の推定重鎖および κ 軽鎖アミノ酸配列のCLUSTALアラインメントである。図2Aは、抗MadCAM抗体 κ 軽鎖間の類似性の程度を示す、推定 κ 軽鎖アミノ酸配列のCLUSTALアラインメントおよび放射状樹である。図2Bは、抗MadCAM抗体重鎖間の類似性の程度を示す、推定重鎖アミノ酸配列のCLUSTALアラインメントおよび放射状樹である。

【図3】 $\alpha_4\beta_7$ 結合ドメインを形成するカニクイザルおよびヒトMadCAMの2つのN末端ドメインのアミノ酸配列CLUSTALアラインメントである。 β 鎖は、Tan et al., Structure (1998) 6:793-801により整理されている。

【図4】MadCAMを発現させている凍結ヒト肝臓内皮の切片へのヒト末梢血リンパ球の接着への、精製されたビオチン化1.7.2および7.16.6の用量効果を表すグラフである。

【図5】抗MadCAM抗体、1.7.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.77.1、7.16.6、7.20.5、7.26.4、9.8.2、が結合するMadCAMエピトープの多様性の表7に記録されたデータに基づく2次元グラフ表示を示す。同じ円内の抗MadCAM抗体は、同じ反応性パターンを示す、同じエピトープビンに属する、およびMadCAM上の同じエピトープを認識する可能性が高い。重複している円内の抗MadCAM抗体クローンは、同時に結合することができない、かつ、それゆえに、MadCAM上の重複するエピトープを認識する可能性が高い。統合されていない円は、明確な空間的エピトープの分離をもつ抗MadCAM抗体を表す。

【図6】抗MadCAM抗体1.7.2およびアレクサ488標識7.16.6に関するサンドイッチELISAデータを示し、MadCAM上の異なるエピトープを検出することができる2つの抗体が、診断目的として可溶性MadCAMを検出するために用いられうることを示している。

【図7】カニクイザルモデルにおいて抗MadCAMモノクローナル抗体7.16.6を用いて、対照IgG2aモノクローナル抗体または媒体に対して倍増加として表されている、循環末梢 $\alpha_4\beta_7^+$ リンパ球の数への阻害性抗MadCAM抗体(1 mg/kg)の効果を示す。

【図 1-1】

[illegible]

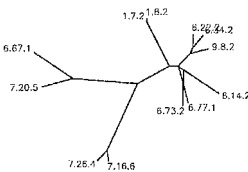
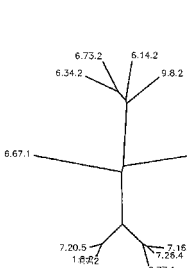
【図 2 A】

[illegible]

【図 1 - 2】

[illegible]

【図 2 B】

[illegible]

【図 3】

メイン 1

カウシイグ *NADCAM*
ヒト *NADCAM*

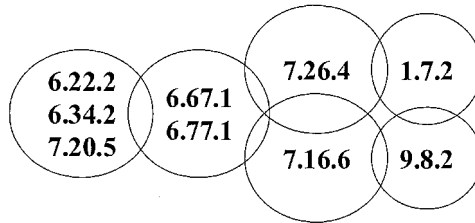
カウシイグ *NADCAM*
ヒト *NADCAM*

メイン 2

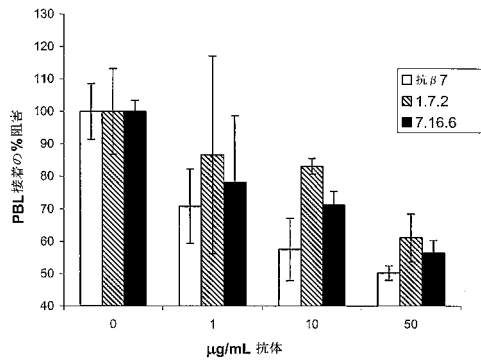
カウシイグ *NADCAM*
ヒト *NADCAM*

カウシイグ *NADCAM*
ヒト *NADCAM*

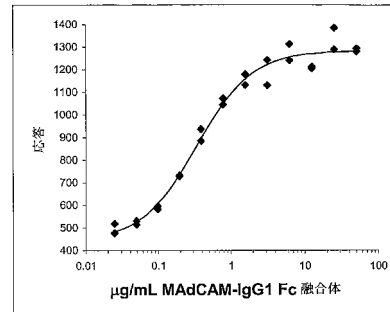
【図 5】



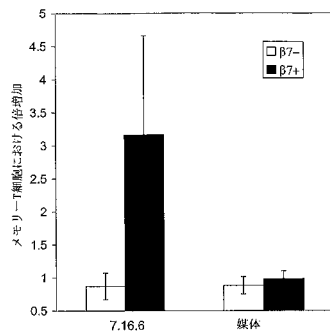
【図 4】



【図 6】



【图 7】



【配列表】

2009005695000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成20年7月4日(2008.7.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

粘膜アドレシン細胞接着分子(MAdCAM)へ特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項2】

以下の性質の少なくとも1つを有する、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体または抗原結合部分：

- (a) ヒト細胞に結合する性質；
- (b) VCAMまたはフィブロネクチンと比較した少なくとも100倍のMAdCAMに対する選択性をもつ性質；
- (c) 3×10^{-10} Mまたはそれ以下のKdでヒトMAdCAMに結合する性質；または
- (d) $\alpha_4 \beta_7$ 発現細胞のヒトMAdCAMへの結合を阻害する性質；
- (e) 胃腸リンパ組織へのリンパ球の補充を阻害する性質。

【請求項3】

3×10^{-10} Mまたはそれ以下のKdでヒトMAdCAMと結合し、かつヒトMAdCAMへの $\alpha_4 \beta_7$ の結合を阻害する、請求項2記載のヒトモノクローナル抗体または抗原結合部分。

【請求項4】

ハイブリドーマが1.7.2(ECACCアクセッション番号03090901)、1.8.2(ECACCアクセッション番号03090902)、6.14.2(ECACCアクセッション番号03090903)、6.22.2(ECACCアクセッション番号03090904)、6.34.2(ECACCアクセッション番号03090905)、6.67.1(ECACCアクセッション番号03090906)、6.73.2(ECACCアクセッション番号03090907)、6.77.1(ECACCアクセッション番号03090908)、7.20.5(ECACCアクセッション番号03090910)、7.26.4(ECACCアクセッション番号03090911)、および9.8.2(ECACCアクセッション番号03090912)からなる群より選択される、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系。

【請求項5】

請求項4記載のハイブリドーマ細胞系により産生されるヒトモノクローナル抗体、または該モノクローナル抗体の抗原結合部分。

【請求項6】

重鎖C末端リシンが切断されている、請求項5記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項7】

抗体または抗原結合部分が、ヒトMAdCAMの $\alpha_4 \beta_7$ への結合を阻害し、かつ抗体またはその部分が以下の性質の少なくとも1つを有し、ここで参照抗体が、モノクローナル抗体1.7.2、モノクローナル抗体1.8.2、モノクローナル抗体6.14.2、モノクローナル抗体6.22.2、モノクローナル抗体6.34.2、モノクローナル抗体6.67.1、モノクローナル抗体6.73.2、モノクローナル抗体6.77.1、モノクローナル抗体7.20.5、モノクローナル抗体7.26.4、モノクローナル抗体9.8.2、モノクローナル抗体6.22.2-mod、モノクローナル抗体6.34.2-mod、モノクローナル抗体6.67.1-mod、モノクローナル抗体6.77.1-modおよびモノクローナル抗体7.26.4-modからなる群より選択される、請求項1または5のいずれか記載のヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分：

- (a) MAdCAMへの結合について参照抗体と交差競合する性質；

- (b) MAdCAMへの結合について参照抗体と競合する性質；
- (c) 参照抗体と同じMAdCAMのエピトープに結合する性質；
- (d) 参照抗体と実質的に同じKdでMAdCAMに結合する性質；
- (e) 参照抗体と実質的に同じ解離速度でMAdCAMに結合する性質

。

【請求項 8】

以下のものからなる群より選択される、MAdCAMと特異的に結合するモノクローナル抗体：

- (a) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:4に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (b) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (c) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:10およびSEQ ID NO:12に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (d) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:14およびSEQ ID NO:16に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (e) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:18およびSEQ ID NO:20に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (f) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:22およびSEQ ID NO:24に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (g) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:26およびSEQ ID NO:28に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (h) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:30およびSEQ ID NO:32に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (i) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:38およびSEQ ID NO:40に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (j) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:42およびSEQ ID NO:44に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (k) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:46およびSEQ ID NO:48に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (l) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:52およびSEQ ID NO:54に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (m) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:56およびSEQ ID NO:58に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (n) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:60およびSEQ ID NO:62に示されたアミノ酸配列を含む抗体；
- (o) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:64およびSEQ ID NO:66に示されたアミノ酸配列を含む抗体；ならびに
- (p) シグナル配列を持たない、SEQ ID NO:42およびSEQ ID NO:68に示されたアミノ酸配列を含む抗体。

【請求項 9】

抗体またはその部分の重鎖が、以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の重鎖CDR1、CDR2およびCDR3を含む、または軽鎖が、以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合部分：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod。

【請求項 10】

ヒトVH 1-18遺伝子、ヒトVH 3-15遺伝子、ヒトVH 3-21遺伝子、ヒトVH 3-23遺伝子、ヒトVH 3-30遺伝子、ヒトVH 3-33遺伝子、またはヒトVH 4-4遺伝子を利用する重鎖を含む、

請求項9記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分。

【請求項 1 1】

ヒトVk A2遺伝子、ヒトVk A3遺伝子、ヒトVk A26遺伝子、ヒトVk B3遺伝子、ヒトVk O12遺伝子、またはヒトVk O18遺伝子を利用する軽鎖を含む、請求項10記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 1 2】

重鎖可変領域、軽鎖可変領域または両方が、以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の対応する領域とアミノ酸配列において少なくとも90%同一である、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体または抗原結合部分：モノクローナル抗体1.7.2、モノクローナル抗体1.8.2、モノクローナル抗体6.14.2、モノクローナル抗体6.22.2、モノクローナル抗体6.34.2、モノクローナル抗体6.67.1、モノクローナル抗体6.73.2、モノクローナル抗体6.77.1、モノクローナル抗体7.20.5、モノクローナル抗体7.26.4、モノクローナル抗体9.8.2、モノクローナル抗体6.22.2-mod、モノクローナル抗体6.34.2-mod、モノクローナル抗体6.67.1-mod、モノクローナル抗体6.77.1-modおよびモノクローナル抗体7.26.4-mod。

【請求項 1 3】

以下である、MAdCAMと特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分：
(a) 重鎖が、以下のものからなる群より選択される参照抗体の重鎖CDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列を含む：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod；
(b) 軽鎖が、以下のものからなる群より選択される参照抗体の軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列を含む：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod；
(c) 抗体が、(a)の重鎖および(b)の軽鎖を含む；ならびに
(d) 重鎖および軽鎖CDRアミノ酸配列が同じ参照抗体から選択される、(c)の抗体。

【請求項 1 4】

重鎖、軽鎖または両方が、参照抗体の、それぞれ、重鎖、軽鎖または両方のCDR1の始まりからCDR3の終わりまでのアミノ酸配列を含む、請求項13記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分。

【請求項 1 5】

抗体が以下のものを含む、請求項13記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分：
(a) 以下のものからなる群より選択される抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列を含む重鎖：1.7.2(SEQ ID NO:2)；1.8.2(SEQ ID NO:6)；6.14.2(SEQ ID NO:10)；6.22.2(SEQ ID NO:14)；6.34.2(SEQ ID NO:18)；6.67.1(SEQ ID NO:22)；6.73.2(SEQ ID NO:26)；6.77.1(SEQ ID NO:30)；7.20.5(SEQ ID NO:38)；7.26.4(SEQ ID NO:42)；および9.8.2(SEQ ID NO:46)；6.22.2-mod(SEQ ID NO:52)；6.34.2-mod(SEQ ID NO:56)；6.67.1-mod(SEQ ID NO:60)；6.77.1-mod(SEQ ID NO:64)；および7.26.4-mod(SEQ ID NO:42)；
(b) 以下のものからなる群より選択される抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む軽鎖：1.7.2(SEQ ID NO:4)；1.8.2(SEQ ID NO:8)；6.14.2(SEQ ID NO:12)；6.22.2(SEQ ID NO:16)；6.34.2(SEQ ID NO:20)；6.67.1(SEQ ID NO:24)；6.73.2(SEQ ID NO:28)；6.77.1(SEQ ID NO:32)；7.20.5(SEQ ID NO:40)；7.26.4(SEQ ID NO:44)；および9.8.2(SEQ ID NO:48)；6.22.2-mod(SEQ ID NO:54)；6.34.2-mod(SEQ ID NO:58)；6.67.1-mod(SEQ ID NO:62)；6.77.1-mod(SEQ ID NO:66)；および7.26.4-mod(SEQ ID NO:68)；または
(c) (a)の重鎖および(b)の軽鎖。

【請求項 1 6】

免疫グロブリンG(IgG)、IgM、IgE、およびIgAもしくはIgD分子、ヒト化抗体、キメラ抗体または二重特異性抗体である、請求項1～3および請求項5～15のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 17】

Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片または一本鎖抗体である、請求項1～3、5～7および9～16のいずれか一項記載の抗原結合部分。

【請求項 18】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分の有効量および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物。

【請求項 19】

炎症性疾患を、処置を必要としている被験者において処置する方法であって、請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を該被験者へ投与する段階を含み、該抗体または抗原結合部分がMAdCAMの $\alpha_4\beta_7$ への結合を阻害する、方法。

【請求項 20】

炎症性疾患が胃腸管の炎症性疾患である、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

胃腸管の炎症性疾患が、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、憩室疾患、胃炎、肝臓疾患、原発性胆汁性硬化症および硬化性胆管炎からなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

炎症性腸疾患が、クローン病、潰瘍性大腸炎または両方である、請求項20記載の方法。

【請求項 23】

炎症性疾患がインスリン依存性糖尿病および移植片対宿主病である、請求項20記載の方法。

【請求項 24】

請求項1～3および5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分、または該抗体もしくは該その部分の重鎖もしくは軽鎖を産生する単離された細胞系。

【請求項 25】

1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.20.5、7.26.4、および9.8.2からなる群より選択される抗体、または該抗体の1つのアミノ酸配列を含む抗体を産生する、請求項4または24のいずれか記載の細胞系。

【請求項 26】

6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-modからなる群より選択されるモノクローナル抗体、または該抗体の1つのアミノ酸配列を含む抗体を産生する、請求項25記載の細胞系。

【請求項 27】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載の抗体の重鎖もしくはその抗原結合部分、または軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 28】

核酸分子に機能的に連結された発現制御配列を任意で含む、請求項27記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 29】

請求項28記載のベクターまたは請求項27記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 30】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載の抗体または抗原結合部分の、重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子、ならびに軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子を含む、請求項29記載の宿主細胞。

【請求項 31】

MAdCAMと特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を作製する方法であって、請求項29もしくは30記載の宿主細胞または請求項4もしくは24のいずれか記載の細胞系に適した条件下で培養する段階、および該抗体または抗原結合部分を回収す

る段階を含む、方法。

【請求項 3 2】

請求項1～3または5～17のいずれか一項記載の抗体の、(a)重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子；(b)軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子；または(c)(a)および(b)の両方を含む、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物であって、該重鎖または軽鎖または両方を発現させる、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物。

【請求項 3 3】

請求項32記載の非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物から抗体を単離する段階を含む、MAdCAMへ特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を単離する方法。

【請求項 3 4】

以下の段階を含む、MAdCAMへ特異的に結合し、かつ $\alpha_4\beta_7$ への結合を阻害する、ヒト抗体またはその抗原結合部分で処置を必要としている被験者を処置する方法：

(a)重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子、軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子、または軽鎖および重鎖またはそれらの抗原結合部分をコードする核酸分子の有効量を投与する段階；および

(b)核酸分子を発現させる段階。

【請求項 3 5】

以下の段階を含む、MAdCAMと特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を産生するための方法：

(a)ヒト抗体を産生する能力がある非ヒトトランスジェニック動物をMAdCAMで、MAdCAMの免疫原性部分で、またはMAdCAMを発現させる細胞もしくは組織で、免疫する段階；および

(b)トランスジェニック動物をMAdCAMに対する免疫応答を開始するようにさせておく段階

。

【請求項 3 6】

請求項35記載の方法により産生されるヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3 7】

ヒトMAdCAMを発現させる細胞への $\alpha_4\beta_7$ の結合を阻害する方法であって、請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分とその細胞を接触させる段階を含む、方法。

【請求項 3 8】

MAdCAM媒介性白血球内皮細胞接着を阻害するための方法であって、請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分とその内皮細胞を接触させる段階を含む、方法。

【請求項 3 9】

組織へのMAdCAM媒介性白血球の接着、遊走および浸潤を阻害するための方法であって、請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分とその内皮細胞を接触させる段階を含む、方法。

【請求項 4 0】

ヒトMAdCAMを発現させる細胞を請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と接触させる段階を含む、 $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM依存性細胞接着を阻害するための方法。

【請求項 4 1】

ヒトMAdCAMを発現させる細胞を請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と接触させる段階を含む、リンパ球の胃腸リンパ組織へのMAdCAM媒介性補充を阻害するための方法。

【請求項 4 2】

MAdCAMと特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、以下のものからなる群より選択されるヒトモノクローナル抗体のFR1、FR2、FR3もしくはFR4ア

ミノ酸配列の1つまたは複数を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合部分：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod。

【請求項 4 3】

抗体が以下のものを含む、請求項1記載のヒトモノクローナル抗体または抗原結合部分：

(a)以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の重鎖アミノ酸配列と少なくとも90%同一である重鎖アミノ酸配列：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod；

(b)以下のものからなる群より選択されるモノクローナル抗体の軽鎖アミノ酸配列と少なくとも90%同一である軽鎖アミノ酸配列：1.7.2、1.8.2、6.14.2、6.22.2、6.34.2、6.67.1、6.73.2、6.77.1、7.20.5、7.26.4、9.8.2、6.22.2-mod、6.34.2-mod、6.67.1-mod、6.77.1-modおよび7.26.4-mod；

(c)(a)および(b)の両方；または

(d)シグナル配列を持つもしくは持たない(a)、(b)または(c)のいずれか。

【請求項 4 4】

以下の段階を含む、循環している可溶性ヒトMAdCAMを特徴とする疾患を診断するための方法：(1)生体試料を請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分と接触させる段階、ならびに(2)結合を検出する段階。

【請求項 4 5】

以下の段階を含む、被験者において炎症を検出するための方法：(1)請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分を該被験者へ投与する段階であって、該抗体またはその部分が検出可能に標識されている、段階、ならびに(2)結合を検出する段階。

【請求項 4 6】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のモノクローナル抗体または抗原結合部分を含む診断キット。

【請求項 4 7】

1つもしくは複数の追加の抗炎症性剤または免疫調節剤をさらに含む、請求項18記載の薬学的組成物。

【請求項 4 8】

1つもしくは複数の追加の抗炎症性剤または免疫調節剤が以下のものからなる群より選択される、請求項47記載の薬学的組成物：コルチコステロイド、アミノサリチラート、アザチオプリン、メトトレキセート、シクロスポリン、FK506、IL-10、GM-CSF、ラパマイシン、抗TNF α 剤、および接着分子アンタゴニスト。

【請求項 4 9】

請求項1～3および請求項5～17のいずれか一項記載のヒト抗体または抗原結合部分の有効量ならびに薬学的に許容される担体を含むワクチン。

【請求項 5 0】

ワクチンが粘膜性である、請求項49記載のワクチン。

【請求項 5 1】

以下の段階を含む、阻害性抗MAdCAM抗体またはその抗原結合部分の被験者への投与の効果を検出する方法：

(a)MAdCAMへ特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を被験者へ投与する段階；および
(b)循環している $\alpha_4\beta_7$ 発現白血球のレベルにおける増加があるかどうかを測定する段階。

【請求項 5 2】

白血球がリンパ球である、請求項51記載の方法。

【請求項 5 3】

循環している $\alpha_4\beta_7$ 発現白血球のレベルにおける増加がFACS分析により測定される、請求項51記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 5/06 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/711 (2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/08 (2006.01)
 A 6 1 P 17/04 (2006.01)
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 13/10 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/14 (2006.01)
 A 6 1 P 1/18 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 P 3/02 (2006.01)
 A 6 1 P 31/14 (2006.01)
 A 6 1 P 1/12 (2006.01)
 A 6 1 P 1/02 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)
 A 6 1 P 5/14 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 17/02 (2006.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)
 G 0 1 N 33/577 (2006.01)
 C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 1 2 P 21/08
 C 1 2 N 5/00 B
 C 1 2 N 5/00 E
 C 1 2 Q 1/02
 C 0 7 K 16/28
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 31/711
 A 6 1 K 39/00 H
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 37/08
 A 6 1 P 17/04
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 9/10 1 0 1
 A 6 1 P 13/10
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 29/00 1 0 1
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 9/14
 A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 3/02 1 0 4
 A 6 1 P 31/14
 A 6 1 P 1/12
 A 6 1 P 1/02
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 5/14
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 17/02
 G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/577 B
 C 0 7 K 14/705

4 C 0 8 4
 4 C 0 8 5
 4 C 0 8 6
 4 H 0 4 5

(72)発明者 プーレン ニコラス

英国 ケント サンドウィッチ ラムズゲート ロード ファイザー グローバル リサーチ ア

ンド ディベロップメント内

(72)発明者 モロイ エリザベス

英国 ケント サンドウィッチ ラムズゲート ロード ファイザー グローバル リサーチ ア
ンド ディベロップメント内

(72)発明者 ケラーマン シリッド - エイミー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 メンロ パーク アルマノア アベニュー 1000

(72)発明者 グリーン ラリー エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ ヒル ストリート 464

(72)発明者 ハーク - フレンドショー メリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ニューアーク ウィロー プレイス 8472

F ターム(参考) 2B030 AD08

4B024	AA01	AA03	AA11	AA20	BA31	BA44	BA53	BA61	CA02	CA04
	CA20	DA02	EA04	GA03	GA11	GA18	HA03	HA11	HA20	
4B063	QA01	QA05	QQ02	QQ08	QQ79	QQ91	QR72	QR77	QS36	QS39
	QX01									
4B064	AG01	AG26	AG27	CA01	CA10	CA19	CA20	CC01	CC24	DA01
	DA13									
4B065	AA01X	AA58X	AA72X	AA87X	AA90X	AA91X	AA91Y	AA93Y	AB01	AB05
	AC14	BA02	BA08	BA24	CA24	CA25	CA43	CA44	CA46	
4C084	AA13	MA17	MA66	NA14	ZA01	ZA02	ZA33	ZA36	ZA45	ZA59
	ZA66	ZA67	ZA68	ZA69	ZA73	ZA75	ZA81	ZA89	ZA96	ZB05
	ZB08	ZB11	ZB13	ZB15	ZB26	ZB31	ZB33	ZC06	ZC24	ZC35
	ZC42	ZC75								
4C085	AA03	AA14	CC03	CC04	CC05	DD01	DD62	EE01	GG01	
4C086	AA01	AA02	EA17	EA18	MA02	MA05	MA17	MA66	NA14	ZA01
	ZA02	ZA33	ZA36	ZA45	ZA59	ZA66	ZA67	ZA68	ZA69	ZA73
	ZA75	ZA81	ZA89	ZA96	ZB05	ZB08	ZB11	ZB13	ZB15	ZB26
	ZB31	ZB33	ZC06	ZC24	ZC35	ZC42	ZC75			
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA75	DA76	DA86
	EA20	EA50	FA72	FA74						