

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4764627号
(P4764627)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月17日(2011.6.17)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/30 (2006.01)

C O 7 K 16/30

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

請求項の数 37 (全 106 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-506723 (P2004-506723)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月22日(2003.5.22)
 (65) 公表番号 特表2006-505244 (P2006-505244A)
 (43) 公表日 平成18年2月16日(2006.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2003/000425
 (87) 国際公開番号 W02003/099196
 (87) 国際公開日 平成15年12月4日(2003.12.4)
 審査請求日 平成18年5月9日(2006.5.9)
 (31) 優先権主張番号 149820
 (32) 優先日 平成14年5月23日(2002.5.23)
 (33) 優先権主張国 イスラエル(IL)

前置審査

(73) 特許権者 504431304
 キュアー テック リミテッド
 イスラエル国、8 1 2 2 7 ヤヴン、ヘ
 イヤルコン ストリート 4 2
 (73) 特許権者 504431289
 モル リサーチ アプリケーションズ
 リミテッド
 イスラエル国、4 9 1 7 0 ペタフ ティ
 クバ、キリヤッド マタロン、ハシヴィ
 ム ストリート 2 3
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新生物疾患又は免疫不全を処置するためのヒト化免疫調節性モノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ネズミモノクローナル抗体 B A T - 1 (m B A T - 1) の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (C D R) とアクセプターヒト免疫グロブリン由来のフレームワーク領域 (F R) とを有するヒト化モノクローナル抗体であって、

該ヒト化抗体が、m B A T - 1 モノクローナル抗体の抗腫瘍活性を保っており、ヒト対象において該ネズミ抗体よりも免疫原性が低く、

該ヒト化モノクローナル抗体は、B A T R H_A / B A T R_A (配列番号 2 0 / 配列番号 1 5)、B A T R H_B / B A T R_A (配列番号 2 1 / 配列番号 1 5)、B A T R H_B / B A T R_B (配列番号 2 1 / 配列番号 1 6)、B A T R H_C / B A T R_B (配列番号 2 2 / 配列番号 1 6)、B A T R H_B / B A T R_D (配列番号 2 1 / 配列番号 1 8)、及び B A T R H_C / B A T R_D (配列番号 2 2 / 配列番号 1 8) からなる群から選択される可変領域を含む、上記ヒト化モノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記ヒト化抗体が前記親ネズミ B A T - 1 抗体よりも大きな抗腫瘍効果を誘発させる、請求項 1 に記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項 3】

前記ヒト化抗体が、ネズミ B A T - 1 モノクローナル抗体よりも大きな転移抑制効果を誘発させる、請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 4】

前記抗体が完全長抗体である請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 5】

前記抗体がアイソタイプ I g G である請求項 4 に記載のヒト化抗体。

【請求項 6】

前記アイソタイプサブクラスが I g G 1 又は I g G 4 から選択される、請求項 5 に記載のヒト化抗体。

【請求項 7】

ヒト 定常領域を有する請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のヒト化抗体の断片であって、該断片が F v、F (a b ')、F (a b ')₂ 及び単鎖抗体からなる群から選択される、上記断片。 10

【請求項 9】

前記抗体が、さらに検出可能な標識で標識されているか、固相上に固定されているか、又は外来化合物に結合されている、請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 10】

前記ヒト化抗体が、ネズミ B A T - 1 モノクローナル抗体よりも大きな抗腫瘍効果を誘発させる、請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 11】

C D R 移植を利用して組換え D N A 技術によって作製した請求項 1 に記載の抗体。 20

【請求項 12】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片をコードしている単離したポリヌクレオチド構築体。

【請求項 13】

配列番号 8 7、配列番号 8 8、配列番号 8 9 からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 1 2 に記載の単離したポリヌクレオチド構築体。

【請求項 14】

配列番号 9 0、配列番号 9 1、配列番号 9 2 からなる群から選択される核酸配列を含有する、請求項 1 2 に記載の単離したポリヌクレオチド構築体。

【請求項 15】

請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。 30

【請求項 16】

前記抗体をコードしているポリヌクレオチドに発現可能に連結されたプロモーター、1 つ又は複数の耐性遺伝子、コザック配列、複製起点、1 つ又は複数の選択マーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、転写ターミネーター、シグナルペプチド、ゲノムヒト 定常領域、ゲノムヒト I g G 定常領域からなる群から選択される構成要素をコードしている少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 5 に記載のベクター。

【請求項 17】

前記ベクターがプラスミド又はウイルスを含む、請求項 1 6 に記載のベクター。

【請求項 18】

プラスミドが、p G 1 D 1 1 0 - B A T R H_A ; p G 1 D 1 1 0 - B A T R H_B ; p G 1 D 1 1 0 - B A T R H_C ; p G 1 D 2 1 0 . B A T - 1 . R H_C ; p G 4 D 1 1 0 . B A T - 1 . R H_C ; 及び p K N 1 1 0 . B A T - 1 . R K_D からなる群から選択される、請求項 1 7 に記載のベクター。 40

【請求項 19】

配列番号 9 3 のポリヌクレオチド配列を含む請求項 1 5 に記載のベクター。

【請求項 20】

請求項 1 5 ~ 1 9 までのいずれか 1 項に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 21】

抗体又はその断片を発現する能力を有する請求項 2 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 22】

前記細胞が真核細胞及び原核細胞から選択される、請求項 2 0に記載の宿主細胞。

【請求項 2 3】

C H O、C H O d h f r、N S O、C O S 及び C O S 7 細胞からなる群から選択される、請求項 2 0に記載の宿主細胞。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 1 1のいずれか 1 項に記載の抗体又は抗体断片を活性成分として含む薬剤組成物。

【請求項 2 5】

生理的に許容される担体、希釈剤、又は安定剤をさらに含む、請求項 2 4に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 6】

サイトカイン、I L - 1 (インターロイキン - 1)、I L - 2、I L - 6、I F N - (インターフェロン -)、細胞ワクチン、抗体、T 細胞刺激抗体、及び抗腫瘍治療用抗体からなる群から選択される追加の治療剤をさらに含む、請求項 2 4 又は 2 5に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 7】

癌を処置するための、請求項 2 4 ~ 2 6のいずれか 1 項に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 8】

前記癌が黒色腫、肺腫瘍、結腸直腸癌又は肝転移から選択される、請求項 2 7に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 9】

(i) 前記抗体をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを用いて宿主細胞を形質移入させること、又はそれぞれが前記抗体の重鎖若しくは軽鎖領域をコードしているポリヌクレオチド配列を含む 2 つのベクターを用いて前記宿主細胞を同時形質移入させること；

(i i) 前記抗体が発現されるように (i) の宿主細胞を培養すること；及び

(i i i) (i i) の宿主細胞培養物から前記抗体を回収すること

を含む、請求項 1 ~ 1 1のいずれか 1 項に記載の抗体を産生させる方法。

【請求項 3 0】

C D 4 + T 細胞の増殖活性を誘導するための、請求項 2 4 ~ 2 6のいずれか 1 項に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 1】

活性化 C D 4 + T 細胞の生存率を増加させる (i n c r e a s i n g t h e s u r v i v a l) ための、請求項 2 4 ~ 2 6のいずれか 1 項に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 2】

請求項 1 ~ 1 1のいずれか 1 項に記載のヒト化モノクローナル抗体に、e x v i v o で活性化 T 細胞を接触させることを含む、活性化 C D 4 + T 細胞の生存率を増加させる方法。

【請求項 3 3】

癌を治療するための、請求項 3 0 又は 3 1に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 4】

C D 4 + T 細胞の減少に関連する遺伝性又は後天性の免疫不全症の症状を緩和するための、請求項 3 0 又は 3 1に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 5】

H I V 感染の初期段階の症状を緩和するための、請求項 3 4に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 6】

後天性免疫不全症候群 (A I D S) の症状を緩和するための、請求項 3 4に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 7】

前記癌が C D 4 + T 細胞の減少を示す血球数を有する患者中に存在する、請求項 3 3に

10

20

30

40

50

記載の薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫療法の分野に関し、より詳細には、本発明は、様々な症状の治療、特に癌の処置に有用なヒト化モノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

様々な形態の癌は、ヒトの主な死亡原因である。癌において最も幅広く使用されている治療的処置は、手術、放射線療法及び化学療法である。近年の免疫制御の分子レベル及び細胞レベルの知識の急増、特にT細胞応答レベルでの知識の急増が、腫瘍ワクチンの開発を含めた免疫療法的手法の新しい宝庫を提供している。一部のモノクローナル抗体(mAb)は、T細胞の表面上の決定基に結合する能力及びこれらの細胞の増殖、活性化又は分化を誘導する能力を含む免疫調節性活性を有することが示されている。

【0003】

マウスハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体は、ヒト患者に注入された時に免疫原性のアミノ酸配列のストレッチを相当量含んでおり、しばしば、初回処置後の抗体の治療効果を消失する。いわゆる「キメラ抗体」(即ちヒト定常領域に結合したマウス可変領域)の産生が多少有用であることが示されたが、顕著な免疫原性の障害が依然として残ったままである。

【0004】

ドナーのマウス又はラット免疫グロブリン由来の相補性決定領域(CDR)と組み合わせたヒトフレームワーク領域(FR)を含む免疫グロブリンを産生させるために、組換えDNA技術が利用されてきた。このような新しいタンパク質は「再構成」又は「ヒト化」免疫グロブリンと呼ばれ、ドナー免疫グロブリンのCDRをヒトフレームワークと組み合わせてヒト様免疫グロブリンに変換するプロセスは「ヒト化」と呼ばれる。ヒト化抗体は、元の抗体と同じ抗原に結合するがヒトに注射した際に免疫原性がより低いので重要である。

【0005】

米国特許第6,294,654号は、改変免疫グロブリン分子或いはその(Ig)機能的断片又は一部を開示しており、これらは1つ又は複数の非CDRループに組み込まれている、Igに対する外来抗原性ペプチドを有しており、定常ドメインの主な骨格が維持されている。さらに、治療用途又は予防用途における改変抗体の使用が開示されている。

【0006】

米国特許第6,074,635号は、抗原の非存在下で、T細胞を、インターロイキン-2、インターロイキン-6、及び腫瘍壊死因子 からなる群から選択される少なくとも2つのサイトカインの組合せ、又は機能的に等価なその断片と接触させることを含む、T細胞をin vitroで抗原に依存せずに活性化させる方法を開示している。

【0007】

米国特許第5,658,741号は、T細胞の活性化及び増殖を誘発させる方法であって、(a)複数のT細胞特異的モノクローナル抗体を、7~20重量%のアミン基を有し分子量が少なくとも100,000ダルトンのアミノデキストラン分子と、前記抗体と前記アミノデキストランとのモル比2以上で結合させ；(b)前記結合体と前記T細胞を含む試料とを反応させて、前記結合させた抗体を前記T細胞に結合させ、前記T細胞の活性化及び増殖を誘発させる、ことを含む方法を開示している。

【0008】

Queen他の米国特許第5,585,089号は、少なくとも $10^{-7} M^{-1}$ 且つドナー免疫グロブリンの約4倍未満の親和性定数で抗原に特異的に結合する、ドナー免疫グロブリン由来の相補性決定領域(CDR)と、ヒトアクセプター免疫グロブリン重鎖及び軽鎖由来の重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークとを有するヒト化免疫グロブリンであって

10

20

30

40

50

、前記ヒト化免疫グロブリンはカバット (K a b a t) 及びコーチア (C h o t h i a) C D R の外にあるドナー免疫グロブリンフレームワーク由来のアミノ酸を含み、ドナーアミノ酸がアクセプター免疫グロブリン重鎖又は軽鎖フレームワーク中の対応するアミノ酸を置換しており、前記ドナーアミノ酸のそれぞれが (I) ドナー免疫グロブリン配列内の C D R に隣接している、又は (I I) 前記ヒト化免疫グロブリン中の C D R の原子を 4 の距離内に含んでいる、ヒト化免疫グロブリンを開示している。

【 0 0 0 9 】

W i n t e r の米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号は、抗体の可変ドメイン又はその抗原結合断片が第 1 の免疫グロブリン重鎖又は軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域と第 2 の免疫グロブリン重鎖又は軽鎖可変ドメインの相補性決定領域とを有しており、前記第 2 の免疫グロブリン重鎖又は軽鎖可変ドメインの抗原結合特異性、抗原結合親和性、種、クラス又はサブクラスが前記第 1 の免疫グロブリン重鎖又は軽鎖可変ドメインとは異なっている、改変型抗体又はその抗原結合断片を開示している。

10

【 0 0 1 0 】

米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号及び米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号は、当業者が改変型抗体、特にヒト化抗体の合成を実施するために十分な手段も、包括的な説明も提供していない。

【 0 0 1 1 】

本明細書中に参考として組み込まれる、本発明の発明者の 1 人による米国特許第 5 , 8 9 7 , 8 6 2 号は、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であって、 (i) C o l l e c t i o n N a t i o n a l e d e C u l t u r e s d e M i c r o o r g a n i s m e s (C N C M) に寄託番号 I - 1 3 9 7 号として寄託されているハイブリドーマ細胞系に分泌されている、又は (i i) (i) の抗体と同じ抗原性エピトープを認識するモノクローナル抗体、或いはその抗原結合断片を開示している。米国特許第 5 , 8 9 7 , 8 6 2 号に開示されているモノクローナル抗体は、ヒト B リンパ芽球腫細胞系である「ダウディ」細胞に対するものであり、ネズミリンパ球及びヒト末梢血 T 細胞を刺激することが示されている (H a r d y 他、C e l l I m m u n o l . , 1 1 8 : 2 2 , 1 9 8 9) 。このネズミ抗体は、本明細書中でも以降 m B A T - 1 と呼ぶ。m B A T - 1 はまた、ヒト起源の腫瘍 (H a r d y 他、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 4 : 5 7 5 6 , 1 9 9 7) を含めた様々な腫瘍型で抗腫瘍性及び免疫賦活活性効果を示す (H a r d y 他、I n t . J . O n c o l . , 1 9 : 8 9 7 , 2 0 0 1) 。

20

30

【 0 0 1 2 】

本明細書中に参考として組み込まれる、本発明の発明者の 1 人による国際公開公報 W O 0 0 / 5 8 3 6 3 号は、m B A T - 1 の重鎖可変領域及び / 又は 軽鎖可変領域、或いは m B A T - 1 の重鎖可変領域及び / 又は 軽鎖可変領域に少なくとも 7 0 % 同一である重鎖可変領域及び / 又は 軽鎖可変領域を含む可変領域を有するモノクローナル抗体を開示している。

【 0 0 1 3 】

ネズミ由来の C D R とヒト由来の F R とを含むヒト化モノクローナル抗体が免疫応答性を誘発し得、さらに抗癌活性を示し得ることは、背景技術のどこにも教示も示唆もされていない。さらに、本発明のヒト化抗体の合成が背景技術に基づき予想することも定期的に行うこともできないことは当分野で周知であるので、機能的なヒト化抗体を設計する信頼できる方法の必要性は未だ満たされていない。

40

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 4 】

本発明の目的は、B リンパ芽球腫細胞に結合して末梢血リンパ球の増殖及び活性化を誘発させる、ヒト化モノクローナル免疫調節性抗体 (本明細書中で以降 h B A T - 1 と呼ぶ) を提供することである。当該 h B A T - 1 は、B リンパ芽球腫細胞に結合して末梢血リンパ球の増殖及び活性化を誘発させ、さらに腫瘍を有する対象に注入した場合に抗腫瘍効

50

果を誘発させる、既知のネズミモノクローナル免疫調節性抗体（本明細書中で以降 m B A T - 1 と呼ぶ）に基づいている。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、m B A T - 1 のヒト化方法の包括的な説明及び各合成ステップの原理を提供する。したがって本発明で提供するヒト化方法の説明は、当業者による m B A T - 1 以外の B A T 抗体のヒト化にも適している。

【0016】

ヒト化 B A T - 1 抗体を投与することにより、癌の治療的予防、検出又は処置方法が提供される。本発明によって提供される B A T - 1 抗体のヒト化形態を用いた、それを必要としている対象の処置は、キメラ B A T - 1 抗体を用いた処置よりも相当に有効であり、有害な免疫原性応答が避けられる。

10

【0017】

本発明は、一部、ヒト化 B A T - 1 抗体が親ネズミ B A T - 1 抗体に誘発される抗腫瘍効果よりも大きな効果を誘発しているようであるという予想外の発見に基づいている。

【0018】

第一態様によれば、本発明は、ドナー免疫グロブリン由来の少なくとも1つの C D R とアクセプター免疫グロブリン由来の F R とを含むヒト化モノクローナル抗体を提供する。

【0019】

一実施形態によれば、本発明は、ドナー免疫グロブリン由来の少なくとも1つの C D R とアクセプター免疫グロブリン由来の F R とを含むヒト化モノクローナル免疫調節性抗体を提供する。

20

【0020】

別の実施形態によれば、本発明は、C D R のドナーがネズミモノクローナル B A T - 1 抗体（m B A T - 1）であるモノクローナル免疫調節性抗体を提供する。

【0021】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、F R が由来するアクセプターがヒト免疫グロブリンであるモノクローナル免疫調節性抗体を提供する。

【0022】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、ヒト化抗体が m B A T - 1 モノクローナル抗体の生物活性を保持しており、ヒト対象において前記ネズミ抗体よりも免疫原性が低い、ドナーネズミモノクローナル B A T - 1 抗体（m B A T - 1）由来の少なくとも1つの C D R とアクセプターヒト免疫グロブリン由来の F R とを含むモノクローナル免疫調節性抗体を提供する。

30

【0023】

さらに別の実施形態によれば、ヒト化 B A T - 1 抗体の軽鎖可変領域は以下の式によって特徴付けられる：

$$F R_{L1} - C D R_{L1} - F R_{L2} - C D R_{L2} - F R_{L3} - C D R_{L3} - F R_{L4}$$
（式中、各 F R はそれぞれ独立にヒト抗体のフレームワーク領域であり、各 C D R はそれぞれ独立にモノクローナル m B A T - 1 抗体の相補性決定領域である）。

40

【0024】

さらに別の実施形態によれば、ヒト化 B A T - 1 抗体の重鎖可変領域は以下の式によって特徴付けられる：

$$F R_{H1} - C D R_{H1} - F R_{H2} - C D R_{H2} - F R_{H3} - C D R_{H3} - F R_{H4}$$
（式中、各 F R はそれぞれ独立にヒト抗体のフレームワーク領域であり、各 C D R はそれぞれ独立にモノクローナル m B A T - 1 抗体の相補性決定領域である）。

【0025】

特定の実施形態によれば、本発明は、ヒト T E L 9 抗体の軽鎖可変領域由来の F R を含むモノクローナル抗体を提供する。

【0026】

50

別の特定の実施形態によれば、本発明は、 FR_{L1} 、[EIVLT QSPSS LSASV GDRVITTC；配列番号1]； FR_{L2} 、[W(F又はY)QQKPGKAPKL(W又はL)IY；配列番号2]； FR_{L3} 、[GVPSR FSGSGSGT(D又はS)(Y又はF)(C又はT)LTINS LQPED FATYY C；配列番号3]； FR_{L4} 、[FGGGT KLEIK；配列番号4]からなる群から選択される、ヒトTEEL9抗体の軽鎖可変領域由来のFRアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体を提供する。

【0027】

さらに別の特定の実施形態によれば、本発明は、ヒトhshv1295抗体の重鎖可変領域由来のFRを含むモノクローナル抗体を提供する。

10

【0028】

さらに別の特定の実施形態によれば、本発明は、 FR_{H1} 、[Q(I又はV)QLVQSGSE LKKPG ASVKI SCKAS GY(T又はS)F(T又はS)；配列番号5]； FR_{H2} 、[WV(R又はK)QAPGQ GL(Q又はK)WMG；配列番号6]； FR_{H3} 、[RF(V又はA)FSLDT SV(N又はS)TAYLQ ITSL(T又はN)AEDTG MYFC(V又はA)(R又はK)；配列番号7]； FR_{H4} 、[WGQGT LVTVS S；配列番号8]からなる群から選択される、ヒトhshv1295抗体の重鎖可変領域由来のFRアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体を提供する。

【0029】

20

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、 CDR_{L1} [SARSS VSYMH；配列番号9]； CDR_{L2} [RTSNL AS；配列番号10]； CDR_{L3} [QQRSS FPLT；配列番号11]からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体を提供する（式中、CDRはネズミBAT-1抗体に由来し、下付き文字「L」及び「H」はそれぞれ重鎖及び軽鎖領域を意味する）。

【0030】

さらに別の特定の実施形態によれば、本発明は、 CDR_{H1} [NYGMN；配列番号12]； CDR_{H2} [WINTD SGEST YAEFF KG；配列番号13]； CDR_{H3} [VG YDA LDY；配列番号14]からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体を提供する。

30

【0031】

さらに別の実施形態によれば、本発明のヒト化モノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン定常領域を有する完全長抗体、モノクローナルIgG、特にサブクラス 1又は 4のもの、単鎖抗体、それだけには限定されないがF(ab')₂断片若しくはF(ab)又はFvを含めた抗体断片、標識抗体、固定抗体、外来化合物に結合させた抗体からなる群から選択される。

【0032】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、BATR_A（配列番号15）、BATR_B（配列番号16）、BATR_C（配列番号17）、BATR_D（配列番号18）からなる群から選択される軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体を提供する。

40

【0033】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、BATRH_A（配列番号20）、BATRH_B（配列番号21）、BATRH_C（配列番号22）、BATRH_D（配列番号23）又はBATRH_E（配列番号24）からなる群から選択される重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体を提供する。

【0034】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、BATRH_A/BATR_A（配列番号20/配列番号15）、BATRH_B/BATR_A（配列番号21/配列番号15）、BATRH_B/BATR_B（配列番号21/配列番号16）、BATRH_C/BATR_B（配列番号22/配列番号16）、BATRH_B/BATR_D（配列番号21

50

/ 配列番号 18)、又は B A T R H_C / B A T R_D (配列番号 22 / 配列番号 18) からなる群から選択される可変領域を含むモノクローナル抗体を提供する。

【0035】

さらに別の実施形態によれば、本発明のヒト化モノクローナル抗体は、C D R 移植を利用して組換え D N A 技術によって作製する。

【0036】

第二態様によれば、本発明は、本発明のヒト化抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、ヒト化抗体全体、或いはヒト化抗体の可変領域の軽鎖若しくは重鎖可変領域又は両方の鎖をコードすることができる。本発明はさらに、本発明のヒト化抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。したがって、ヒト化 B A T - 1 抗体は、重鎖及び軽鎖ベクターの同時トランスフェクション、又は軽鎖及び重鎖ポリヌクレオチド配列をどちらも含む単一ベクターのトランスフェクションの後、宿主細胞内で発現させ得る。

10

【0037】

別の実施形態によれば、本発明は、本発明のヒト化モノクローナル抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチド配列を提供する。

【0038】

別の好ましい実施形態によれば、本発明は、本発明のヒト化抗体の 軽鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチド配列を提供し、 軽鎖可変領域は配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 からなる群から選択される。

20

【0039】

別の好ましい実施形態によれば、本発明のヒト化抗体の軽鎖をコードしているポリヌクレオチド配列は配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89 からなる群から選択される。

【0040】

別の好ましい実施形態によれば、本発明は、本発明のヒト化抗体の重鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチド配列を提供し、重鎖可変領域は配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24 からなる群から選択される。

【0041】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明のヒト化抗体の重鎖をコードしているポリヌクレオチド配列は配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92 からなる群から選択される。

30

【0042】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、ヒト化 B A T - 1 抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0043】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、本発明のヒト化抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0044】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、ヒト化抗体全体、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、可変領域の両方の鎖からなる群から選択される、本発明のヒト化抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

40

【0045】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、本発明のヒト化抗体の 軽鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供し、 軽鎖可変領域は配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 からなる群から選択される。

【0046】

さらに別の実施形態によれば、ベクターは、耐性遺伝子、プロモーター、シグナルペプチド、ポリ A 転写ターミネーター、選択マーカー、ゲノムヒト 定常領域からなる群から選択される構成要素をコードしている少なくとも 1 つの配列をさらに含む。

【0047】

50

さらに別の好ましい実施形態によれば、ベクターの構成要素は、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、HCMV最初期プロモーター（HCMV Immediate Early Promoter）、ゲノムヒト 定常領域、マウス免疫グロブリンシグナルペプチド配列、コザック配列、シグナル配列イントロン、BGHポリA転写ターミネーター、Neo/G418選択マーカー、ハムスターdhfr選択マーカーからなる群から選択される。

【0048】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、本発明のヒト化抗体の重鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供し、重鎖可変領域は、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24からなる群から選択される。

10

【0049】

さらに別の実施形態によれば、ベクターは、耐性遺伝子、プロモーター、シグナルペプチド、ポリA転写ターミネーター、選択マーカー、ゲノムヒトIg定常領域からなる群から選択される構成要素をコードしている少なくとも1つの配列をさらに含む。

【0050】

さらに別の好ましい実施形態によれば、ベクターの構成要素は、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、HCMV最初期プロモーター、ゲノムヒトIgG1定常領域、マウス免疫グロブリンシグナルペプチド配列、コザック配列、シグナル配列イントロン、BGHポリA転写ターミネーター、Neo/G418選択マーカー、ハムスターdhfr選択マーカーからなる群から選択される。

20

【0051】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、pKN110-BATR_A、pKN110-BATR_B及びpKN110-BATR_Dからなる群から選択される、本発明のヒト化抗体の軽鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0052】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、pG1D110-BATRH_A、pG1D110-BATRH_B、pG1D110-BATRH_Cからなる群から選択される、本発明のヒト化抗体の重鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

30

【0053】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明は、配列番号93に記載の、本発明の完全なヒト化抗体をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

【0054】

第三態様によれば、本発明は、保管、増殖、抗体産生及び治療用途を目的とする、本発明の抗体又は断片をコードしているポリヌクレオチド配列を含むベクターを含む細胞を提供する。

【0055】

別の実施形態によれば、宿主細胞はCHO、CHOdhfr、NSO、COS、COS7からなる群から選択され得る。

40

【0056】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、診断及び治療で使用するための、本発明の抗体を活性成分として含む薬剤組成物を提供する。

【0057】

さらに別の実施形態によれば、活性成分として本発明の抗体を含む薬剤組成物は、好ましくは癌の処置に使用する。

【0058】

さらに別の実施形態によれば、薬剤組成物は、対象において原発腫瘍若しくは二次腫瘍が検出された後に、又は癌を発生する危険性の高い対象の予防治療として投与し得る。

50

【0059】

さらに別の好ましい実施形態によれば、本発明のヒト化抗体は様々な腫瘍において抗腫瘍効果を誘発する。

【0060】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、本発明の抗体を活性成分として含む薬剤組成物を有効量でそれを必要としている対象に投与することを含む、疾病又は疾患、特に癌を診断又は治療する方法を提供する。

【0061】

さらに別の実施形態によれば、本発明の抗体は、それと一緒に付加的又は相乗的に作用できる他の薬剤の投与と同時に、その投与前に、又はその投与後に投与する。

10

【0062】

さらに別の実施形態によれば、本発明の抗体は、サイトカイン、IL-1（インターロイキン-1）、IL-2、IL-6、IFN-（インターフェロン-）、細胞ワクチン、抗体、T細胞刺激抗体、抗腫瘍治療用抗体からなる群から選択される薬剤の投与と同時に、その投与前に、又はその投与後に投与する。

【0063】

本発明の特定の実施形態によれば、ヒト化BATモノクローナル抗体は、その機能又は活性がATCC#（PTA-5189）の下に寄託されている細胞により産生される抗体と同じである。

【0064】

20

本発明の他の目的、特徴及び利点は以下の詳細な説明及び添付の特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0065】

1. 定義

便宜上、明細書、実施例及び特許請求の範囲内で用いる特定の用語を述べる。

【0066】

用語「抗体」は、その最も広い意味で使用し、具体的にはモノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含める）及び所望する生物活性を示す限りは抗体断片を包含する。「抗体断片」は完全長抗体の一部分、一般にはその抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；二重特異性抗体；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；並びに抗体から形成した多重特異性抗体が含まれる。

30

【0067】

本明細書中で使用する用語「モノクローナル抗体」とは、単一の抗原部位に対するものであり特異性が非常に高い抗体をいう。本発明に従って使用するモノクローナル抗体は組換えDNA法によって作製し得る（例えばCabilly他の米国特許第4,816,567号参照）。

【0068】

用語「フレームワーク領域」又は「FR」残基とは、本明細書中で定義する超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。本明細書中で使用する用語「超可変領域」とは、抗原の結合を司っている抗体のアミノ酸残基である。超可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」のアミノ酸残基を含む。CDRは主に抗原のエピトープへの結合を司っている。FR及びCDRの範囲は明確に定義されている（Kabatt他、同上参照）。

40

【0069】

本明細書中で使用する用語「ヒト化抗体」とは、ヒト抗体由来のフレームワーク領域と非ヒト（通常はマウスやラット）免疫グロブリン由来の1つ又は複数のCDRとを含む抗体をいう。場合によってはCDRを除いて、ヒト化免疫グロブリンの各部は天然ヒト免疫グロブリンの配列の対応する部分と実質的に同じである。重要なことに、ヒト化抗体はCDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合することが予想される。さらなる詳細には、例えばMedical Research Council、英国の米国特許第5,22

50

5, 539号を参照されたい。

【0070】

表現「ヒト抗体」とは、ヒトで実際に存在する遺伝子、又はその対立遺伝子、変異体若しくは突然変異体にコードされている抗体を意味することを意図する。

【0071】

本明細書中で使用する用語「ドナー」又は「親」免疫グロブリンとは、CDRを提供している非ヒト免疫グロブリンをいう。

【0072】

本明細書中で使用する用語「アクセプター」免疫グロブリンとは、フレームワークを提供しているヒト免疫グロブリンをいう。

10

【0073】

本明細書中で使用する用語「発現ベクター」とは、所望するコード配列と、発現可能に連結されたコード配列の特定の宿主細胞内での発現に必要な適切な核酸配列とを含む組換えDNA分子をいう。宿主細胞ゲノムに組み込まれる発現ベクターだけでなく、宿主ゲノムに組み込まれないままのベクターも本発明に包含されることが企図される。

【0074】

本明細書中でいう用語「遺伝子改変した細胞」は、ベクター、例えば目的ポリペプチドをコードしているウイルスによってトランスフェクション又は感染させた細胞に関し、この細胞は前記ポリペプチドを発現させる能力を有する。特に本発明においては、遺伝子改変した細胞は本発明の抗体を発現及び分泌する能力を有する。

20

【0075】

用語「トランスフェクション」とは、宿主細胞へのDNAの導入をいう。トランスフェクションした細胞内でコード配列が発現され得ることが企図される。数々のトランスフェクションの方法、例えばCaPO₄及び電気穿孔が当業者に知られている。

【0076】

本明細書中で使用する用語「抗腫瘍効果」とは、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の低下、転移数の低下、推定寿命の上昇、又は癌の状態に関連する様々な生理的症状の寛解によって明示することができる生物学的効果をいう。「抗腫瘍効果」はまた、腫瘍が発生すること自体を予防する本発明の抗体の能力によっても明示することができる。その特性を考えると、本発明の抗体は急性癌の処置及び癌の予防のどちらにも使用することができる。

30

【0077】

本明細書中では、「賦形剤」とは、化合物の投与をさらに容易にするために薬剤組成物に加える不活性物質をいう。賦形剤の例には、それだけには限定されないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖及びデンプンの種類、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油及びポリエチレングリコールが含まれる。薬剤組成物はまた、1つ又は複数の追加の活性成分も含み得る。

【0078】

用語「ポリメラーゼ連鎖反応」(「PCR」)とは、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,965,188号に開示されている方法をいう。

【0079】

II. 発明を実施するための好ましい形態

a. 抗体の調製

BAT-1抗体をヒト化するために、ヒト化変異体を設計及び調製した後、非ヒト抗体出発物質、即ちmBAT-1を調製する。ドナー非ヒト抗体可変ドメインの選択、抗体遺伝子配列のヒト化及び所望のヒト化抗体の産生を含めた本発明の一部の態様を以下のセクションに記載する。

【0080】

(i) 非ヒト化抗体の調製

ネズミBAT-1モノクローナル抗体は以前に米国特許第5,897,862号に記載されている。それによると、モノクローナルネズミBAT-1抗体を産生する代表的なハ

50

イブリドーマ細胞系がCollection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)、Institute Pasteur、25, Rue du Docteur Roux、75724、パリ、セデックス15に、寄託番号I-1397の下、1994年1月28日に寄託されている。

【0081】

或いは、ネズミBAT-1から産生させるようなキメラ 1 / BAT-1抗体をヒト化BAT-1の調製に使用し得る。キメラBAT-1抗体及びその産生法はPCT出願WO00/58363号に記載されている。

【0082】

(ii) ヒト化抗体の設計戦略

本発明は、ドナー抗体、好ましくはマウス抗体のCDRとヒトフレームワークとを組み合わせることによってドナー抗体をヒト様抗体に変換する方法によって、BAT-1抗体をヒト化する手順を開示する。特定の実施形態では、ヒト化抗体のアミノ酸配列変異体を産生させることが望まれることがあり、これは、特にこれらがヒト化抗体の結合親和性又は他の特性を向上させる場合である。アクセプターであるヒト抗体の選択を含めて、ドナーBAT-1抗体と選択したヒトアクセプター抗体の両方について置換、挿入又は欠失のための部位を選択するために適用する方法を詳細に記載する。本明細書中に以下で提供する抗体のヒト化の大規模な解析及び指針は背景技術に開示されておらず、活性のある変更された抗体の調製に重要である。

【0083】

ヒト化抗体の設計は、非ヒト抗体可変領域の重鎖及び軽鎖（本明細書中で以降それぞれ V_H 及び V_L と呼ぶ）の配列解析によって開始することが好ましい。このような解析は、非ヒト化抗体と他のマウス可変領域との V_L 及び V_H のアミノ酸配列の比較を含む。好ましい実施形態では、サブグループのコンセンサス配列でさらに比較を行うことができ、ここでは可変領域をカバットデータベース（Kabatt他、同上）に細分化した。可変領域の様々な要素の分類により、本発明の非ヒト化抗体の V_L 及び V_H に類似しており構造が解明されている免疫グロブリン可変領域の選択が容易になる。

【0084】

ヒト 軽鎖可変領域（本明細書中で以降 V_L とも呼ぶ）の選択、及びヒト化抗体の可変領域の基礎として役割を果たす V_H （アクセプター抗体とも呼ぶ）の選択は、ヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列に従って非ヒト抗体の V_L 及び V_H の分類によって開始することが好ましい。具体的には、非ヒト化抗体の V_L をカバット（Kabatt他、同上）に定義された4つのヒト 軽鎖可変領域サブグループのコンセンサス配列と比較し、次いでそれに従って分類する。同様に、非ヒト化抗体の V_H を3つのヒト重鎖可変領域サブグループのコンセンサス配列と比較し、それに従って分類する。

【0085】

アクセプターヒト V_L 及び V_H の選択は、本発明の親非ヒト抗体の V_L 及び V_H と公的に公開されているヒト可変領域の個別の配列の記録例とを比較することによって進めることが好ましい。適切なヒト V_L 及び V_H は、親の非ヒト抗体に最も近い適合性に基づいて選択される。

【0086】

ドナー及びヒト化抗体の配列解析並びに適切なモデルへの参照は、どの残基が抗原の結合や正しい抗体構造の維持に関与している可能性があるか、またヒト化抗体の構造を改善するためにどの残基を除去又は置換すべきかを識別するのに役立つことができる。

【0087】

したがって、ヒト化抗体の設計を補助するために非ヒト抗体及びヒト化抗体の可変領域の分子モデルをどちらも準備する。これらの構造のモデリングは解析手順で決定された可変領域要素の分類に基づいており、例えば相同性及びab initio技法を使用することによって得ることができる。対応するX線結晶解析による構造はブルックヘブン（Brookhaven）データベースから得ることができる。

【0088】

FR、CDR、及びループ構造などの本発明の非ヒト抗体の可変領域内の要素を、類似の構造が解明されている免疫グロブリン可変領域の要素からモデリングした。モデル内の立体衝突を同定し、ミスマッチの側鎖を選択して置換した。特に好ましい構造コンホメーションの手法には、コーチアと共同研究者 (Chothia 他、1987、1989、1992、同上; Tramontano 他、同上) が記載したものに基づいた、標準 (canonical) クラスに従った構造要素の分類が含まれる。構造予測の好ましい手法には、データベース検索、即ち CONGEN 検索 (Brucoleri, R. E. 他、Biopolymers、26:137、1987) が含まれる。ヒト化抗体の基礎として役割を果たすであろう選択されたヒトV_H 及びV_H を同様にモデリングし、その残基のうち

10

【0089】

モデルの明らかな立体衝突を調整した後に、エネルギー最小化法を適用することが好ましい。エネルギー最小化は、望ましくない原子の接触を軽減すること並びにファンデルワールス及び静電的相互作用を最適化することのどちらのためにも実施する。

【0090】

上記設計手順の結果、BAT-1のヒト化抗体変異体は、レシピエント抗体中にもドナー抗体中にも見出しされない、追加の又は置換された保存的アミノ酸残基を含ませることができる。元のアクセプター又はドナー抗体に含まれるアミノ酸の欠失を適用させてもよい。このような改変は抗体の性能を洗練させるために行い、抗原結合性や他の免疫グロブリン機能に実質的に影響を与えない。改変において最も関心が持たれている部位には超可変性ループが含まれるが、FRの変更改も企図される。抗原の結合に關与する超可変領域残基又はFR残基は一般に比較的保存された形で置換される。本発明で適用させ得る保存的置換には以下の選択肢が含まれる: Val、Ile; Ser、Thr; Lys、Arg; Phe、Tyr; Trp、Leu; Asp、Ser; Cys、Thr; Gln、Lys; Val、Ala; Asn、Ser; Thr、Asn。

20

【0091】

(iii) ヒト化抗体変異体の構築

一般に、以下に詳述するように、BAT-1抗体変異体は、従来組換え細胞培養において調製されていた。ここでは組換え合成が好ましいが、化学合成によってペプチドを調製すること、又はペプチドを天然源から精製することが知られている。

30

【0092】

本明細書中に記載のように本発明を実施するのに適した分子生物学的技術及びCDR移植プロトコルは当業者に知られている。適切な教示は、とりわけ、付録を含めてその全体を参照として本明細書中に組み込む Sambrook 他 (分子クローニング: 実験の手引き、第2版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、1989); Ausubel 他 (分子生物学のプロトコル (Protocols In Molecular Biology)、Green Publishing Associates and Wiley-Interscience、John Wiley and Sons、ニューヨーク、1987、1988、1989); 米国特許第5,225,539号及び第5,585,089号を含めた数々の手引き及び主要な出版物に記載されている。

40

【0093】

BAT-1 軽鎖及び重鎖 CDR のアミノ酸配列を本明細書中で定義し、図5及び6に例示する: 図5及び6: CDR_{L1} (図5配列番号9及び図5配列L1): SARSS VSYMH; CDR_{L2} (配列番号10及び図5の配列L2): RTSNL AS; CDR_{L3} (配列番号11及び図5の配列L3): QQRSS FPLT; CDR_{H1} (配列番号12及び図6の配列H1): NYGMN; CDR_{H2} (配列番号13及び図6の配列H

50

2) : WINTD SGEST YAEFF KG ; CDR_{H3} (配列番号 14 及び図 6 の配列 H3) : VGYDA LDY。

【0094】

これらのアミノ酸配列を使用して、本発明中で使用するためにこれらのCDRをコードしているオリゴヌクレオチドを合成することができる。また、オリゴヌクレオチドは、例えばクローニングを容易にするために又は制限部位を導入するために、BAT-1のCDRのヌクレオチドに加えて別のヌクレオチドを含んでいてもよい。本発明のこの態様に適したオリゴヌクレオチド合成技術は当業者に周知であり、いくつかの市販されている自動合成機のうち任意のものを使用して実施し得る。さらに、本明細書中に示すCDRをコードしているDNAは、商業的なDNA合成業者のサービスを通じて得ることもできる。したがって、BAT-1のCDRを天然源から再クローニングする必要はない。

【0095】

mBAT-1のCDRをヒト抗体中に移植してヒト化BAT-1変異体を生じさせる。この文脈におけるヒト抗体とは、ヒトに存在する任意の抗体、又はヒト免疫系と適合するようにある程度遺伝子操作した抗体をいうことを理解されたい。この目的に特に好ましいのは、広くいうと、患者において有害な免疫応答を引き起こさない抗体である。

【0096】

CDRを移植したヒト化BAT-1抗体を構築するために、上記参考文献に記載されているものなどの周知の組換え技法を用いて、BAT-1のCDRをコードしているオリゴヌクレオチドを、抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている他のDNA並びにその断片中に組み込むことができる。具体的には、本発明に従ってBAT-1のCDRを実用的なFRの任意の組合せに導入することができる。様々なヒト抗体遺伝子が公的にアクセス可能な寄託物の形で利用可能であり、これらの配列から上記の記載とほぼ同様に適切な抗体遺伝子を合成することができる。この観点からポリヌクレオチドのクローニング及び遺伝子操作に採用される好ましい技術は、ここに述べる方法及び実施例によって例示される。

【0097】

mBAT-1及び再構成BAT-1の軽鎖(図5)及び重鎖(図6)FR並びに改変FRのアミノ酸配列を本明細書中で同定する：

【化1】

FR_{L1} (配列番号 1): EIVLT

QSPSS LSASV GDRVT ITC; FR_{L2} (配列番号 2): WXaaQQK PGKAP KLXbbI Y,

式中 Xaa = F, Y 及び Xbb = W, L; FR_{L3} (配列番号 3): GVPSR FSGSG SGTXaaXbb

XccLTIN SLQPE DFATY YC, 式中 Xaa = D, S; Xbb = Y, F 及び Xcc = C, T; FR_{L4} (配列

番号 4): FGGGT KLEIK; FR_{H1} (配列番号 5): QXaaQLV QSGSE LKKPG ASVKI SCKAS

GYXbbFXcc, 式中 Xaa = I, V; Xbb = T, S; Xcc = T, S; FR_{H2} (配列番号 6): WVXaaQA

PGQGL XbbWMG, 式中 Xaa = R, K; Xbb = Q, K; FR_{H3} (配列番号 7): RFXaaFS LDTSV

XbbTAYLQITSL XccAEDT GMYFC XddXee, 式中 Xaa = V, A; Xbb = N, S; Xcc = T, N;

Xdd = V, A; Xee = R, K; FR_{H4} (配列番号 8): WGQGT LVTVS S.

【0098】

BAT-1のCDR及び/又はヒト抗体由来の特定のFR残基をコードしているオリゴヌクレオチドを使用して、ヒト化BAT-1変異体のV又はV_HをコードしているDNAにコドンを導入し得る。本発明のこの態様に従って、追加のコドンにはBAT-1のCDR由来でないものとCDRを構成するものとが含まれ得る。これら追加の塩基は、CDRと外来源由来のFRとの連結を促進するために含め得る。これらは、この目的のために制限部位又は重複している相補領域を含んでいてもよい。鋳型DNAは通常一本鎖DNA(ssDNA)ベクターである。

【 0 0 9 9 】

クローニング又は合成したDNA又はRNA中の塩基の欠失、挿入及び変更のために、特に周知の組換えDNA技法を用いてヒト化抗体中に取り込ませた後にBAT-1重鎖及び軽鎖のCDRも改変し得る。この目的に適した部位特異的突然変異誘発技術は当業者に周知であり、組換えDNA技術の前述の参考文献中に例示されている。このような方法を使用して、事実上任意の所望する変更を、BAT-1のCDRをコードしているポリヌクレオチド内又は閉じた重鎖若しくは軽鎖遺伝子の他の領域内に導入することができる。

【 0 1 0 0 】

より短い、重複している一本鎖DNAからの、より長い二本鎖DNAの合成は当業者に周知である。同様に、平滑末端DNA及び少なくとも部分的に重複している相補末端を有するDNAを含めたDNAの末端間連結も周知である。このような技術は、例えば組換えDNA技術に関する前述の参考文献中に例示されている。

【 0 1 0 1 】

ヒトBAT-1可変領域の全ての変型の構築は、Stemmer (Stemmer 他、GENE、164:49、1995)に記載のように実施することが好ましい。本質的には、この方法は多数のオリゴデオキシリボヌクレオチド(オリゴ)由来の長いDNA配列を合成する場合に好まれる。この方法は慣用のPCR技術を用いたDNAポリメラーゼに依存しており、これによりアセンブリ形成過程にますます長いDNA断片が構築される。新しい可変領域遺伝子を合成した後は、これを優先的にベクター内にサブクローニングし、上記参考文献中に記載のようにこれをコンピテント細胞に形質転換させる。推定陽性クローンは、適切なプライマーを用いた且つ/又は制限消化によるPCRスクリーニングによって同定することができる。確認された陽性クローンから選択した個々のクローンを二本鎖DNA(ds-DNA)内にシーケンシングしてもよい。好ましくは、PCRにより生じたエラーについて生じたds-DNAを配列決定によって再確認し、他のクローンから正しい断片をサブクローニングすることによって修正することができる。

【 0 1 0 2 】

BAT-1変異体のヒト化V_H又はV_Hを含む、確認された陽性クローンからの選択したクローンのDNAを、それぞれヒト軽鎖及び重鎖定常領域を含む発現ベクター内に直接挿入し得る。ヒト化BAT-1のCDRを移植した完全な抗体の変異体、又はヒト化BAT-1のCDRを移植した抗体の軽鎖若しくは重鎖領域をコードしているDNAをアセンブリ形成させた後、慣用の技法による増殖及び発現のためにこれをベクター内に挿入することができる。このようにして、所望の量の抗体を得ることができる。

【 0 1 0 3 】

(iv) ヒト化BAT-1抗体変異体の発現

本発明はまた、完全なヒト化BAT-1抗体、軽鎖完全領域又は可変領域、重鎖完全領域又は可変領域配列をコードしている単離したポリヌクレオチド配列、並びにコード核酸を含むベクターや宿主細胞も提供する。

【 0 1 0 4 】

BAT-1抗体の組換え産生には、前記抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチド配列を単離し、さらなるクローニング、増幅又は発現のために複製可能なベクター内に挿入する。抗体をコードしているDNAは容易に単離され、慣用の手順(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合する能力を有するオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる)を用いて配列決定を行う。多くのベクターが利用可能であり、これには一般的に、それだけには限定されないが、シグナル配列、複製起点、1つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列のうち1つ又は複数が含まれる。

【 0 1 0 5 】

発現のために、ヒト化BAT-1抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチドを発現ベクター内にクローニングしてもよい。このようなベクターは当業者に周知である。免疫グロブリンやウイルスプロモーターなどの発現制御配列をポリヌクレオチドの上流

10

20

30

40

50

に導入する。d h f r 遺伝子などの選択マーカー、又は当業者に周知の他の適切な選択マーカーを、ベクター内に含まれる前記ポリヌクレオチドを発現している宿主細胞の選択を可能にするためにベクターに含める。

【0106】

一実施形態では宿主細胞は内生的に抗体を産生し、代替実施形態では細胞は抗体を産生するように遺伝子改変されている。内生的に抗体を産生する細胞の例には、それだけには限定されないが、ハイブリドーマ、リンパ腫、プラズマ細胞腫及びEBV形質転換細胞が含まれる。細胞は、抗体分子をコードしているベクターを用いたトランスフェクションなどの慣用の方法によって、抗体を産生するように遺伝子改変することができる。

【0107】

使用の際には、ヒト化BAT-1抗体又はその断片をコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクターを細胞内にトランスフェクションさせる。トランスフェクション方法は当分野で周知であり、このような方法は本発明での使用に適している。発現ベクター又は同時トランスフェクションに使用したベクターに組み込んだ選択マーカーを用いて発現ベクターを発現している細胞を選択する。抗体を発現している細胞は酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)アッセイ又は当業者に周知の他の適切な方法によってスクリーニングすることができる。

【0108】

ヒト化BAT-1抗体変異体は、完全な抗体又は抗体のFv断片をコードしているポリヌクレオチドを含むベクターのトランスフェクションによって、宿主細胞内に導入される。ヒト化BAT-1抗体変異体も、(i)抗体の可変領域又は完全軽鎖領域をコードしているポリヌクレオチドを含むベクター、及び(ii)抗体の可変領域又は完全重鎖領域をコードしているポリヌクレオチドを含むベクターの同時トランスフェクションによって宿主細胞内に導入される。

【0109】

最も好ましい実施形態では、本発明の抗体は、抗体の軽鎖及び重鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチド配列を含む単一のベクターのトランスフェクションによって産生させる。最も好ましくは、このベクターは、それぞれが再構成BAT-1の軽鎖及び重鎖領域をコードしているポリヌクレオチド配列に発現可能に連結されている2つのプロモーターをさらに含む。トランスフェクション及び同時トランスフェクションを同様の宿主細胞内で実施した場合、上記の結果生じるBAT-1抗体の発現は、それぞれが抗体軽鎖又は重鎖領域をコードしている2つのベクターを用いた同時トランスフェクション後の発現よりも高い。

【0110】

ヒト化BAT-1抗体変異体は、それだけには限定されないが、哺乳動物、トリ、昆虫、細菌又は酵母の細胞を含めた任意の適切な細胞型で発現させることができる。哺乳動物細胞の例には、それだけには限定されないが、ヒト、ウサギ、げっ歯類(例えばマウス、ラット)及びウシの細胞が含まれる。好ましい実施形態では、細胞は骨髓腫細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、COS細胞、COS7細胞又は線維芽細胞である。

【0111】

抗体を産生する細胞系は、当業者に周知の技術を用いて培養し得る。このような技術は様々な実験の手引き及び出版物に記載されている。例えば、本発明で使用するのに適した技術は、付録を含めてその全体で参照として本明細書中に組み込まれる免疫学における最新プロトコル(current protocols in immunology)、Coligan他、(Green Publishing Associates and Wiley-Interscience、John Wiley & Sons、ニューヨーク、1991)に記載されている。

【0112】

本発明のヒト化モノクローナル抗体は凍結又は凍結乾燥して保管し、使用前に適切な担

10

20

30

40

50

体中で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンで有効であることが示されており、当分野で知られている凍結乾燥及び再構成技術を採用することができる。凍結乾燥及び再構成は様々な度合の抗体活性の損失をもたらす可能性があり、それを補うために使用レベルを調節せざるを得ないかもしれないことは、当業者には理解されよう。

【0113】

(v) ヒト化BAT-1抗体の精製

組換え技術を使用して、抗体を細胞内又はペリプラズム空間で産生させるか、培地中に直接分泌させることができる。抗体を細胞内で産生させる場合は、第1ステップとして宿主細胞又は溶解断片のいずれかの粒子状の細胞片を、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去する。Carter他、(Biotechnology, 10:163, 1992)は、大腸菌(E. coli)のペリプラズム空間に分泌される抗体を単離する手順を記載している。手短に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)の存在下で、約30分間かけて解凍する。細胞片は遠心分離によって除去することができる。

【0114】

最も好ましい実施形態では、本発明の抗体は培地中に分泌され、このような発現系からの上清は一般に、まず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMilliporeの限外濾過ユニットを用いて濃縮する。タンパク質分解を阻害するために前述のステップのうち任意のものにプロテアーゼ阻害剤を含めてもよく、外来混入物の増殖を阻止するために抗生物質を含めてもよい。

【0115】

細胞から調製した抗体組成物は、当分野で周知の方法、例えばヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することができ、特にタンパク質Aではアフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技法である。親和性リガンドが結合しているマトリックスはほとんどの場合アガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。多孔質ガラス(controlled pore glass)やポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの力学的に安定なマトリックスにより、アガロースで実現され得るよりも速い流速及び短い処理時間が可能になる。抗体がC_H³ドメインを含む場合は、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J. T. Baker、ニュージャージー州フィリップスバーグ)が精製に有用である。イオン交換カラム、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカによるクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース(商標)によるクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂(例えばポリアスパラギン酸カラム)によるクロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-page、及び硫酸アンモニウム沈殿による分画などタンパク質精製の他の技法も、回収する抗体に応じて利用可能である。

【0116】

(vi) 細胞系の寄託

本発明の代表的な実施形態によれば、ヒト化BATモノクローナル抗体は、その機能又は活性が、2003年5月9日にATCC#(PTA-5189)の下に寄託された細胞によって産生される抗体と同じである。

【0117】

III. 薬理学

(i) 薬剤組成物

本発明はまた、本発明の抗体を含む組成物も提供する。

【0118】

別の実施形態によれば、本発明は、診断及び治療で使用するための、活性成分として本発明の抗体を含む薬剤組成物を提供する。前記組成物は、それだけには限定されないが、溶液、懸濁液、使用前に適切なベヒクル又は希釈剤で再構成する凍結乾燥散剤、カプセル及び錠剤を含めた、患者への投与に適した任意の薬剤形態であり得る。本発明で開示する薬剤組成物は、とりわけ診断、予後及び治療用の治療剤と共に抗体を含む生理的に許容さ

れる結合を提供するために、任意の製薬上許容される希釈剤又は担体をさらに含み得る。

【0119】

本発明の薬剤組成物は、当分野で周知の方法、例えば慣用の混合、溶解、顆粒化、粉碎、微粉碎、糖衣錠作製、湿式粉碎、乳化、カプセル封入、混入 (e u t r a p p i n g) 又は凍結乾燥法によって製造し得る。

【0120】

したがって、本発明により使用する薬剤組成物は、活性化化合物の薬剤として使用できる調製物への加工を容易にする、賦形剤及び補助剤を含む1つ又は複数の生理的に許容される担体を使用して慣用の方法で配合し得る。適切な配合は選択する投与経路に依存する。

【0121】

注射には、本発明の化合物を水溶液、好ましくはハンクス溶液、リンゲル溶液、又は生理食塩緩衝液などの生理的に適合性のある緩衝液中で配合し得る。経粘膜投与には、浸透させる隔膜に適切な浸透剤を配合物中に使用する。このような浸透剤、例えばポリエチレングリコールは当分野で一般に知られている。経口使用できる薬剤組成物には押し込み型のカプセルが含まれる。

【0122】

吸入による投与には、本発明に従って使用する分子は、適切な噴霧剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロ - テトラフルオロエタン又は二酸化炭素を用いた加圧パック又は噴霧器からのエアロゾルスプレーの形態で便利に送達される。加圧エアロゾルの場合、計量された量を送達するために弁を設けることによって単位用量を決定し得る。例えば吸入器又は吹込器で使用するゼラチンのカプセル及び薬包は、ポリペプチドとラクトースやデンプンなど適切な散剤基質との散剤混合物を含むように配合し得る。

【0123】

非経口投与用の薬剤組成物には、水溶性形態にある活性成分の水溶液が含まれる。さらに、活性化化合物の懸濁液を適切な油状の注射用懸濁液として調製し得る。適切な天然又は合成の担体は当分野で周知である。任意選択で、懸濁液は、化合物の可溶性を高めてより濃縮された溶液の調製を可能にする適切な安定剤又は薬剤も含んでよい。或いは、活性成分は、使用前に適切なベヒクル、例えば発熱物質を含まない滅菌水で再構成する散剤形態にあってよい。

【0124】

本発明の状況下での使用に適した薬剤組成物には、活性成分が意図する目的を実現するのに有効な量で含まれている組成物が含まれる。投与する配合物は全て、選択した投与経路に適した用量にあるべきである。より具体的には、「治療上有効な」用量とは、処置する対象の疾病の症状を予防、緩和又は寛解するのに有効な化合物の量を意味する。治療上有効な量の決定は、特に本明細書中に提供した詳細な開示を鑑みると十分に当業者の能力範囲内にある。

【0125】

本明細書中に記載の組成物の毒性及び治療有効性は、細胞培養物又は実験動物における標準の製薬手順によって、例えば目的化合物の IC_{50} (50 % 阻害をもたらす濃度) 及び最大耐量を決定することによって決定することができる。これらの細胞培養物のアッセイ及び動物の研究から得られたデータは、ヒトで用いる用量範囲の処方に使用することができる。用量は用いる剤形及び利用する投与経路に応じて変化し得る。正確な配合、投与経路及び用量は、患者の状態を考慮して個々の医師が選択し得る。処置する状態の重篤度及び応答性に応じて、処置経路の期間を数日間から数週間、又は治癒するまで若しくは疾病状態が軽減するまでとして、投薬は徐放性組成物の単一投与であることもできる。投与する組成物の量は、もちろん、処置する対象、病気の重篤度、投与様式、処方する医師の判断、及び関連する他の要素全てに依存する。

【0126】

(i i) 処置方法

本発明による抗体は様々な治療的効能で有用であるが、本発明の現在好ましい実施形態に従って癌の処置に用いる。本発明によるモノクローナル抗体は、様々な腫瘍中で抗腫瘍効果を誘発させることが判明している。本発明の範囲内で、対象に本発明の抗体を有効量で投与することによって腫瘍を処置する、新規 h B A T - 1 を使用する方法が提供されている。用語「有効量」とは、治療効果を実現するために必要な抗体の量を意味すると理解されるべきである。治療の最終結果を実現するために必要な有効量は、例えば腫瘍型及び患者の状態の重篤度（即ち癌の状態）、並びに抗体と付加的又は相乗的な様式で作用する別の薬剤を抗体と一緒に同時投与するかどうかを含めた、いくつかの要素に依存し得る。抗体は、対象において原発腫瘍又は二次腫瘍を検出した後に、又は放射線に曝された個体若しくは遺伝的素因をもつ個体などの癌を発生する危険性が高い対象における予防治療として投与し得る。

10

【 0 1 2 7 】

本発明はさらに、ヒト化 B A T - 1 抗体変異体又は前記抗体を活性成分として含む組成物を用いた、それを必要としている対象を処置する方法を提供する。

【 0 1 2 8 】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、本発明の抗体を活性成分として含む薬剤組成物を有効量で、それを必要としている対象に投与することを含む、疾病又は疾患、特に癌を診断又は処置する方法を提供する。

【 0 1 2 9 】

処置方法は、本発明の抗体又は組成物を対象に投与することを含む。処置方法はまた、本発明の抗体又は組成物を、I L - 1（インターロイケン - 1）、I L - 2、I L - 6 及び I F N - （インターフェロン - ）などのサイトカイン又は任意の T 細胞刺激抗体や他の抗腫瘍治療用抗体などの他の抗体を含む、追加の活性組成物を用いた処置と平行して、その処置前に、又はその処置後に投与することも含む。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、予防、処置又は検出する疾病は癌である。

20

【 0 1 3 0 】

前記組成物の投与は通常、非経口投与、例えば静脈内（i . v . ）、腹腔内（i . p . ）又は筋肉内（i . m . ）で行うことができる。処置方法は本発明による抗体の薬剤組成物を含み得る。その代わりに又はそれに加えて、処置方法は、細胞が自己由来又は同種異系である e x v i v o 又は i n v i v o の細胞療法を含み得る。

30

【 0 1 3 1 】

抗体の抗腫瘍活性をブーストするために、場合によっては、抗体と付加的又は相乗的に作用できる他の薬剤の投与と同時に、その投与前に、又はその投与後に本発明の抗体を投与することが有利である。例には、それだけには限定されないが I L - 1（インターロイケン - 1）、I L - 2、I L - 6 及び I F N - （インターフェロン - ）を含めた様々なサイトカイン、並びにそれだけには限定されないが T 細胞刺激抗体又は抗腫瘍治療用抗体を含めた細胞ワクチンや追加の抗体が含まれる。

【 0 1 3 2 】

本発明の抗体は、免疫系の増殖活性、細胞溶解活性又は刺激活性に対する抗体の活性化又は他の効果が、例えば H I V 感染の初期段階や血算により C D 4 + T 細胞（A I D S、後天性免疫不全症候群の原因ウイルス）の減少が示される患者、様々な自己免疫疾患、又は遺伝的若しくは後天性免疫不全の一部の症例などにおいて治療効果を得る、癌以外の様々な疾病の治療に有用であり得る。A I D S 患者では、抗体を感染しているがまだ疾病の症状を全く発生していない個体、又は H I V 感染過程の初期段階にある感染した個体に投与し得る。

40

【 0 1 3 3 】

対象に投与する抗体又は組成物の用量は、本発明の状況下では、対象において有益な治療応答を経時的に実現する又は腫瘍の増殖を阻害するのに十分であるべきである。したがって、疾病を緩和、軽減、治癒又は少なくとも部分的に抑止するのに十分な量で抗体又は組成物を対象に投与し得る。

50

【 0 1 3 4 】

用量は、生じた治療組成物の活性及び対象の状態、並びに処置する対象の体重及び表面積によって決定される。用量の量及び投薬レジメントはまた、特定の対象に特定の治療組成物を投与することに付随して有害な副作用が存在するかどうか、並びにその性質及び程度によっても決定される。投与する治療組成物の有効量を決定する際に、医師は循環血漿レベル、毒性、及び疾病の進行を評価しなければならない。

【 0 1 3 5 】

以上本発明を全体的に説明したので、例示として提供し、本発明を限定することを意図しない以下の実施例を参照することによって本発明はより容易に理解されるであろう。

【実施例 1】

【 0 1 3 6 】

マウス B A T - 1 の 軽鎖可変領域 (V) の配列解析

B A T - 1 の V 領域の D N A 配列及びアミノ酸配列を図 1 に示す。アミノ酸配列を他のマウス可変領域と比較し、可変領域がカバットデータベース (K a b a t 他、同上) に細分化されたサブグループのコンセンサス配列とも比較した。この解析から、B A T - 1 の V 領域がマウス サブグループ I V (同一性 = 8 8 . 3 8 % ; 類似度 = 9 2 . 4 5) 及びマウス サブグループ V I (同一性 = 8 7 . 7 4 % ; 類似度 = 8 9 . 6 2) の 2 つのコンセンサス配列と最も近くマッチしていたことが判明した。B A T - 1 の 軽鎖可変領域の F R のみ (即ち C D R のアミノ酸なし) をマウスサブグループ I V 及び V I と比較した場合は、同一性の割合はどちらについても正確に 9 0 . 0 0 % まで増加し、類似度の割合も、どちらのコンセンサス配列についても 9 2 . 5 0 % まで上昇した。しかし、どちらのカバットサブグループに対しても類似性が高かったが、ネズミ B A T - 1 の V 領域はマウスサブグループ V I として分類されるべきと判断した。

【 0 1 3 7 】

マウスサブグループ V I を選択した理由は、コーチアと共同研究者が定義した (C h o t h i a 他、J . M o l . B i o l . , 1 9 6 : 9 0 1 、 1 9 8 7 ; N a t u r e , 3 4 : 8 7 7 、 1 9 8 9 ; J . M o l . B i o l . , 2 2 7 : 7 9 9 、 1 9 9 2 ; T r a m o n t a n o 他、同上) B A T - 1 の V 領域の超可変性ループの標準クラスに関連していた。コーチアによれば、C D R のそれぞれ、即ち C D R 1 (L 1) 、 C D R 2 (L 2) 及び C D R 3 (L 3) は標準クラス 1 であった (図 2) 。重大なことに、10 個のアミノ酸の標準クラス 1 の L 1 超可変性ループは、カバットサブグループ V I に当てはまるマウス V 領域でのみ見つかった。

【 0 1 3 8 】

C D R 関連のループ構造の最も限定的な標準クラスが最近になってマーチン及びソーントンによって定義され (M a r t i n 他、同上) 、これらも図 2 に記載されている。これらの新しい標準クラスの定義の有用性はその厳密性にあり、これは各クラス内により多くのいわゆるフレームワーク標準残基が存在することに関連している。これらの「余分」な、潜在的に重要な残基の重要性は、その後にヒト化 B A T - 1 抗体を設計する際に考慮された。ループ L 1 及び L 2 はそれぞれマーチン標準クラス 1 / 1 0 A 及び 1 / 7 A に容易に割り当てられたが、L 3 ループは割当可能などのクラスとも完全にマッチしなかった。最も近くマッチしたクラスはクラス 1 / 9 A であったが、このクラスに当てはめるには B A T - 1 の V 領域の位置 2 8 に残基が存在していなければならず、これが実際には存在していなかった。B A T - 1 の V に最も近いマウス 軽鎖可変領域生殖系遺伝子は H 4 であり、これも 10 個のアミノ酸の L 1 ループ (表 1) も含んでいた。H 4 生殖系列配列と B A T - 1 の V 領域との間には 12 個のミスマッチしか見つからなかった。これらのミスマッチのほとんどは C D R 内に位置し、F R 内には 4 つの差異しか位置していなかった。F R 3 内の位置 7 2 (カバット番号) のシステイン以外は、これらのミスマッチのほとんどは高度に保存的变化であった。これが重要な標準残基 (位置 7 1) のすぐ隣に位置していることから、このシステインが抗原の結合に重要な役割を果たしているかもしれないことが示唆された。それでもやはり、総合すると、上記例は B A T - 1 配列がマウス V

可変領域の典型であることを明らかに示唆している。

【 0 1 3 9 】

【 表 1 】

表 1

配列名	¹ 同一 残基	² ネズミ BAT の V _K に対するマウス生殖系列の V _K の残基1～50	
BAT	106	QIVLTQSPA IMSASPGEKVTITCSARS-----SVSYMHWQQKPGTSPKL	
H4	83S.....S.....Y.Y.....S...	
H3/O	83M.....S.....Y...S.....	10
x1			
R9	83M.....S.....I.....Y.....	
H13	81L.....M.....S.....Y.Y.....RS...	
H8	81L.....M.....S.....X.....S...	
H1	81M.....S.....V.S..LY.Y.....S...	
H9	81	..L.....M.....S.....Y.....S...	
R2	76	E.L.....IA.....S.....N.Y.....S...	
T3B	75	---.....A..L.....M.....S.S.....V.S..L..Y...S.....	
R11	74	EN.....A.....M.....S.S.....V.S.NL..Y...S...T.	
H6/X	74	E.....TA..L.Q.....S.....Y...S.....	
24			
L8	74	EN.....A..L.....M.....S.S.....V.S..L..Y...S.....	20
R1/s1	72	EN.....A..L.Q...M.....S.S.....V.S..L..Y...S.A...	
07b			
R13	72	EN.....L.....MS.R.S.....N..Y.Y...SDA...	
H2	67	G.....TT.T.F...N.....S.....IN.I..Y...S.NT..	
配列名	¹ 同一 残基	ネズミ BAT の V _K に対するマウス生殖系列の V _K の残基 51～99	
BAT	106	WIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYCLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFP	
H4	83	P.....S.....S.....YH.Y.	
H3/O	83	R...D..K.....S.....S.....W..N.	
x1			
R9	83	R...D..K.....S.....S.....H....Y.	30
H13	81	P...L.....S.....S.....W..N.	
H8	81	...SI.....S.....SVK.....W..S.	
H1	81	...S.....S.....S.....F....Y.QY.	
H9	81	P...D.....F.....S.I..S.....E....Y.	
R2	76	I...GI.....FSF..NS....V.....Y.	
T3B	75	P...G.....V.....S.....S.....W..Y.	
R11	74	F.....E..P.....S.....SV.....W.GY.	
H6/X	74	P...EI.K.....S.....S.....I.....WNYPL	
24			
L8	74	...G.....A.I..S.....S.....ND.....W.GY.	40
R1/s1	72	PL.H.....S.....SV....D.....W.GY.	
07b			
R13	72	...Y.....P.....N..S.....S..G.....FT.S.	
H2	67	QX..K..D.P...TL.....S.....SV.....W.GY.	

【 0 1 4 0 】

¹ B A T 配列と同一である残基数

² 点 [.] は B A T の V とマウス生殖系列の V とのマッチを示し、線 [-] はアミノ酸が存在しないことを示す

【 実施例 2 】

【 0 1 4 1 】

マウスBAT-1重鎖可変領域の配列解析

BAT-1のV_H領域のDNA配列及びアミノ酸配列を図3に示す。実施例1に示したものと類似の解析をBAT-1のV_H領域で実施し、これにより、これがカバットデータベース(Kabat他、同上)のマウス重鎖の種々のサブグループのコンセンサス配列に最も近いマッチを示したことが決定された。mBAT-1のマウス重鎖可変領域アミノ酸配列と種々のサブグループコンセンサス配列との同一性の測定値は60.64%であり、類似度の計算値は69.23%であり、また次に近いカバットサブグループのコンセンサス配列はサブグループIIaであった(同一性=59.83%;類似度=66.67%)。しかし、BAT-1のV_H領域のFRのみをマウスサブグループIIaと比較した場合、同一性の割合は54.02%まで減少し、類似度は62.06%まで低下した。逆に、マウスの種々のサブグループに対して行った同一性の比較では、BAT-1のV_H領域のFRが65.52%の同一性及び74.71%の類似度を示したことが判明した。

10

【0142】

コーチアと共同研究者が定義したBAT-1のV_H領域の超可変性ループの標準クラスを解析すると(図4)、CDR1及びCDR2ループ(H1)がコーチア標準クラス1ループとマッチした。しかし、H3ループが示すことができる広範囲のサイズ及びアミノ酸構成により、CDR3ループ構造(H3)にはどのクラスも割り当てられなかった。

【0143】

マーチン及びソントン(Martin他、同上)が定義したCDRループ構造のより厳密な標準クラスを使用して、H1ループがマーチン標準クラス1/10Aにマッチしたことを決定するのは単純なことであった。しかし、H2ループでは最も近いマーチン標準クラスはクラス2/10Aであったが、クラスを割り当てるのがより困難であった。残念なことに、H2ループ内のアミノ酸Asp53がこの位置で予測された残基(即ちAla、Gly、Tyr、Ser、Lys、Thr又はAsn)とマッチしなかったので、このマッチも完全ではなかった。

20

【0144】

同定されたmBAT-1のV_Hに最も近いマウス重鎖可変領域生殖系列遺伝子はVMS2/VGK4であった(表2)。したがって上記例は、mBAT-1配列がマウスV_H可変領域の典型であることを明白に示唆している。

【0145】

30

【表 2 - 1】

表 2

配列名 / ¹ 同一残基	² ネズミ BAT の V _H に対するマウス生殖系列の V _H の残基 1～50	
BAT / 117	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMN WVKQAPGKGLKWMG	
VMS2/VGK4 /	
92		
VMS9/VGK1A/	
251 / 90		10
VGK6 / 89	
VFM11/VGK1	
B / 89		
264 / 88T...S.....	
VFM1/281/VGD.S.H.....	
K7 / 87		
VMS1/141/VGA.H.....	
K3 / 84		
161 / 84	
VGK5 / 79	--.....TA..Q...QKM.....I.	
VGK2 / 77	---.....R.....TA..Q...QKM.....I.	20
V104A/VAR10	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XM..Q..E.I.	
4A / 57		
VH105 / 57	.V..Q.....V...AS.....S.YIH.....R..Q..E.I.	
VAR104 / 56	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XR.AQ..E.I.	
J558-43y / 56	.V..Q.....V...AS.R.....S.NIH.....R..Q..E.I.	
J558-122B / 55	.V..Q.....VR..TS.....IT.W.....XR..Q.XE.I.	
37A11 / 55	.V..L...A..M...AS.....T...SS.WIE.....R..H..E.I.	
VH104A / 55	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XM..Q..E.I.	
VAR100 / 54	.V..Q.....VR..LS..L.....I.IT.W.....R..Q..E.I.	

【表 2 - 2】

配列名/ 同一残基	² ネズミ BAT の V _H に対するマウス生殖系列の V _H の残基 51 ~ 101	
BAT / 117	WINTDSG--ESTYAEFFKGRFAFSLETSANTAYLQINNLLNNDTATYFCVR	
VMS2/VGK4 / 92NT....P.....S.....K.....A.	
VMS9/VGK1A / 251 / 90YT....P...DD.....S.....K.....A.	
VGK6 / 89ET....P...DD.....S.....K.....--	10
VFM11/VGK1 B / 89YT....P...DD.....S.....K...M....A.	
264 / 88Y....VP...DD.....S.....K.....A.	
VFM1/281/VG K7 / 87ET....P...DD.....S.....K.....A.	
VMS1/141/VG K3 / 84	.KY.NT....P...GDD.....S.....K...M....A.	
161 / 84YT....P...DD.....C.S.....K.Q.....----	
VGK5 / 79H....VPK...D.....S.....K...M....--	
VGK2 / 77H....VPK...D.....S.....S...K.....--	
V104A/VAR10 4A / 57	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.V...A.	20
VH105 / 57	Y.YPRD...STN.N.K...KATLTAD..SS...M.LSS.TS..S.V...A.	
VAR104 / 56	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.V...A.	
J558-43y / 56	..YPGD...NTK.N.K...KTTLTADK.SS...M.LSS.TS..S.V...A.	
J558-122B / 55	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.VH...A.	
37A11 / 55	K.LPG....STN.N.K...KAK.TADI.S...M.LSS.TS..S.V.Y.A.	
VH104A / 55	A.FPAG...STN.NQM...KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.V...A.	
VAR100 / 54	Q.FPA....STN.N.M.E.KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.V.Y.A.	

【 0 1 4 6 】

30

¹ B A T 配列と同一である残基数² 点 [.] は B A T の V_H とマウス生殖系列の V_H とのマッチを示し、線 [-] はアミノ酸が存在しないことを示す

【実施例 3】

【 0 1 4 7 】

ヒト化 B A T - 1 の V 抗体変異体の設計

B A T - 1 抗体のヒト化可変領域の設計における第 1 のステップは、ヒト化 B A T - 1 の V 領域の基礎として役割を果たすヒト 軽鎖可変領域の選択であった。このプロセスの補助として、B A T - 1 の V 領域をまずカバットと共同研究者が定義した (K a b a t 他、同上) 4 つのヒト 軽鎖可変領域サブグループのコンセンサス配列と比較した。

40

【 0 1 4 8 】

マウス B A T - 1 軽鎖可変領域はヒト 軽鎖サブグループ I 及びヒト 軽鎖サブグループ I I I のコンセンサス配列に最も類似していた。ヒト 軽鎖サブグループ I の場合、マウス B A T - 1 の V 領域は可変領域全体で 63 . 21 %、F R 内のみで 70 . 00 % の同一性を示した。類似度に関して測定すると、これらの値は全体で 71 . 70 %、F R 内のみで 80 . 00 % まで上昇した。ヒト 軽鎖サブグループ I I I の場合、マウス B A T - 1 の V 領域は可変領域全体で 65 . 09 % の同一性、F R 内のみで 68 . 75 % の同一性を示した。類似度に関して測定すると、これらの値は全体で 74 . 53 %、F R 内のみで 80 . 00 % まで上昇した。したがって、これは一般に広範囲のヒト 軽鎖可変領域配列と良好にマッチすると考えられるが、とりわけ F R に関しては、ヒト 軽鎖サブグル

50

ープ I 内で見つかったものに対して同一性が僅かに高かった。

【0149】

その後、マウス B A T - 1 の V 領域を公的に公開されているヒト可変領域の個別の配列の全ての記録例と比較した。表 3 は、この解析によって同定したマウス B A T - 1 の V 領域に対する 15 個の最も良好なマッチを示す。全体としては、検索アルゴリズムにより抗体 T E L 9 由来のヒト V 領域 (M a r k s 他、J . M o l . B i o l . 、 2 2 2 : 5 8 1 、 1 9 9 1) がマウス B A T - 1 の V 領域に最も近いマッチとして選択された (表 4) 。このヒト配列は B A T - 1 の V 領域に対して全体で 6 7 . 9 3 % 、 F R 内のみで 7 2 . 5 0 % の全体的な同一性であった。類似度に関して測定すると、これらの値は全体で 7 7 . 3 6 % 、 F R 内のみで 8 2 . 5 0 % まで上昇した。したがって、T E L 9 軽鎖可変領域の F R を B A T - 1 抗体 軽鎖可変領域のヒト化のヒトアクセプター配列として選択した。その後、これを B A T - 1 の 軽鎖の第 1 のヒト化変型 (B A T R _A) の基礎とし、これは本質的に B A T - 1 の V 領域の C D R 及び T E L 9 の V 領域の F R を含んでいた。

10

【0150】

設計プロセスの次のステップは、これらのアミノ酸残基のうちいずれかが抗原との相互作用によって直接、又は C D R ループのコンホメーション若しくは配向を変更することによって間接的に抗原への結合に悪影響を与える可能性があるかどうかを決定するために、ヒトアクセプター T E L 9 の V 領域の F R のアミノ酸配列を研究することであった。これは、B A T - 1 可変領域、即ち V 及び V _H 領域のいずれのモデルも利用可能であったことで初めて可能になった、困難なプロセスであった。モデリングの手順は実施例 5 で詳細に示す。それでもやはり、抗原の結合性に影響を与えると考えられるマウス B A T - 1 の F R 内のアミノ酸は全て、その後ヒト化 B A T - 1 抗体中で保存することを検討した。どのネズミ残基を保存するかは決定には、以下の点を検討した：

20

【0151】

表3

名称	¹ ID	² ネズミBATのV _K に対する最も相同な15個のヒトV _K																			
		³ SCSCCcccsCccccccsccccCCscsSSscscSSSSccccccC																			
残基 1-36		1					2					3									
		0123456789012345678901234567ABCDEF890123456																			
		⁴ v v					=====L1=====vv														
BAT	100	-QIVLTQSPAImSASPGEKVTITCSARS-----SVSYMHWF																			
TEL9	64.8	E.....SSL...V.DR.....R.SQ_SISN.LN.Y																			
VIクローン47	63.3	D..M.....SSL...V.DR.....R.SQ_SIS..LN.Y																			
SiP055	63.3	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVS..LA.Y																			
039741	63.9	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVS..LA.Y																			
AC32	63.9	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVS..LA.Y																			
AC21B	64.5	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVS..LA.Y																			
B9601(Vg-Jk2)	62.7	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVS..LA.Y																			
LS1	62.4	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVS..LA.Y																			
TR1.21	63.0	EL.M.....SSL...V.DR.....R.SQ_SIS..LN.Y																			
AC18	63.0	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVSG..LA.Y																			
19.E7	63.6	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVS..LA.Y																			
STRAb SA-1A	63.0	D.QM.....SSL...V.DR.....R.SQ_SIS..LN.Y																			
VIクローン49	62.4	D..M.....SSL...V.DR.....R.SQ_SIS..LN.Y																			
MP6	62.4	D.QM.....SSL...V.DR.....R.SQ_SIS..LN.Y																			
AC33	63.6	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ_SVG.SLA.Y																			
		ccccscCsCCCCcccsccsSCCsCCCCCSCCSCcccccccs																			
残基 37-80		4				5				6				7				8			
		78901234567890123456789012345678901234567890																			
		vvvv==L2==v v vv v																			
BAT	100	QQKPGTSPKLWIYRTSNLASGVPARFSGSGGTSYCLTISRMEA																			
TEL9	64.8KA...L..AA.T.Q.....S.....DFT...NSLQP																			
VIクローン47	63.3KA...L..AA.S.Q.....S.....DFT....SLQP																			
SiP055	63.3QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT....SL.P																			
039741	63.9QA.R.L..DA..K.T.....DFT....SL.P																			
AC32	63.9QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT....SL.P																			
AC21B	64.5QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT....SL.P																			
B9601(Vg-Jk2)	62.7QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT....SL.P																			
LS1	62.4	..R..QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT....SL.P																			
TR1.21	63.0KA...L..AA..Q.....S.....DFT....SLQP																			
AC18	63.0QA.R.L..D.F.R.T.I.....DFT....SL.P																			
19.E7	63.6QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT....SL.P																			
STRAb SA-1A	63.0KA...L..AA.S.Q.....S.....DFT....SLQP																			
VIクローン49	62.4KA...L..AA.S.Q.....S.....DFT....SLQP																			
MP6	62.4KA...L..AA.S.Q.....S.....DFT....SLQP																			
AC33	63.6QA.R.LV.D...R.T.I.....DFT....SL.P																			

【表 3 - 2】

残基 81-107	sccccCCcccc									ccccCcscccc									
	9									10									
	12345678901234567890123456A7																		
	=====L3=====									v									
BAT	100	EDAATYYCQ QRSSFP-----LTFGSGTKLEI-K																	
TEL9	64.8	..F.....TN...								G.....								
VIクローン47	63.3	..F.....SY.T.								G...V..								
SiP055	63.3	..F.V.....NW.									R...Q.....								
039741	63.9	..F.V.....S.KW.								G...V..								
AC32	63.9	..F.V.....NW.P								G...V..								
AC21B	64.5	..F.V.....NW.								G...V..								
B9601(Vg-Jk2)	62.7	..F.V.....NW.P									Y...Q.....								
LS1	62.4	..F.V.....NW.								G...V..								
TR1.21	63.0	..F.....SY.T.									F...G...V..								
AC18	63.0	..F.V.....Y.W.P								G...V..								
19.E7	63.6	..F.V.....NW.								P...VD..								
STRAb SA-1A	63.0	..F.....SY.T.								G...V..								
VIクローン49	62.4	..F.....SY.T.									R...Q...V..								
MP6	62.4	..F.....SY.P.PV									Y...Q.....								
AC33	63.6	..F.D.....EW.								G...V..								

【 0 1 5 2 】

¹ ID - ヒトV 配列のネズミBATのV 領域に対する同一性の割合

² 点 [.] はBATのV とマウス生殖系のV とのマッチを示し、線 [-] はアミノ酸が存在しないことを示し、ヒトV 配列内の下線を引いた残基はその最も近いヒトV 遺伝子と異なる

³ S / C はFvの表面又はコア上のCDRから5 以内に位置するアミノ酸を示し、s / c はFvの表面又はコア上のCDRから5 よりも離れて位置するアミノ酸を示す

⁴ v はFR内に位置するバーニア残基 (Footer 他、J . Mol . Biol .、22 4 : 487、1992) を示す

【 0 1 5 3 】

【表 4】

表 4

名称	¹ ID	² 全て	³ 表面	⁴ コア	カバット CDR	⁵ FR	³ FR 表面	⁴ FR コア	⁶ CDR近くの FR
BAT V _K	100.0	106	23	81	26	80	17	63	32
TEL9	64.8	70	11	59	13	58	10	50	26
V1クローン47	63.3	69	11	59	13	57	10	50	26
SiP055	63.3	69	11	59	13	57	10	50	26
039741	63.9	69	11	59	13	57	10	50	26
AC32	63.9	69	11	59	13	57	10	50	26
AC21B	64.5	69	11	59	13	57	10	50	26
B9601 (Vg-Jk2)	62.7	69	11	59	13	57	10	50	26
LS1	62.4	68	11	59	13	57	10	50	26
TR1.21	63.0	68	11	58	13	57	10	50	26
AC18	63.0	68	11	58	13	57	10	50	26
19.E7	63.6	68	11	58	12	57	10	50	26
STRAb SA-1A	63.0	68	11	58	12	57	10	49	26
V1クローン49	62.4	68	11	58	12	57	10	49	26
MP6	62.4	68	11	58	12	57	10	49	25
AC33	63.6	68	11	58	12	57	10	49	25
名称	バーニア ⁸ V _K	⁸ J	近いヒト 生殖 系列	⁹ L1 サイズ	L2 サイズ	L3 サイズ	¹⁰ L1 クラス	L2 クラス	L3 クラス
BAT V _K	14	94	12	10	7	9	?	1/7A	?
TEL9	12	60	10	DPK8-Vd+	11	同一	2/11A	同一	?
V1 クローン47	12	60	10	V3b+	11	同一	2/11A	同一	1/9A
SiP055	12	60	10	3A7	11	同一	2/11A	同一	1/9A
039741	12	59	10	3A7	11	同一	10	2/11A	同一
AC32	12	59	10	3A7	11	同一	10	2/11A	同一
AC21B	12	59	10	3A7	11	同一	10	2/11A	同一
B9601 (Vg-Jk2)	12	59	10	3A7	11	同一	10	2/11A	同一
LS1	12	59	10	3A7	11	同一	10	2/11A	同一
TR1.21	12	59	10	V3b+	11	同一	10	2/11A	同一
AC18	12	59	10	3A7	11	同一	10	2/11A	同一
19.E7	12	59	10	3A7	11	同一	10	2/11A	同一
STRAb SA-1A	12	59	10	V3b+	11	同一	10	2/11A	同一
V1クローン49	12	59	10	V3b+	11	同一	10	2/11A	同一
MP6	12	59	10	V3b+	11	同一	11	2/11A	同一
AC33	12	59	10	3A7	11	同一	10	2/11A	同一

【 0 1 5 4 】

¹ ID - ヒト V 配列のネズミ BAT の V 領域に対する同一性の割合 ² 全て - ネズミ BAT の V 領域全体と比較した場合の、ヒト V 領域全体中の同一残基数

³ 表面 (FR 表面) - 表面上の同一 (FR) 残基数

⁴ コア (FR コア) - Fv ドメインの (FR) コア内の同一残基数

10

20

30

40

50

⁵ C D R / F R - C D R 又は F R 内の同一残基数；

⁶ C D R 近くの F R - C D R の 5 以内の F R アミノ酸の間の同一残基数を表す；

⁷ バーニア - 14 個のバーニアアミノ酸 (F o o t e 他、同上) 間の同一残基数；

⁸ V (J 鎖) - V (J 鎖) 遺伝子内の同一残基数

⁹ L 1 ~ L 3 サイズ - 各 C D R 内の残基数

¹⁰ L 1 ~ L 3 クラス - マーチン&ソントン (M a r t i n 他、同上) による C D R の標準クラス

【 0 1 5 5 】

a . 超可変性ループの標準構造 (C h o t h i a 他、1987、1989、1992、同上；T r a m o n t a n o 他、同上) が保存されていたことは非常に重要であった。したがって、ヒト化 B A T - 1 可変領域内でこれらの標準構造の一部であったマウス F R 残基を全て保存することが重要であった。

10

【 0 1 5 6 】

b . 抗原の結合において重要な役割を示していたかもしれない例外的な又は稀少な残基を同定するために、m B A T - 1 抗体可変領域の配列を他のマウス抗体由来の類似した配列と比較した。その後、B A T - 1 可変領域遺伝子のモデルを用いてこれを調査した。

【 0 1 5 7 】

c . ヒト化 F R 内に存在しない他のマウス F R 残基のいずれかが何らかの方法で抗原の結合に影響を与える可能性があるかどうかを予測してみるために、モデルの直接解析も行った。

20

【 0 1 5 8 】

d . 軽鎖及び重鎖可変領域の個々のヒトアクセプター配列とアクセプター配列が属するヒト可変領域サブグループのコンセンサス配列との比較も行った。ヒトドナー配列内のどの特異体質性アミノ酸の同定も、これらが抗原の結合に悪影響を与えた可能性があるので、重要であった。

【 0 1 5 9 】

e . 選択したヒト軽鎖及び重鎖可変領域は2つの異なるヒト抗体に由来するので (ヒト V_H アクセプター配列の選択には実施例4を参照されたい)、ドナー及びアクセプターの軽鎖可変領域のどちらのドメイン間パッキング残基でも丁寧な解析を行うべきである。これは、ヒト化 B A T - 1 抗体の C D R ループ構造のコンホメーションにかかわらず、この領域内のミスパッキングは全て抗原の結合に劇的な影響を与えた可能性があったからである。

30

【 0 1 6 0 】

f . この設計プロセスに従うことにより、ネズミ B A T - 1 の V の F R 内のいつかのアミノ酸を、ヒト化 B A T - 1 抗体の第2の変型 (B A T R_B) 中で保存するために同定した (表5)。表5は、B A T - 1 抗体 軽鎖可変領域の第1 (B A T R_A) 及び第2 (B A T R_B) の再構成ヒト変型の設計をもたらすアミノ酸配列のアラインメントを提供する。ドナーマウス B A T - 1 の V 領域とアクセプターヒト T E L 9 の V 領域との F R で21個のアミノ酸の差異が存在していた。しかし、ヒト F R 内に存在するアミノ酸を元のマウス F R 内に存在するアミノ酸に変換する必要があると考えられたヒト化 F R 内には、5個の残基しか存在していなかった。

40

【 0 1 6 1 】

コーチアと共同研究者 (C h o t h i a 他、J . M o l . B i o l .、186 : 651、1985) が定義した V / V_H の境界面に位置する V 領域のアミノ酸を、例外的な又は稀少な残基について確認した。この解析から、少しでも懸念を引き起こした残基位置は F R 2 の位置 36 (P h e 36) の P h e のみであった。 (T E L 9 で見つかったように) 通常はこの位置に T y r が見つかるが、m B A T - 1 では P h e が存在していた。さらに、位置 36 はバーニアアミノ酸 (F o o t e 他、同上) の認識された位置である。バーニア残基は C D R ループのコンホメーションを維持するために重要であると考えられていた。さらに、P h e は一般にカバットマウスサブグループ V I では見られないが (²¹

50

/ _{1 5 3})、T y r はマウスサブグループ V I (^{1 3 1} / _{1 5 3}) 及びヒトサブグループ I (^{6 6} / _{7 4}) のいずれでも非常によく見られた (K a b a t 他、同上)。したがって、T y r 3 6 P h e の変化は、2つの外来ヒトアクセプター可変領域間の B A T - 1 で見つかるドメイン間パッキングを模倣するためにも、C D R ループのコンホメーションを維持するためにも適切であると考えられた。

【 0 1 6 2 】

【表 5 - 1】

表 5

カバット	#	FR 又は CDR	マウス BATの V _K	マウス κ-VI	ヒト κ-I	ヒト アクセプター TEL9	表面 又はコア	BAT R _{KA}	BAT R _{KB}	備考
1	1	FR1	Q	Q	D	E	S	<u>E</u>	<u>E</u>	
2	2		I	I	I*	.	C	I	I	コーチア 標準 (L1); マーチン標準 (L1/L3); バーニア
3	3		V	V*	Q	.	S	V	V	マーチン標準 (L3);

10

20

【表 5 - 2】

4	4		L	L*	M		C	L	L	コーチア 標準 (L1/L3); マーチン 標準 (L1/L3); バーニア
5	5		T	T	T*	.	C	T	T	
6	6		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	
7	7		S	S*	S*	.	c	S	S	
8	8		P	P*	P*	.	c	P	P	
9	9		A	A*	S*	S	s	<u>S</u>	<u>S</u>	
10	10		I	I*	S	S	C	<u>S</u>	<u>S</u>	
11	11		M	M	L	L	c	<u>L</u>	<u>L</u>	
12	12		S	S	S*	.	c	S	S	
13	13		A	A*	A	.	c	A	A	
14	14		S	S*	S	.	c	S	S	
15	15		P	P	V*	V	s	<u>V</u>	<u>V</u>	
16	16		G	G*	G*	.	c	G	G	
17	17		E	E	D	D	c	<u>D</u>	<u>D</u>	
18	18		K	K*	R	R	s	<u>R</u>	<u>R</u>	
19	19		V	V*	V	.	c	V	V	
20	20		T	T*	T*	.	c	T	T	
21	21		I	M	I*	.	c	I	I	
22	22		T	T*	T	.	C	T	T	
23	23	FR1	C	C*	C*	.	C	C	C	マーチン標準 (L1/L2)
24	24	CD R1	S	S	R	R	s	S	S	
25	25		A	A*	A	.	c	A	A	コーチア 標準 (L1); マーチン標準 (L1)
26	26		R	S*	S	S	s	R	R	
27	27		S	S*	Q	Q	s	S	S	
27A			-	-	S	-	s	-	-	
27B			-	-	L	-	c	-	-	
27C			-	-	V	-	s	-	-	
27D			-	-	x	-	c	-	-	
27E			-	-	x	-	s	-	-	
27F			-	-	-	-	s	-	-	
28			-	-	S	S	s	-	-	マーチン標準 (L3); BAT の V _K ではここにはアミノ 酸は存在しない
29	28		S	S*	I	I	s	S	S	マーチン標準 (L3)

10

20

30

40

【表 5 - 3】

30	29		V	V	S	S	c	V	V	コーチア 標準 (L1); マーチン標準 (L1)
31	30		S	S	N	N	c	S	S	マーチン標準 (L3)
32	31		Y	Y*	Y	.	c	Y	Y	マーチン標準 (L3)
33	32		M	M	L*	L	c	M	M	コーチア 標準 (L1); マーチン標準 (L1/L3)
34	33	CD R1	H	H	A	N	c	H	H	パッキングアミノ酸
35	34	FR2	W	W*	W*	.	C	W	W	マーチン標準 (L1); パーニア
36	35		F	Y	Y	Y	C	Y	F	パッキングアミノ酸 ; パーニア; マウス 生殖系列 = Tyr; (Δ1)
37	36		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	
38	37		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	パッキングアミノ酸
39	38		K	K*	K	.	c	K	K	
40	39		P	S	P*	.	s	P	P	
41	40		G	G	G	.	s	G	G	
42	41		T	T	K	K	c	<u>K</u>	<u>K</u>	マウス生殖系列 = Ser
43	42		S	S*	A	A	c	<u>A</u>	<u>A</u>	
44	43		P	P*	P*	.	C	P	P	コアパッキング アミノ酸
45	44		K	K*	K	.	s	K	K	
46	45		L	R	L	.	C	L	L	パーニア ; パッキングアミノ酸 ; マウス生殖系列 = Pro
47	46		W	W	L*	L	C	<u>L</u>	W	パーニア ; (Δ2)
48	47		I	I*	I*	.	C	I	I	コーチア 標準 (L2); パーニア
49	48	FR2	Y	Y*	Y	.	C			パーニア
50	49	CD R2	R	D	A	A	c	R	R	
51	50		T	T	A	A	c	T	T	コーチア 標準 (L2)
52	51		S	S*	S	.	c	S	S	コーチア 標準 (L2)
53	52		N	K	S	T	s	N	N	
54	53		L	L*	L*	.	c	L	L	
55	54		A	A	E	Q	c	A	A	
56	55	CD R2	S	S*	S	.	s	S	S	

10

20

30

40

【表 5 - 4】

57	56	FR3	G	G*	G*	.	S	G	G	
58	57		V	V*	V	.	C	V	V	
59	58		P	P*	P*	.	C	P	P	
60	59		A	A	S*	S	S	S	S	
61	60		R	R*	R*	.	c	R	R	
62	61		F	F*	F*	.	C	F	F	
63	62		S	S*	S	.	C	S	S	
64	63		G	G*	G*	.	C	G	G	コーチア 標準(L2); バーニア
65	64		S	S*	S	.	C	S	S	
66	65		G	G*	G*	.	C	G	G	バーニア
67	66		S	S*	S	.	S	S	S	
68	67		G	G*	G*	.	C	G	G	バーニア
69	68		T	T	T	.	C	T	T	バーニア
70	69		S	S*	D	D	S	<u>D</u>	<u>D</u>	
71	70		Y	Y	F	F	C	F	Y	コーチア 標準(L1); マーチン標準 (L1); バーニア; (Δ3)
72	71		C	S*	T	T	c	<u>T</u>	<u>T</u>	マウス生殖系列 = Ser
73	72		L	L*	L	.	c	L	L	
74	73		T	T*	T	.	c	T	T	
75	74		I	I*	I	.	c	I	I	
76	75		S	S	S	N	c	<u>N</u>	<u>N</u>	
77	76		R	S	S	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	マウス生殖系列 = Ser
78	77		M	M	L*	L	c	<u>L</u>	<u>L</u>	
79	78		E	E*	Q	Q	c	<u>Q</u>	<u>Q</u>	
80	79		A	A*	P	P	s	<u>P</u>	<u>P</u>	
81	80		E	E*	E	.	s	E	E	
82	81		D	D*	D	.	c	D	D	
83	82		A	A	F	F	c	<u>F</u>	<u>F</u>	
84	83		A	A*	A*	.	c	A	A	
85	84		T	T	T	.	c	T	T	
86	85		Y	Y*	Y*	.	c	Y	Y	
87	86		Y	Y*	Y*	.	C	Y	Y	パッキングアミノ酸
88	87	FR3	C	C*	C*	.	C	C	C	マーチン標準 (L3)
89	88	CD R3	Q	Q	Q	.	c	Q	Q	マーチン標準(L3); パッキングアミノ酸
90	89		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	コーチア 標準(L3); マーチン標準 (L3)
91	90		R	W	Y	T	c	R	R	マーチン標準(L3); パッキングアミノ酸

10

20

30

40

【表 5 - 5】

92	91		S	S	N	N	c	S	S	マーチン標準 (L3)
93	92		S	S	S	.	c	S	S	マーチン標準 (L3)
94	93		F	N	L	.	c	F	F	マーチン標準 (L3)
95	94		P	P	P	.	c	P	P	コーチア 標準(L3); マーチン標準 (L3)
95A			-	P	E	-		-	-	
95B			-	M	-	-		-	-	
95C			-	P	-	-		-	-	
95D			-	-	-	-		-	-	
95E			-	-	-	-		-	-	
95F			-	-	E	-		-	-	
96	95		L	L	W	.	c	L	L	マーチン標準 (L3); コア パッキングアミノ酸
97	96	CD	T	T*	T	.	c	T	T	マーチン標準 (L3)
98	97	R3 FR4	F	F*	F*	.	C	F	F	マーチン標準 (L3); バーニア; コアパッキング アミノ酸
99	98		G	G*	G*	.	c	G	G	
100	99		S	A	Q	G	s	G	G	
101	100		G	G*	G*	.	c			
102	101		T	T*	T*	.	c			
103	102		K	K*	K	.	c	K	K	
104	103		L	L*	V	.	c	L	L	
105	104		E	E*	E	.	c	E	E	
106	105		I	L	I	.	c	I	I	
106 A			-	-	-	-		-	-	
107	106	FR4	K	K*	K	.	s	K	K	

【 0 1 6 3 】

F R 2 内の位置 4 7 で第 2 の変更も決定した。ヒト T E L 9 の 軽鎖可変領域に見つかる高度に保存されている L e u を、マウス B A T - 1 の 軽鎖可変領域で見つかったように T r p に変更した。別の認められたバーニア残基位置は位置 4 7 であり、これも分子モデルに従って V_H 境界面の近くに配置した。具体的には、これは H 2 内の A 1 a 5 5 に近く、これと相互作用していたかもしれない。したがって、ヒト V_H 配列内のこのコア残基位置で T r p が見られたことはなかったが、L e u 4 7 T r p の改変を行うことでこれを B A T R_B 内で保存することが賢明であると考えられた。

【 0 1 6 4 】

B A T R_B に導入した第 3 の F R の変更は位置 7 1 にあり、これは、バーニア残基位置 (F o o t e 他、同上) として同定されているだけでなく、L 1 ループ構造の重要な標準残基位置の 1 つとしても認識されていた。これらの標準残基は、コーチアと共同研究者 (C h o t h i a 他、1987、1989、1992、同上; T r a m o n t a n o 他、同上) に、C D R ループ構造の保存に不可欠であると定義されている。標準アミノ酸の多くが C D R 内に位置するが、いくつか (7 1 T y r など) は F R 内にも位置していた。アミノ酸の変更は保存的であったが、P h e 7 1 T y r の変更は B A T - 1 の 軽鎖のヒト

化の成功に重要であるとみなされた。

【 0 1 6 5 】

ヒト化 V 領域の他の変型は以下の通りである：

B A T R_C : C y s 及び S e r は大きさ及び特徴が類似しており、モデルから、F R 3 内の位置 7 2 にあるいずれのアミノ酸も適度に埋まっており、L 1 ループとは反対方向を指していると考えられた。しかし、C y s アミノ酸の場合、モデルによれば硫黄側鎖が曝露しており、一方、カバットデータベース (K a b a t 他、同上) によればこの位置に C y s が存在することは独特の事象であり、一般的にはこの位置で S e r が見られる (^{4 2} _{1 / 1 2 3 4})。したがって、B A T R_C は (B A T R_B のように) T y r 3 6 P h e、L e u 4 7 T r p 及び P h e 7 1 T y r での変更、並びにアクセプター T E L 9 抗体の V F R 残基の S e r 7 2 C y s の改変を含んでいた。

B A T R_D : ネズミ B A T - 1 F v モデルからの証拠により、表面に曝された 7 0 S e r が L 1 ループと相互作用し得る残基であることが示唆される。ヒト T E L 9 軽鎖では、この位置のアミノ酸は A s p であり、これは S e r よりも大きく、正に帯電している。ヒト V 領域内ではこの位置で S e r が見られることはない (A s p が圧倒的に最も一般的なアミノ酸である)。7 0 S e r が L 1 ループに近いこと及び表面に曝された性質であることは、これが L 1 と相互作用しているかもしれない、又は抗原と直接相互作用さえしているかもしれないことを仮定的に示唆している。したがって、B A T R_D で A s p 7 0 S e r の変更を行うことを決定し、これはこの変更以外は B A T R_C と同じである。

【 0 1 6 6 】

上で提案した全てのヒト化 B A T - 1 抗体の V 領域変異体のアミノ酸配列の説明を図 5 に示す。

【 0 1 6 7 】

潜在的な N 結合グリコシル化部位、即ち A s n - X a a - (S e r / T h r) - X a a (G a v e l 他、P r o t e i n E n g .、3 : 4 3、1 9 9 0) を、ドナーマウス及びアクセプターヒト V 領域、並びにヒト化構築体自体について検索したが、いずれも同定されなかった。

【実施例 4】

【 0 1 6 8 】

ヒト化 B A T - 1 の V_H 抗体変異体の設計

ここでも、マウス B A T - 1 抗体のヒト化 V_H 領域の設計の第 1 のステップは、ヒト化 B A T - 1 の V_H 領域の基礎として役割を果たすアクセプターヒト重鎖可変領域の選択であった。最初に m B A T - 1 の V_H 領域を 3 つのヒト重鎖可変領域サブグループのコンセンサス配列と比較した際、ヒト重鎖サブグループ I のコンセンサス配列と最も類似していることが判明し、全体で 6 1 . 5 4 % の同一性、F R 間のみで 6 7 . 8 2 % の同一性であった。類似度に関して測定すると、これらの値も全体で 7 0 . 0 9 %、F R 内のみで 7 7 . 0 1 % まで上昇した。

【 0 1 6 9 】

【表 6 - 1】

表 6

名称	ID	ネズミBATの V _H に対する最も相同的な15個のヒト V _H															
		scsCccccscScssccccscCccccCSCCs cccccCCccsss															
残基		1				2				3				4			
1-43		12345678901234567890123456789012345AB67890123															
		v								-vvvv===H1==							
BAT	100	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMN--WVKQAPG															
hsighvl295	65.0	.V.....S.....AS.....S.SSHAI. .R....															
R2C5H	60.3	.V.....S.....AS.....N..ST.AL. .MRR...															
030805	56.8	.V.....A.V....AS..V.....S.DI. .R..T.															
WIL2	57.7	.V.....A.V....AS..V..E...V...GHY.H .R....															
21/28	59.7	.V.....A.V....AS..V.....S.A.H .R....															
UC	57.7	.V.....A.V....AS..V..E.....GHY.H .R....															
030802	58.2	.V.....A.V....AS..V.....S.A.H .R....															
039734	57.7	.V.....A.V....AS..V..E.....GHY.H .G....															
030812	56.3	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H .R....															
030810	57.9	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H .R....															
4d275a	71.4	.V.....S.....AS..V.....S.A.. .G....															
030811	56.0	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H .R....															
IF10	59.3	.V.....A.V....AS..V.....S.DI. .R....															
GD9	71.4	.V.....S.....AS..V.....S.A.. .R....															
039232	59.3	.VH.....S.F....AS..V.....SSVI. .R....															
		ccccCccccsc cscscscscsCCCCCcSccccccccccsc															
残基		5				6				7				8			
44-82		456789012ABC345678901234567890123456789012ABC															
		vvv=====H2=====カバット- v v v v v															
BAT	100	KGLKWMGWINT-DSGESTYAEFPKGRFAFSLETSANTAYLQINN															
hsighvl295	65.0	Q..Q..... NT.SP...QG.T...V...D..VS.....TS.															
R2C5H	60.3	Q.....L NT.NP...QD.T...V...D..V...F...SS.															
030805	56.8	Q..E....M.P N..NTG..QK.Q..VTMTRN..IS...MELSS.															
WIL2	57.7	Q..E.....P N..GTN...K.Q..VTITRD..I...MELSR.															
21/28	59.7	QR.E.....A GN.NTK.SQK.Q..VTITRD...S...MELSS.															
UC	57.7	Q..E.....P N..GTN..QK.Q..VTITRD..I...MELSR.															
030802	58.2	QR.E.....A GN.NTK.SQK.Q..VTITRD...S...MELSS.															
039734	57.7	Q..E.....P N..GTN..QK.Q..VTITRD..I...MELSR.															
030812	56.3	Q..E...I..P SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.															
030810	57.9	Q..E...I..P SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.															
4d275a	71.4	Q..E..... NT.NP...QG.T...V...D..VS.....CS.															
030811	56.0	Q..E...I..P SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.															
IF10	59.3	Q..E....M.P N..NTG..QK.Q..VTMTRN..IS...MELSS.															
GD9	71.4	Q..E..... NT.DP...QG.T...V...D..VS.....SS.															
039232	59.3	Q..E..... NT.NP...QG.T...V...D..VT.T....S.															

10

20

30

40

【表 6 - 2】

残基		cssccccccCCCCccsscccccc cccc ccCcscccccc																																							
83-113		9										10										11																			
		345678901234567890ABCDEFGHIJK1234567890123																																							
		vv=====H3=====v																																							
BAT	100	NNEDTATYFCVRVGYDA-----LDYWGQGTSVTVSS																																							
hsighv1295	65.0	TA...GM...AKESHSSALDL																				-.....L.....																			
R2C5H	60.3	QA....V.Y.AKPKRGTYRRGYYYYP																				M.V.....T.....																			
030805	56.8	RS....V.Y.A.G..VWGSYRYTA																				AF.I.....M.....																			
WIL2	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYY																				FF.....L.....																			
21/28	59.7	RS....V.Y.A.G..YSGS																				-N.....L.....																			
UC	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYY																				FF.....L.....																			
030802	58.2	RS....V.Y.A..KWEQPIDAP																				F.....L.....																			
039734	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGYDCYYF																				F.....L.....																			
030812	56.3	RS....V.Y.A.D..YYDSNGYYSG																				YF.....L.....																			
030810	57.9	RS....V.Y.A..QWLGLTGPN																				-.....L.....																			
4d275a	71.4	KA....V.Y.A.-----																				-----																			
030811	56.0	RS....V.Y.A.D.IVVVPAAIPH																				YF.....L.....																			
IF10	59.3	RS....V.Y.A.NNGSY																				YF.....L.....																			
GD9	71.4	KA....V.Y.A.-----																				-----																			
039232	59.3	KA....V.Y.A.ELRNDHYVWXNYRPPLS-																																						

【 0 1 7 0 】

その後、マウスBAT-1のV_H領域を公的に公開されているヒト可変領域の個別の配列の全ての記録例と比較した。表6及び7は、この解析によって同定したマウスBAT-1のV_H領域に対する15個の最も良好なマッチを示す。全体としては、検索アルゴリズムにより抗体hsighv1295由来のヒトV_H領域(Fang他、J. Exp. Med.、179:1445、1994)がマウスBAT-1のV_H領域に最も近いマッチとして選択された。このヒトV_H領域はBAT-1のV_H領域に対して全体で69.23%の同一性であり(表7)、この値はFR内のみで比較した場合に74.71%まで上昇した。類似度に関して測定すると、これらの値は全体で75.21%、FR内のみで79.31%まで上昇した。したがって、このヒトFRをBAT-1重鎖のヒト化変型の基礎とした。

【 0 1 7 1 】

10

20

30

【表 7】

表 7

名称	ID	全て	表面	コア	カバット CDR	FR	FR 表面	FR コア	CDR近くの FR
BAT V _H	100	117	26	86	30	87	18	68	27
Hsighvl2 95	65.0	78	17	63	17	65	14	51	22
R2C5H	60.3	76	16	59	17	64	14	49	20
030805	56.8	71	16	56	14	59	13	47	19
WIL2	57.7	71	15	56	13	59	13	46	19
21/28	59.7	71	15	55	13	59	13	46	19
UC	57.7	71	15	55	13	59	13	46	19
030802	58.2	71	15	55	13	59	13	46	19
039734	57.7	71	15	55	13	57	13	46	19
030812	56.3	71	15	55	13	58	13	46	18
030810	57.9	70	15	55	13	58	13	46	17
4d275a	71.4	70	15	54	13	58	13	46	18
030811	56.0	70	15	54	13	58	13	46	18
IF10	59.3	70	15	54	13	58	13	46	18
GD9	71.4	70	15	54	11	58	13	46	18
039232	59.3	70	15	54	13	58	13	46	18

名称	バーニア	V _H	J	近いヒト生殖 系列	H1 サイズ	H2 サイズ	H3 サイズ	H1 クラス	H2 クラス
BAT V _H	16	98	19		5	17	8	?	?
Hsighvl2 95	13	70	14	VI-4.1b+	同一	同一	11	1/10A	2/10A
R2C5H	13	70	14	VI-4.1b+	同一	同一	17	同一	同一
030805	11	66	14	DP-15-V18+	同一	同一	14	1/10A	同一
WIL2	11	65	14	DP-8+	同一	同一	10	1/10A	同一
21/28	11	64	14	DP-25-VI3b+	同一	同一	14	1/10A	同一
UC	11	62	14	DP-8+	同一	同一	0	同一	同一
030802	11	62	14	DP-25-VI3b+	同一	同一	0	同一	同一
039734	11	62	14	DP-8+	同一	同一	0	同一	同一
030812	11	60	14	hvlfl0t	同一	同一	0	同一	同一
030810	11	59	14	hvlfl0t	同一	同一	0	同一	同一
4d275a	11	59	14	DP-21-4d275a+	同一	同一	0	同一	同一
030811	11	59	14	hvlfl0t	同一	同一	0	同一	同一
IF10	11	59	14	DP-15-V18+	同一	同一	0	同一	同一
GD9	11	58	14	VI-4.1b+	同一	同一	0	同一	2/10A
039232	11	58	14	VI-4.1b+	同一	同一	0	同一	2/10A

【 0 1 7 2 】

¹ ID - ヒト V_H 配列のネズミ BAT の V_H 領域に対する同一性の割合 ² 全て - ネズミ BAT の V_H 領域全体と比較した場合の、ヒト V_H 領域全体中の同一残基数

³ 表面 (FR 表面) - 表面上の同一 (FR) 残基数

⁴ コア (FR コア) - Fv ドメインの (FR) コア内の同一残基数

⁵ CDR / FR - CDR 又は FR 内の同一残基数

⁶ CDR 近くの FR - CDR の 5 以内の FR アミノ酸の間の同一残基数 ;

⁷ バーニア - 14 個のバーニアアミノ酸 (Foot e 他、同上) 間の同一残基数 ;

⁸ V_H (J 鎖) - V_H (J 鎖) 遺伝子内の同一残基数

⁹ L1 ~ L3 サイズ - 各 CDR 内の残基数

10

20

30

40

50

¹⁰ L1～L3クラス-マーチン&ソントン(Martin他、同上)によるCDRの標準クラス

【0173】

設計プロセスの次のステップは、これらのアミノ酸残基のうちいずれかが抗原への結合に悪影響を与える可能性があるかどうかを決定するために、ヒトアクセプターh s i g h v 1 2 9 5のV_H領域のFRのアミノ酸配列を研究することであった。ここでも、OMLにより構築された分子モデル(実施例5参照)がこの設計プロセスに重要であり、これからネズミBAT-1のV_H領域のFR内のいくつかのアミノ酸を、第1の(BATRH_A)及び続くヒト化BAT-1抗体の変型の保存について同定した(表8)。ドナーマウスBAT-1のFRとアクセプターヒトh s i g h v 1 2 9 5のV_H領域との間には22個

10

のアミノ酸の差異があり、9個までのネズミ残基をヒト化FR内で保存することを検討した。

【0174】

したがって、BATRH_Aはヒトh s i g h v 1 2 9 5抗体のV_H領域のFRに遺伝子挿入したマウスBAT-1抗体のV_H領域のCDRからなっていた。これはヒト化BAT-1抗体のV_H領域のCDRを移植した変型であり、いかなるFRアミノ酸の変更も含んでいなかった。

【0175】

BATRH_Bでは、マウスBAT-1配列のFR1内の位置28及び30のアミノ酸(即ちそれぞれThr及びThr)をヒト化BAT-1重鎖可変領域内で対応するヒトh s i g h v 1 2 9 5のアミノ酸(即ちそれぞれSer及びSer)に置き換えた。これを行ったのは、これらがH1超可変性ループコンホメーションに重要な標準残基の一部を表していたからである(Chothia他、1992、同上)。標準残基は超可変性ループの正しい配向及び構造に不可欠であるとみなされ、一般にヒト化可変領域内で必ず保存した。さらに、残基位置27～30はH1ループ自体の一部であり、したがってこのループの正しいコンホメーション及び配向においてより一層重要であるとみなされ、その保存がより強力に正当化された。したがって、これら2つの残基位置はBATRH_B内のヒトh s i g h v 1 2 9 5配列のFRに行った変更の合計である。

20

【0176】

設計プロセスの次のステップは、これらのアミノ酸残基のうちいずれかが抗原への結合に悪影響を与える可能性があるかどうかを決定するために、ヒトアクセプターh s i g h v 1 2 9 5のV_H領域のFRのアミノ酸配列を研究することであった。ここでも、OMLにより構築された分子モデル(実施例5参照)はこの設計プロセスに重要であり、これからネズミBAT-1のV_H領域のFR内のいくつかのアミノ酸を、第1の(BATRH_A)及び続くヒト化BAT-1抗体の変型の保存について同定した(表8)。ドナーマウスBAT-1のFRとアクセプターヒトh s i g h v 1 2 9 5のV_H領域との間には22個

30

のアミノ酸の差異があり、9個までのネズミ残基をヒト化FRで保存することを検討した。

【0177】

したがって、BATRH_Aはヒトh s i g h v 1 2 9 5抗体のV_H領域のFRに遺伝子挿入したマウスBAT-1抗体のV_H領域のCDRからなっていた。これはヒト化BAT-1抗体のV_H領域のCDRを移植した変型であり、いかなるFRアミノ酸の変更も含んでいなかった。

40

【0178】

BATRH_Bでは、マウスBAT-1配列のFR1内の位置28及び30のアミノ酸(即ちそれぞれThr及びThr)がヒト化BAT-1重鎖可変領域内で対応するヒトh s i g h v 1 2 9 5のアミノ酸(即ちそれぞれSer及びSer)に置き換えた。これを行ったのは、これらがH1超可変性ループコンホメーションに重要な標準残基の一部を表していたからである(Chothia他、1992、同上)。標準残基は超可変性ループの正しい配向及び構造に不可欠であるとみなされ、一般にヒト化可変領域内で必ず保存した

50

。さらに、残基位置 27 ~ 30 は H1 ループ自体の一部であり、したがってこのループの正しいコンホメーション及び配向においてより一層重要であるとみなされ、その保存がより強力に正当化された。したがって、これら 2 つの残基位置は BATH_B 内のヒト h s i g h v 1 2 9 5 配列の F R に行った変更の合計である。

【 0 1 7 9 】

【 表 8 - 1 】

表 8

カバット	#	FR 又は CDR	マウス BAT の V _H	マウス 種々 I	ヒト I	ヒト アクセプター- hsighv 1295	表面 又は コア	BAT RH _A	BAT RH _B	BAT RH _C	備考
1	1	FR 1	Q	E	Q	.	s	Q	Q	Q	
2	2		I	V*	V	V	c	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	マーチン標準 (H1); パーニア
3	3		Q	Q	Q	.	s	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L*	.	C	L	L	L	マーチン標準 (H1)
5	5		V	Q*	V	.	c	V	V	V	
6	6		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S*	.	c	S	S	S	
8	8		G	G	G*	.	c	G	G	G	
9	9		P	A*	A	S	s	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	
10	10		E	E	E	.	c	E	E	E	
11	11		L	L*	V	.	S	L	L	L	
12	12		K	V*	K	.	c	K	K	K	
13	13		K	K	K*	.	s	K	K	K	
14	14		P	P*	P*	.	s	P	P	P	
15	15		G	G	G*	.	c	G	G	G	
16	16		E	A	A	A	c	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
17	17		T	S*	S*	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	
18	18		V	V*	V	.	c	V	V	V	
19	19		K	K*	K	.	s	K	K	K	
20	20		I	L	V	.	c	I	I	I	マーチン標準 (H1)
21	21		S	S	S	.	c	S	S	S	
22	22		C	C	C*	.	C	C	C	C	マーチン標準 (H1)
23	23		K	T	K	.	c	K	K	K	
24	24		A	A*	A	.	c	A	A	A	コーチア標準 (H1); マーチン 標準 (H1)

【表 8 - 2】

25	25		S	S	S*	.	c	S	S	S	コーチア標準 (H1); マーチン 標準 (H1)
26	26		G	G	G*	.	c	G	G	G	
27	27		Y	P*	Y	.	C	Y	Y	Y	コーチア標準 (H1); バーニア
28	28		T	N	T	S	S	<u>S</u>	T	T	バーニア; ($\Delta 1$)
29	29		F	I*	F*	.	C	F	F	F	コーチア標準 (H1); マーチン 標準 (H1); バーニア
30	30	FR 1	T	K	T	S	C	<u>S</u>	T	T	バーニア; ($\Delta 2$)
31	31	CDR 1	N	D	S	S	s	N	N	N	
32	32		Y	T	Y	H	c	Y	Y	Y	マーチン標準 (H1)
33	33		G	Y*	A	A	c	G	G	G	マーチン標準 (H1/H2)
34	34		M	M	I	I	c	M	M	M	コーチア標準 (H1) マーチン標準 (H1)
35	35		N	H	S	.	c	N	N	N	マーチン標準 (H1); パッキング アミノ酸
35a			-	-	-	-	-	-	-	-	
35b		CDR 1	-	-	-	-	-	-	-	-	
36	36	FR 2	W	W	W*	.	C	W	W	W	マーチン標準 (H1)
37	37		V	V*	V	.	C	V	V	V	パッキングアミノ酸
38	38		K	K	R*	R	C	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	
39	39		Q	Q	Q*	.	c	Q	Q	Q	パッキングアミノ酸
40	40		A	R	A	.	c	A	A	A	
41	41		P	P	P	.	s	P	P	P	
42	42		G	E*	G*	.	s	G	G	G	
43	43		K	Q*	Q	Q	s	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	
44	44		G	G*	G	.	c	G	G	G	
45	45		L	L	L*	.	C	L	L	L	コアパッキングアミノ酸
46	46		K	E	E*	Q	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	
47	47		W	W	W*	.	C	W	W	W	マーチン標準 (H2); パッキング アミノ酸
48	48		M	I*	M	.	C	M	M	M	マーチン標準 (H1)

10

20

30

40

【表 8 - 3】

49	49	FR 2	G	G*	G*	.	C	G	G	G	
50	50	CDR 2	W	R	W	.	c	W	W	W	マーチン標準 (H2)
51	51		I	I	I	.	c	I	I	I	マーチン標準 (H1/H2)
52	52		N	D*	N	.	c	N	N	N	マーチン標準 (H2)
52a	53		T	P*	P	.	c	T	T	T	コーチア標準 (H2) マーチン標準 (H2)
52b			-	-	Y	-		-	-	-	マーチン標準 (H2)
52c			-	-	-	-		-	-	-	マーチン標準 (H2)
53	54		D	A	G	N	s	D	D	D	マーチン標準 (H2)
54	55		S	N	N	T	c	S	S	S	マーチン標準 (H2)
55	56		G	G	G	.	c	G	G	G	コーチア標準 (H2); マーチン 標準 (H2)
56	57		E	N	D	S	s	E	E	E	マーチン標準 (H2)
57	58		S	T	T	P	c	S	S	S	
58	59		T	K	N	.	c	T	T	T	マーチン標準 (H2)
59	60		Y	Y	Y	.	c	Y	Y	Y	マーチン標準 (H2)
60	61		A	D	A	.	c	A	A	A	
61	62		E	P*	Q	Q	s	E	E	E	
62	63		E	K*	K	G	s	E	E	E	
63	64		F	F*	F	.	c	F	F	F	
64	65		K	Q*	Q	T	s	K	K	K	
65	66	CDR 2	G	G	G	.	s	G	G	G	
66	67	FR 3	R	K	R	.	C	R	R	R	
67	68		F	A	V	.	C	F	F	F	
68	69		A	T*	T	V	C	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	
69	70		F	I	I	.	C	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	マーチン標準 (H1/H2)
70	71		S	T*	T	.	C	S	S	S	
71	72		L	A*	A	.	C	L	L	L	コーチア標準 (H2); マーチン 標準 (H2)
72	73		E	D	D	D	c	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	

10

20

30

40

【表 8 - 4】

73	74		T	T*	T	.	S	T	T	T	
74	75		S	S*	S*	.	s	S	S	S	
75	76		A	S*	T	V	c	V	V	V	
76	77		N	N*	S	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	N	(Δ3)
77	78		T	T*	T	.	c	T	T	T	
78	79		A	A*	A	.	c	A	A	A	マーチン標準 (H1/H2)
79	80		Y	Y*	Y	.	c	Y	Y	Y	
80	81		L	L	M	.	c	L	L	L	マーチン標準 (H1)
81	82		Q	Q*	E	.	c	Q	Q	Q	
82	83		I	L*	L	.	c	I	I	I	
82a	84		N	S*	S	T	c	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
82b	85		N	S*	S	S	s	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	
82c	86		L	L	L*	.	c	L	L	L	
83	87		N	T*	R	T	c	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
84	88		N	S*	S	A	s	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
85	89		E	E*	E	.	s	E	E	E	
86	90		D	D*	D*	.	c	D	D	D	
87	91		T	T*	T	.	c	T	T	T	
88	92		A	A	A	G	c	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	
89	93		T	V	V	M	c	<u>M</u>	<u>M</u>	<u>M</u>	
90	94		Y	Y	Y*	.	c	Y	Y	Y	マーチン標準 (H1)
91	95		F	Y*	Y	.	C	F	F	F	パッキング'アミノ酸
92	96		C	C	C*	.	C	C	C	C	マーチン標準 (H1)
93	97		V	A	A*	A	C	<u>V</u>	<u>V</u>	A	パッキング'アミノ酸;(Δ4)
94	98	FR 3	R	R	R	K	C	<u>R</u>	<u>R</u>	K	コーチア標準 (H1);マーチン 標準 (H1); (Δ5)
95	99	CDR 3	V	G	A	E	c	V	V	V	パッキング'アミノ酸
96	100		G	Y	P	S	c	G	G	G	
97	101		Y	L	G	H	s	Y	Y	Y	
98	102		D	R	Y	S	s	D	D	D	
99	103		A	R	G	S	c	A	A	A	
100			-	D	S	A		-	-	-	
100 a			-	-	G	L		-	-	-	
100 b			-	-	G	D		-	-	-	
100 c			-	-	G	-		-	-	-	
100 d			-	-	C	-		-	-	-	
100 e			-	-	Y	-		-	-	-	
100 f			-	-	R	-		-	-	-	
100 g			.	-	G	-		.	.	.	
100 h			.	-	D	-		.	.	.	
100 i			.	-	Y	-		.	.	.	
100 j			.	-	x	-		.	.	.	

10

20

30

40

【表 8 - 5】

100 k	104		L	-	F	.	c	L	L	L	コアパッキング'アミノ酸
101	105		D	D	D	.	c	D	D	D	
102	106	CDR 3	Y	Y	Y	.	c	Y	Y	Y	マーチン標準 (H1)
103	107	FR 4	W	W	W*	.	C	W	W	W	コアパッキング'アミノ酸
104	108		G	G	G	.	c	G	G	G	
105	109		Q	Q	Q	.	s	Q	Q	Q	
106	110		G	G	G*	.	c	G	G	G	
107	111		T	T*	T	.	c	T	T	T	
108	112		S	S	L	L	c	L	L	L	
109	113		V	V	V*	.	c	V	V	V	
110	114		T	T	T	.	c	T	T	T	
111	115		V	V*	V*	.		V	V	V	
112	116		S	S	S*	.		S	S	S	
113	117	FR 4	S	S	S*	.		S	S	S	

10

【0180】

ヒト化BAT-1のV_H領域(BATRH_C)の第3の変型にはBATRH_Bで行った全ての置換が組み込まれており、それに加えて、対応するヒト残基の替わりにヒトFR内に挿入されたさらに3つのネズミアミノ酸が含まれていた。1つめはFR3の位置76に位置するAsnアミノ酸であった。BAT-1のFv領域の分子モデルによれば、Asn残基はCDRのH1に近く、ループ構造を支持していた可能性がある。さらにマウスBAT-1のV_H領域では、Asnは表面に曝されており、ヒトhshg1295のFR内のSerよりも大きかった。したがって、FRにSer76Asnの置換を行った。

20

【0181】

Chothia他(Chothia他、1992、同上)並びにマーチン及びソートン(Martin他、同上)によってH3ループのコンホメーションに重要であると以前に同定された残基位置である、V_H領域のFR3の位置94でアミノ酸にさらなる変更を行った。さらに、分子モデルにより、CDRのH3内でArg94がAsp101と塩橋を形成することができ、ループ構造を安定化させることが示された。したがって、マウス中のArgでこの残基位置でヒト中のLysを置き換えた。最後の改変はFR3内の位置93で行い、ヒトAlaをネズミValアミノ酸で置き換えた。この残基はコーチア(Chothia他、1985、同上)が定義するようにパッキング残基であるとみなされ、V_H及びV_H領域の正しいパッキングに重要である。さらに、これはバーニア残基位置と同定され、したがって分子モデルの解析によって確認された分類であるCDRループのコンホメーションの維持に重要である。総合すると、全てのデータ及び分子解析は、これら3つのネズミ残基をBATRH_Cのヒト化V_H領域内で保存すること、即ちSer76Asn、Ala93Val及びLys94Argが適切であることを示唆している。

30

40

【0182】

BAT-1のV_H領域の次の2つのヒト化変異体の構築は、これらの第1の3つのヒト化変型、即ちBATRH_A、BATRH_B及びBATRH_Cの結合親和性に依存していた。これら3つのどれもが十分な結合レベルを示せなかった場合は、変型BATRH_D及びBATRH_Eを合成して試験する。

【0183】

ヒト化BAT-1のV_H領域の変型D(BATRH_D)にはBATRH_Cで行った全ての置換が組み込まれており、それに加えてFR1の位置2に位置する1つのさらなるマウスアミノ酸が含まれていた。この位置は標準(Martin他、同上)及びバーニア(Footte他、同上)残基位置のいずれとしても定義された。さらに、BAT-1可変領域

50

のモデルから、それ自体がH1ループ構造の一部であるネズミIleアミノ酸はFR1のTyr27に近かった。逆に、マウス及びヒトのFRでこの位置にあるネズミIle及びヒトValアミノ酸は、特徴が類似しており大きさが僅かしか異っていなかった、即ち、Ileは余分なメチル基を有していた。したがって、ヒト化手順のこの段階でのみVal2Ileの変更を行い、変異を変型BATH_Dに組み込むことを決定した。

【0184】

ヒト化BAT-1重鎖可変領域(BATH_E)の最後の変型にはBATH_Dで行った全てのマウスFRの置換に加えて、位置38(FR2)、46(FR2)及び68(FR3)で3つのさらなるアミノ酸の変更を組み込んだ。

【0185】

Arg38Lysの改変は、V_H領域のコアに深く埋まっているArgがCDRのH2のPhe63に近いことを示唆していたので行った。しかし、これは以前に同定された標準又はバーニア残基位置ではなかった。さらに、Argの方が大きい、ArgとLysは構造が比較的類似しており、どのアミノ酸変更も有為性の判断が困難であった。したがって、これは仮定的な可能性としてのみ考慮され、ヒト化BAT-1抗体の結合親和性が乏しいと判明した場合にのみ置換を行うこととした。同じ原理がGln46Lysの改変を選択した背景にもあった。分子モデルによればLysアミノ酸は半分埋まっていたが、CDRのH2内でGlu62及びPhe63に近かった。より大きな、帯電したLys46残基が抗原と直接相互作用できる可能性が僅かにあったので、これをBATH_E中で保存した。ネズミ68Alaアミノ酸を保存する事例では、それがCDRのH2、特にH2ループ内の残基Tyr59に近接すること、及びその結果それがループ構造に影響を与えている可能性に関連していた。Alaは小さいので重要である可能性が低い、ヒトHis1295のFR内で見つかるより大きなValはH2ループ構造に有害な影響を与えた可能性がある、ネズミAla残基で置き換えた。

【0186】

上記で提案した全てのヒト化V_H領域変異体のアミノ酸配列の説明を図6に示す。

【0187】

潜在的なN結合グリコシル化部位、即ちAsn-Xaa-(Ser/Thr)-Xaa(Gaveil他、同上)を、ドナーマウス及びアクセプターヒトV_H領域、並びにヒト化構築体自体について検索したが、いずれも同定されなかった。

【実施例5】

【0188】

ネズミ及びヒト化BAT-1Fvドメインの分子モデリング

BAT-1抗体のヒト化可変領域の設計を補助するために、ネズミ及びヒト化抗体の可変領域の分子モデルをどちらも構築した。これらの構造のモデリングは、相同性によるモデリング及びab initio技術の確立された方法のいずれも使用して実現した。これは、Oxford Molecular Limited(OML)が提供及び利用するAbM分子モデリングパッケージを用いて行った。AbMを用いたモデリングで使用可能にするために、利用可能なブルックヘブンデータベースからの抗体X線結晶解析構造を整えた。

【0189】

BAT-1可変領域のFRを、類似の構造が解明されている免疫グロブリン可変領域由来のFRからモデリングした。同一のアミノ酸側鎖は元の配向に維持したが、ミスマッチの側鎖は元のBAT-1のFv領域と同じように置換した。FAB17-IAのV領域のバックボーン原子はBAT-1のV領域のモデルに使用し、409.5.3のV_H領域のFRはBAT-1のV_H領域をモデリングするために使用した(それぞれブルックヘブンPDBコード1for及び1iai)。これらの配列はどちらもネズミBAT-1抗体の可変領域配列及びそのヒト化変異体に対して良好なマッチを示した。mBAT-1及びヒト化配列の同一性は、V領域配列で73%~92%、V_H領域配列で65%~79%の範囲であった。モデリングする配列へのマッチが乏しいFR構造を使用するとCDR

ループ構造の位置及び配向に顕著且つ有害に影響が与えられたので、A b Mを既知の構造で試験することにより、F Rバックボーンの相同性がどのモデルの品質にも重要な要素であることが示された。

【0190】

L1ループ、ネズミB A T - 1のV_H領域のループコンホメーション及びヒト化B A T R_B配列のバックボーン構造(図5)を、A b Mが使用する標準クラスからとった。これらの標準クラスはコーチアと共同研究者が記載したものに基いているが、元の論文(C h o t h i a 他、1987、1989、1992、同上; T r a m o n t a n o 他、同上)が公開された後に利用可能になった構造も考慮に入れるように改変されている。既知のループ構造におけるA b M予測の性能の試験により、このように作製されたC D Rループは通常非常に正確に、即ち1 ~ 1.5 のR M S 偏差内までにモデリングされることが示された。V_H領域配列B A T R_Aでは、位置71でP h eをT y rで置換すること(F R 3内)は、これがもはやネズミのV_H領域及びヒト化B A T R_BのV_H領域で見られる標準クラス(クラス1)に当てはまらないことを意味する。T y r 71はL1ループのコンホメーションに重要な役割を果たしていたが、モデリングした構造の解析により、この残基の主な特徴はT y rの芳香環に対するL1ループのパッキングであったことが示唆された。したがって、P h eもこの機能を実行できると信じる理由があった。さらに、モデルからはT y r 71のヒドロキシル基との強い相互作用があるように見えなかった。したがって、T y rをP h eで置換することはL1ループの実際のコンホメーションに影響を与えなかった可能性が高い。

【0191】

C D RであるL2、L3、H1及びH2のバックボーン構造には、全てのモデルのコンホメーションをA b Mに定義される標準クラスから改変せずにとった。

【0192】

B A T - 1のV_H領域内のH3ループは8残基超であり、H3ループ構造を予想するために2つの方法を使用した。いずれの方法でもバックボーンコンホメーションのデータベース検索を使用した。これに加えて、モデルの中心の5個の残基のコンホメーションをC O N G E N検索(B r u c c o l e r i、同上)を用いてより徹底的に検索した。これの計算にはより長い時間がかかったが、データベース検索から同定されたものと非常に類似したコンホメーションがしっかりと生じた。

【0193】

モデルの明らかな立体衝突を調整した後に、最後にこれを、望ましくない原子の接触を軽減すること並びにファンデルワールス及び静電的相互作用を最適化することのいずれのために、M A C R O M O D E Lで実施したようにエネルギー最小化に供した。

【実施例6】

【0194】

ヒト化B A T - 1軽鎖変異体の構築

すべての実施例で、厳密なP C Rクローニング及び配列決定プロトコルに従った。これは、ヒト化変型にエラーが導入される可能性を最小限にするために行った。ヒト化B A T - 1の軽鎖可変領域遺伝子(即ちB A T R_A、B A T R_B及びB A T R_D)の構築により約425bpの産物が生じ、その後これをp C R 2.1(商標)内にサブクローニングした。P C R反応は表9及び10に記載のプライマーを使用して行った。

【0195】

【表 9】

表9

プライマー 名	配列 番号	BAT-1抗体κ軽鎖可変領域遺伝子の様々なヒト化変型の構築に 使用したオリゴヌクレオチド (5'→3')
BATR _κ .1	30	CCCAAGCTTGCCGCCACCATG GACATGAGGGTCCCCGCTCAG C
BATR _κ .2	31	TCCTGGGGCTCCTGCTGCTCT GGCTCCCAGGTGCCAAATG
BATR _κ .3	32	TGAAATTGTGTTGACGCAGTC TCCATCCTCCCTGTCTGCA
BATR _κ .4	33	TCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCAGTGCCAGGT
BATR _κ .5	34	CAAGTGTAAGTTACATGCACT GGTATCAGCAGAAACCAGG
BATR _κ .6	35	GAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATAGGACATCCAACCTG
BATR _κ .7	36	GCTTCTGGGGTCCCATCTAGA TTCAGCGGCAGTGGATCTG
BATR _κ .8	37	GGACAGATTTCACTCTCACCA TCAACAGCCTGCAGCCTGA
BATR _κ .9	38	AGATTTTGCAACTTACTATTG CCAGCAAAGGAGTAGTTTC
BATR _κ .10	39	CCACTCACGTTCTGGCGGAGGG ACCAAGCTGGAGATCAAACGT GAGTGGATCCGCG
BATR _κ .11	40	GAGCAGCAGGAGCCCCAGGAG CTGAGCGGGGACCCTCATG
BATR _κ .12	41	ACTGCGTCAACACAATTTAC ATTTGGCACCTGGGAGCCA
BATR _κ .13	42	GTGACTCTGTCTCCTACAGAT GCAGACAGGGAGGATGGAG
BATR _κ .14	43	GTGCATGTAACCTTACACTTGACCTGGCACTGCAAGTGATG
BATR _κ .15	44	TCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGCTGATACCA
BATR _κ .16	45	CTAGATGGGACCCCAGAAGCCAGGTTGGATGTCCTATAGA
BATR _κ .17	46	GGTGAGAGTGAAATCTGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAT
BATR _κ .18	47	AATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGTTGAT
BATR _κ .19	48	CCTCCGCCGAACGTGAGTGGGAACTACTCCTTTGCTGGC
BATR _κ .20	49	CGCGGATCCACTCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC
BATR _κ .5B	50	CAACTGTAAGTTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAACCAGG
BATR _κ .6B	51	GAAAGCCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG
BATR _κ .8B	52	GGACAGATTACACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGA
BATR _κ .15B	53	TCCAGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGCTGGAACCA
BATR _κ .17B	54	GGTGAGAGTGTAATCTGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAC
BATR _κ .17D	55	GGTGAGACAGTAAGATGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAC
BATR _κ .8D	56	GGACATCTTACTGTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGA

10

20

30

【 0 1 9 6 】

【表 10】

表10

ヒト化 BAT-1 変異体	各変異体のk軽鎖の構築に使用したオリゴヌクレオチドプライマー ¹ の 組合せ ²				
BATR_{κA}	BATR _{κ.1}	BATR _{κ.2}	BATR _{κ.3}	BATR _{κ.4}	BATR _{κ.5}
	BATR _{κ.6}	BATR _{κ.7}	BATR _{κ.8}	BATR _{κ.9}	BATR _{κ.10}
	BATR _{κ.11}	BATR _{κ.12}	BATR _{κ.13}	BATR _{κ.14}	BATR _{κ.15}
	BATR _{κ.16}	BATR _{κ.17}	BATR _{κ.18}	BATR _{κ.19}	BATR _{κ.20}
BATR_{κB}	BATR _{κ.1}	BATR _{κ.2}	BATR _{κ.3}	BATR _{κ.4}	BATR _{κ.5B}
	BATR _{κ.6B}	BATR _{κ.7}	BATR _{κ.8B}	BATR _{κ.9}	BATR _{κ.10}
	BATR _{κ.11}	BATR _{κ.12}	BATR _{κ.13}	BATR _{κ.14}	BATR _{κ.15B}
	BATR _{κ.16}	BATR _{κ.17B}	BATR _{κ.18}	BATR _{κ.19}	BATR _{κ.20}
BATR_{κD}	BATR _{κ.1}	BATR _{κ.2}	BATR _{κ.3}	BATR _{κ.4}	BATR _{κ.5B}
	BATR _{κ.6B}	BATR _{κ.7}	BATR _{κ.8D}	BATR _{κ.9}	BATR _{κ.10}
	BATR _{κ.11}	BATR _{κ.12}	BATR _{κ.13}	BATR _{κ.14}	BATR _{κ.15B}
	BATR _{κ.16}	BATR _{κ.17D}	BATR _{κ.18}	BATR _{κ.19}	BATR _{κ.20}

10

【0197】

20

¹ オリゴヌクレオチド配列は表9に示す。

² オリゴヌクレオチドプライマーBAT_κ 1及びBAT_κ 20も外部増幅プライマーとして使用した。

【0198】

推定陽性形質転換体をPCRスクリーニングアッセイで同定し、制限消化を行い、その後、ds-DNA配列決定を行った。その後、ヒト化V 遺伝子(図7~9;配列番号15、16及び18)を発現プラスミド内にサブクローニングした。

【0199】

軽鎖pKN110構築体はアンピシリン及びネオマイシン耐性遺伝子を含んでいた。BAT-1のヒト化V 遺伝子変異体(即ちBAT_{κA}、BAT_{κB}及びBAT_{κD})をHCMV最初期プロモーターとゲノムヒト 定常領域との間に挿入し、それぞれ発現ベクターpKN110-BAT_{κA}、pKN110-BAT_{κB}及びpKN110-BAT_{κD}を生じさせた(代表的なpKN110-BAT_{κD}ベクターには図10を参照されたい)。

30

【0200】

発現ベクター内に挿入したBAT-1軽鎖発現カセットは、マウス免疫グロブリンシグナルペプチド配列をコードしているDNA断片、コザック配列及びBAT-1のヒト化V 遺伝子変異体の両側に付加したシグナル配列イントロンを含んでいた(図11)。このカセットは、HCMV最初期プロモーターとゲノムヒト 定常領域との間に挿入した。完全な軽鎖発現ベクターは、BGHポリA転写ターミネーター及びNeo/G418選択マーカーも含んでいた。正しい挿入物の存在を確認するために、全ての構築体で制限消化を行い、ds-DNA配列決定を行った。

40

【実施例7】

【0201】

ヒト化BAT-1重鎖変異体の構築

再構成ヒトBAT-1重鎖可変領域遺伝子の様々な変型(即ちBAT_{κH A}、BAT_{κH B}、BAT_{κH C})の構築により約450bpの産物が生じ、その後これをPCR2.1(商標)内にサブクローニングした。PCR反応は表11及び12に記載のプライマーを使用して行った。

【0202】

50

ここでも推定陽性形質転換体をPCRスクリーニングで同定し、その後ds-DNA配列決定を行った。その後、ヒト化V_H遺伝子(配列番号20~22)を発現ベクター内にサブクロニングした。

【0203】

重鎖pG1D110構築体はアンピシリン耐性遺伝子及びハムスターdhfrを選択マーカーとして含んでいた。BAT-1のヒト化V_H遺伝子変異体をHCMV最初期プロモーターとゲノムヒトIgG1定常領域との間に挿入し、発現ベクターpG1D110-BATRH_A、pG1D110-BATRH_B、pG1D110-BATRH_Cを生じさせた(代表的なpG1D110-BAT-1-RH_Cベクターには図15を参照されたい)。

10

【0204】

発現ベクター内に挿入したBAT-1重鎖発現カセットは、マウス免疫グロブリンシグナルペプチド配列をコードしているDNA断片、コザック配列及びBAT-1のヒト化V_H遺伝子変異体の両側に付加したシグナル配列イントロンを含んでいた(図16)。このカセットは、HCMV最初期プロモーターとゲノムヒトIgG1定常領域との間に挿入した。完全な軽鎖発現ベクターは、BGHポリA転写ターミネーター及びdhfr選択マーカーも含んでいた。

【0205】

正しい挿入物が存在することを確認するために、生じた発現ベクターの制限消化を行った。

20

【0206】

【表 1 1】

表 11

プライマー名	配列番号	様々なヒト化 BAT-1 抗体重鎖可変領域遺伝子の構築に使用した オソゴヌクレオチド (5' → 3')
BATRH.1	57	CCCAAGCTTGCCGCCACCATG GACTGGACCTGGAGGATCC
BATRH.2	58	TCTTCTTGGTGGCAGCAGCAA CAGGTGCCCACT
BATRH.3	59	CCCAGGTGCAGCTGGTGCAAT CTGGGTCTGAGCTTAAGAA
BATRH.4	60	GCCTGGGGCCTCAGTGAAGAT CTCCTGCAAGGCTTCTGGA
BATRB.5	61	TATAGCTTCAGTAACTATGGA ATGAACTGGGTGCGACAGG
BATRH.6	62	CCCCTGGACAAGGGCTTCAGT GGATGGGATGGATAAACAC
BATRH.7	63	CGACAGTGGAGAGTCAACATA TGCTGAAGAGTTCAAGGGA
BATRH.8	64	CGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAGCACGGCAT
BATRH.9	65	ATCTGCAGATCACCAGCCTCA CGGCTGAGGACACTGGCAT
BATRH.10	66	GTATTTCTGTGCGAAAGTCGG CTACGATGCTTTGG
BATRH.11	67	ACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAGGTG AGTGGATCCGCG
BATRH.12	68	TGCTGCCACCAAGAAGAGGAT CCTTCCAGGTGGAGTCCATGG TGG
BATRH.13	69	TTGCACCAGCTGCACCTGGGA GTGGGCACCTGTTGC
BATRH.14	70	T CTTCACTGAGGCCCCAGGCT TCTTAAGCTCAGACCCAGA
BATRH.15	71	CCATAGTTACTGAAGCTATAT CCAGAAGCTTGCAGGAGA
BATRH.16	72	CTGAAGCCCTTGTCCAGGGGC CTGTCGCACCCAGTTCATT
BATRH.17	73	ATGTTGACTCTCCACTGTCGG TGTTTATCCATCCCATCCA
BATRH.18	74	TCCAAGGAGAAGACAAACCGT CCCTTGAACCTTTCAGCAT
BATRH.19	75	GAGGCTGGTGATCTGCAGATA TGCCGTGCTGACAGAGGTG
BATRH.20	76	CGACTTTCGCACAGAAATACA TGCCAGTGTCTCAGCCGT
BATRH.21	77	TTCCCTGGCCCCAGTAGTCCA AAGCATCGTAGC
BATRH.22	78	CGCGGATCCACTCACCTGAGG AGACGGTGACCAGGG
BATRH.5B	79	TATACTTTCACAAACTATGGA ATGAACTGGGTGCGACAGG
BATRH.15B	80	CCATAGTTTGTGAAAGTATAT CCAGAAGCCTTGCAGGAGA
BATRH.8C	81	CGGTTTGTCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAACACGGCAT
BATRH.10C	82	GTATTTCTGTGTGAGAGTCGG CTACGATGCTTTGG
BATRH.20C	83	CGACTCTCACACAGAAATACATG CCAGTGTCTCAGCCGT
BATRH.9C	84	ATCTGCAGATCACCAGCC TC AACGCTGAGGACACTGGCAT
BATRH.19C	85	GAGGCTGGTGATCTGCAGAT ATGCCGTGTTGACAGAGGTG
BATRH.5C	86	TATACTTTCACAAACTATGG AATGAACTGGGTGAAGCAGG

10

20

30

【表 1 2】

表12

ヒト化 BAT-1 変異体	各変異体 ² の重鎖の構築に使用したオリゴヌクレオチドプライマー ¹ の 組合せ ²				
BATRH_A	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
	BATRH.21	BATRH.22			
BATRH_B	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5B
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15B
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
	BATRH.21	BATRH.22			
BATRH_C	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5C
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8C	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15C
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
	BATRH.21	BATRH.22			

10

20

【0208】

¹ オリゴヌクレオチド配列は表11に示す。

² オリゴヌクレオチドプライマーBATRH.1及びBATRH.22も外部増幅プライマーとして使用した。

【実施例8】

【0209】

単一発現ベクター内でのBAT-1RH_C/R_D1完全抗体の構築

BAT-11抗体の実現可能な発現レベルを最大にするために、BAT-11単一ベクター構築体を作製する前にpG1D110・BAT-1・RH_C構築体からイントロンを除去することを決定した(実施例7に記載、図15参照)。この手順は以下のように行った。

30

【0210】

pG1D200とは、別の1免疫グロブリン重鎖哺乳動物発現ベクター(AERES Biomedical; 図17)である。このベクターは、pG1D110ベクターのV_H:C_H1イントロン無しの変型である(即ちV_H:C_H接合点で71bpのイントロンを有さない)。

【0211】

pG1D110・BAT-1・RH_C構築体を構築体へと変換するために、BstEII断片(219bp)をpG1D200ベクターから切除し、Qiagenゲル抽出/精製キットを用いてゲル精製を行った。この断片はイントロン無しのV_H:C_H接合点を含んでいた。

40

【0212】

pG1D110・BAT-1・RH_C構築体(図15)もBstEIIで制限消化を行い、イントロン有りのV_H:C_H接合点を含む290bpの断片が放出された。Qiagenゲル抽出/精製キットを用いて残りのベクター断片(~7207bp)のゲル精製を行った。

【0213】

その後、pG1D200ベクターの消化からのイントロン無しのBstEII断片(219bp)を~7207bpのBstEIIで消化したpG1D110・BAT-1・RH_Cベクター内にライゲーションした。2μlのライゲーションしたDNAを、製造元の

50

指示に従ってDH5 細胞 (S t r a t a g e n e) に形質転換させた。10個のコロニーからプラスミドDNAを調製し、DNA配列解析によってそれぞれのプラスミドDNAを正しいB s t E I I断片の存在について解析した。

【0214】

完全なクローンを同定した後、新しいイントロン無しの構築体 (p G 1 D 2 1 0 . B A T - 1 . R H _C) 及び軽鎖構築体 p K N 1 1 0 . B A T - 1 . R _D (図10参照)を用いてp G 1 K D 2 1 0 . B A T . R H _C / R _D 単一発現ベクター (配列番号93)を構築した。

【0215】

配列番号93内のこのp G 1 K D 2 1 0 . B A T - 1 . R H _C / R _D 単一発現ベクターの構成要素は以下のように局在している：

1 .ヌクレオチド範囲：1 ~ 2 5 0 2 - p B R 3 2 2 (A m p 耐性遺伝子及びC o l E 1複製起点並びにS V 4 0複製起点及び不能S V 4 0初期プロモーターを含む、p B R 3 2 2に基づいた配列)

2 .ヌクレオチド範囲：2 0 6 ~ 1 0 6 7 - A m p (アンピシリン耐性遺伝子)

3 .位置：1 8 2 4 - C o l E 1

4 .ヌクレオチド範囲：2 5 0 2 ~ 3 2 2 7 - D H F R (ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子)

5 .ヌクレオチド範囲：3 2 3 3 ~ 4 0 7 4 - S V 4 0ポリA (S V 4 0ポリA配列など)

6 .ヌクレオチド範囲：4 1 0 9 ~ 5 6 4 9 - H C M V i (H C M V iプロモーター)

7 .ヌクレオチド範囲：5 6 6 2 ~ 6 0 6 7 - B A T r K d

再構成B A T 軽鎖可変領域。

8 .ヌクレオチド範囲：6 0 7 3 ~ 6 7 2 0 - H u K (ヒト 定常領域 (K m (3)) 遺伝子のc DNAコピー)

9 .ヌクレオチド範囲：6 7 2 6 ~ 6 9 4 3 - s p a C 2人工s p a C 2終結配列

10 .ヌクレオチド範囲：6 9 4 9 ~ 8 4 8 9 - H C M V i (H C M V iプロモーター)

11 . 12 .ヌクレオチド範囲：8 5 0 2 ~ 8 9 2 3 - B A T r H c

再構成B A T 重鎖可変領域

13 .ヌクレオチド範囲：8 9 2 4 ~ 1 0 2 9 7 - H G 1 (前に60bpのイントロンがあり、後に「アーニー」終結配列があるヒト - 1定常領域)

【0216】

H C M V iプロモーター、B A T - 1の 軽鎖可変領域遺伝子、及び 軽鎖定常領域遺伝子を含むB A T - 1の 軽鎖発現カセットを、p K N 1 1 0 . B A T - 1 . R _D 構築体から制限消化によって取り出し (E c o R I / S p e I)、次いで単一のE c o R I及びS p e I制限部位によってp G 1 D 2 1 0 . B A T - 1 . R H _C 構築体中にライゲーションした。このライゲーションにより、B A T - 1ヒト化抗体R H _C / R _Dの重鎖及び

軽鎖をどちらも含む単一発現ベクターp G 1 K D 2 1 0 . B A T - 1 . R H _C / R K _Dの構築がもたらされた (図18)。2µlのライゲーションしたDNAを、製造元の指示に従ってDH5 細胞 (S t r a t a g e n e) に形質転換させた。10個のコロニーからミニプレップDNAを調製し、制限消化解析によってそれぞれのプラスミドDNAを正しい単一発現構築体の存在について解析した。C O S細胞内でのB A T - 1 - 1抗体の一過性発現に正しい単一発現構築体の1つのクローンを選択し、これを実施例11に例示する。

【実施例9】

【0217】

単一発現ベクター内でのB A T - 1 . R H _C / R _D - 1 (1) 完全抗体の変異体の構築

B A T R H _C 重鎖可変領域をX h o 1とH i n d 1 1 1断片とを一緒にした (単一) 発現ベクターとして導入した。B A T R _D 軽鎖可変領域をX b a 1とB a m H 1断片とを一緒にした (単一) 発現ベクターに導入した。アミノ酸配列を変更せずに軽鎖遺伝子中の

10

20

30

40

50

内部 X b a 1 部位を除去した。このベクター内の B A T - 1 . R_D / B A T - 1 . R H_C 重鎖及び軽鎖可変領域の配列を確認した。このベクターはゲノムヒト I g G 1 及び 定常領域を含む。重鎖及び軽鎖遺伝子のどちらもを H C M V 最初期プロモーターの制御下に置いた。このベクターはマウス d h f r 遺伝子を選択マーカーとして含む (図 19 参照)。2つのベクター発現系と同じコザック配列、シグナルペプチド配列及びイントロンを付加した (実施例 6 及び 7 参照)。

【実施例 10】

【0218】

単一ベクター内での B A T - 1 - 4 (4) P G 4 K D 1 1 0 . B A T - 1 . R H_C / R_D の構築

10

B A T - 1 - 4 単一発現ベクター構築体の構築における第 1 のステップは、B a m H I 及び H i n d I I I 制限消化によって改変 B A T - 1 . R H_C 遺伝子を p G 1 D 1 1 0 . B A T - 1 . R H_C 構築体 (図 14) からクローニングして取り出し、やはり B a m H I 及び H i n d I I I 制限部位によってこの 430bp 断片を - 4 免疫グロブリン重鎖発現ベクター p G 4 D 1 1 0 内にライゲーションすることであった。

【0219】

2 µl のライゲーションした D N A を、製造元の指示に従って D H 5 細胞 (S t r a t a g e n e) に形質転換させた。10個のコロニーからプラスミド D N A を調製し、D N A 配列解析によってそれぞれのプラスミド D N A を正しい B A T - 1 . R H_C の B a m H I / H i n d I I I 断片の存在について解析した。

20

【0220】

完全なクローンが示された後、新しい - 4 構築体 (p G 4 D 1 1 0 . B A T - 1 . R H_C) 及び軽鎖構築体 p K N 1 1 0 . B A T - 1 . R_D (図 10) を使用して、以下の方法で p G 4 K D 1 1 0 . B A T - 1 . R H_C / R_D 単一発現ベクターを構築した。

【0221】

H C M V i プロモーター、B A T - 1 の 軽鎖可変領域遺伝子、及び 軽鎖定常領域遺伝子を含む B A T - 1 の 軽鎖発現カセットを、p K N 1 1 0 . B A T - 1 . R_D 構築体から制限消化によって取り出し (E c o R I / S p e I)、次いで単一の E c o R I 及び S p e I 制限部位によって p G 4 D 1 1 0 . B A T - 1 . R H_C 構築体中にライゲーションした。このライゲーションにより、B A T - 1 ヒト化抗体 R H_C / R_D 変異体の重鎖及び 軽鎖をどちらも含む単一発現ベクター構築体 p G 4 K D 1 1 0 . B A T - 1 . R H_C / R_D の構築がもたらされた。2 µl のライゲーションした D N A を、製造元の指示に従って D H 5 細胞 (S t r a t a g e n e) に形質転換させた。10個のコロニーからミニプレップ D N A を調製し、制限消化解析によってそれぞれのプラスミド D N A を正しい単一発現ベクター構築体の存在について解析した。B a m H I 及び H i n d I I I で消化した正しい単一発現ベクター構築体は 2864bp の断片を放出し、H i n d I I I 消化では 2840bp の断片が放出された。C O S 細胞内での B A T - 1 - 4 抗体の一過性発現に 1 つのコロニーを選択した。

30

【実施例 11】

【0222】

ヒト化 B A T - 1 軽鎖及び重鎖ベクターの同時トランスフェクション、並びに C O S 7 細胞内でのヒト化 B A T - 1 変異体の一過性発現

40

ヒト化 B A T - 1 の重鎖 (p G 1 D 1 1 0) 及び軽鎖 (p K N 1 1 0; 実施例 7) 発現ベクターを様々な組合せで C O S 7 細胞内に同時トランスフェクションさせ、72時間インキュベートした後、培地を回収し、細胞片を除去するために遠心し、濾過し、ヒト化抗体の産生について E L I S A によって解析した。C O S 7 細胞上清中のヒト化抗体の濃度は、試験した再構成ヒト B A T - 1 抗体構築体の組合せのそれぞれで異なった (表 13)。例えば、変型 B A T R H_B / B A T R_A が最も高い抗体レベルを発現し (4800 ng / ml)、B A T R H_B / B A T R_D の変型の発現が最も乏しかった (357 ng / ml)。

50

【実施例 12】

【0223】

COS7 細胞からのヒト化 BAT-1 変異体の精製

1 回の同時トランスフェクションあたり約 8 ml が採取され（実施例 11 参照）、200 ml 以上の COS7 上清が回収されるまで一連のトランスフェクションを行った。30 kDa の分子量カットオフの PM30 濾過膜を備えた攪拌限外濾過セルに上清を通すことによって、この上清の体積を 10 ml まで減らした。

【0224】

Immunopure（著作権）（A）IgG 精製キットは、本質的に固定したタンパク質 A のセファロースカラムの 2 ml カラムからなる。5 ml の溶出緩衝液を用いて抗体をカラムから溶出させ、その溶出液を 1 ml の画分で回収した。その後、ELISA 法を用いてそれぞれの画分中のヒト化 BAT-1 抗体の濃度をアッセイした。表 13 は、回収されたタンパク質 A で精製した抗体構築体の最終濃度を示す。平均すると、精製ステップにより抗体濃度が約 150 倍上昇した。

【0225】

【表 13】

表 13

抗体鎖		COS7 細胞上清中のキメラ及び hBAT-1 抗体濃度 (一過性発現の実験)	
重鎖	K 軽鎖	生の上清 ($\mu\text{g/ml}$)	タンパク質 A の精製後 ($\mu\text{g/ml}$)
BATCH	BATR _K	0.358	50
BATR _{H_A}	BATR _{K_A}	2.350	110
BATR _{H_B}	BATR _{K_A}	4.800	211
BATR _{H_B}	BATR _{K_B}	0.757	149
BATR _{H_C}	BATR _{K_B}	1.250	137
BATR _{H_B}	BATR _{K_D}	0.357	112
BATR _{H_C}	BATR _{K_D}	0.718	122

【実施例 13】

【0226】

COS7 細胞内で産生されたヒト化 BAT-1 変異体のダウディ細胞への結合の解析

ダウディ細胞の ELISA を用いると、タンパク質 A で精製したヒト化 BAT-1 抗体の様々な変型が様々な度合でダウディ細胞に結合したことが明らかであった。図 20 ~ 23 は、これらの結合実験の典型的な例を示す。組換え抗体によるダウディ細胞の結合の S 字型の用量 - 応答曲線もプロットし、これらの結合曲線の傾斜面を計算した。傾斜面データとキメラ抗体用量 - 応答曲線に対するこの用量 - 応答曲線立場との組合せにより、試験した様々なヒト化 BAT-1 抗体構築体間でダウディ細胞の結合に関して定性的な階層が示唆された（表 14）。この階層の一番上にあるのは明らかに構築体 BAT_{H_C} / BAT_{R_D}（即ち 0.8818 ± 0.1107 ）であり、これはそのキメラ BAT-1 抗体対照（即ち 0.8248 ± 0.1210 ）に非常に類似した傾斜面を示し、キメラ対照の用量 - 応答曲線に近い軌道であった。利用可能な結合データから計算すると構築体 BAT_{H_C} / BAT_{R_B}（即ち 0.6408 ± 0.1622 ）は同じキメラ BAT-1 抗体対照（即ち 0.8248 ± 0.1210 ）よりも急な傾斜面を示したが、その差は統計的に有意ではなかった。さらに、図 22 から、この構築体の用量 - 応答曲線は BAT_{H_C} / BAT_{R_D} 構築体でそれほど良好ではなく、したがって結合階層で 2 位に位置付けられたことが明らかである。

【0227】

逆に、構築体 $BATR H_A / BATR_A$ は試験した全てのヒト化 $BAT - 1$ 抗体構築体のなかで明らかに最も低い結合特徴を有しており（表 14）、結合階層で 6 位に位置付けられた。変型で計算した傾斜面（即ち 1.2730 ± 0.2688 ）は非常に類似したヒト化構築体 $BATR H_B / BATR_A$ （即ち 1.7710 ± 0.6461 ）よりも明らかに良好であったが、この差もやはり統計的に有意ではなかった。さらに、図 21 から、CDR を移植した $BATR H_A / BATR H_A$ $BAT - 1$ 抗体が、結合階層で 5 位に位置付けられたヒト化構築体 $BATR H_B / BATR_A$ よりもはるかに低いレベルでその最大結合応答に達していることが明らかである。

【0228】

構築体 $BATR H_B / BATR_B$ （図 20；4 位）及び $BATR H_B / BATR_D$ （図 23；3 位）はこれら 2 組の端値の中間レベルの結合性を示す。ここでも、これらの位置付けは主に利用可能な結合データの主観的な解釈及びこれまでの経験に基づいている。

【0229】

【表 14】

表 14

タンパク質 A で精製したヒト化に対する COS 細胞内での一過性発現後に採取したキメラ $BAT - 1$ 抗体構築体の相対的な結合親和性				
実験番号	重鎖	K 軽鎖	傾斜面 $\pm SEM^a$	傾斜面解析からの 結合階層
1	BATRH	BATR κ	0.5422 ± 0.2911	-
	BATRH _A	BATR κ_A	1.273 ± 0.2688	6
	BATRH _B	BATR κ_A	1.771 ± 0.6461	5
2	BATRH	BATR κ	0.8057 ± 0.0849	-
	BATRH _B	BATR κ_D	0.6555 ± 0.1252	3
3	BATRH	BATR κ	0.8248 ± 0.1210	-
	BATRH _C	BATR κ_B	0.6408 ± 0.1622	2
	BATRH _C	BATR κ_D	0.8818 ± 0.1107	1
4	BATRH	BATR κ	0.7090 ± 0.2768	-
	BATRH _B	BATR κ_B	0.7796 ± 0.3420	4

【0230】

^a ダウディ細胞の ELISA のデータを S 字型の用量 - 応答曲線に当てはめた後に計算した、3 つ組の ELISA の標準誤差の平均。

【実施例 14】

【0231】

COS 細胞の同時トランスフェクション又は単一トランスフェクションによる $BAT - 1 R_D / RH_C$ 変異体の一過性発現

Kettleborough の方法（Kettleborough 他、Eur. J. Immunol.、23：206、1993）に従って哺乳動物発現構築体を COS 細胞内にトランスフェクションさせた。手短に述べると、DNA（それぞれ $10 \mu g$ の軽鎖発現構築体 pKN110、 $BAT - 1. R_D$ 及び重鎖発現構築体 pG1D210、 $BAT - 1. RH_C$ 、又は $13 \mu g$ の単一ベクター構築体 pG1KD210、 $BAT - 1. RH_C / R_D$ ）を $1 ml$ の PBS あたり 10^7 個の細胞の $0.7 ml$ のアリコートに加え、Bio-Rad Gene Pulser 装置を用いて $1900 V$ 、 $25 \mu F$ の電気容量でパルスを当てた。室温で 10 分間回復させた後、電気穿孔した細胞を 10% の FCS を含む $8 ml$ の DMEM を入れたペトリ皿に移し、 5% の CO_2 、 $37^\circ C$ で 72 時間インキュベートした。 72 時間インキュベートした後、培地を回収し、細胞片を除去するために

遠心し、抗体の産生について捕捉 E L I S A によって解析した。軽鎖発現ベクター及び重鎖発現ベクターを用いた同時トランスフェクション、並びに軽鎖及び重鎖をどちらも発現している単一ベクターを用いたトランスフェクションを、3つ組で実施した。結果を表 15 に示す。この結果は、単一ベクターからの発現レベルが同時トランスフェクションで観察された発現レベルよりも ~ 6 倍高い示している。

【 0 2 3 2 】

【表 15】

表 15

形質移入 番号	形質移入した構築体	BAT-1 γ 1 抗体の一過性 COS 細胞発現レベル ($\mu\text{g/ml}$)*
1	単一ベクター	55.451
2	“	49.009
3	“	66.018
1	軽鎖及び重鎖ベクター	9.06
2	“	10.232
3	“	9.536

【 0 2 3 3 】

* p G 1 D 1 1 0 及び p K N 1 1 0 ベクターを用いた同時トランスフェクションからのヒト化 R H _C / R_D B A T - 1 変異体のトランスフェクションレベルは 0 . 7 1 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であった

【実施例 15】

【 0 2 3 4 】

単一ベクター p G 1 K D 2 1 0 . B A T - 1 . R H _C / R_D を用いた C H O d h f r - 哺乳動物細胞の安定なトランスフェクション及び安定な細胞系の産生

C H O d h f r - 細胞を、10%の F e t a l C l o n e I I 及び 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のゲンタマイシンを添加したリボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドを含む - M E M からなる非選択培地中で増殖させた。1 ml の P B S あたり 10⁷ 個の細胞の 0 . 7 ml のアリコート、13 μg の p G 1 K D 2 1 0 . B A T - 1 . R H _C / R_D を用いて、B i o - R a d G e n e P u l s e r を用いて 1900 V、25 μF の電気容量でトランスフェクションさせた。細胞を室温で 10 分間回復させた後、10 cm のペトリ皿の 8 ml の非選択培地に移し、5%の C O₂、37 °C で 48 時間インキュベートした。

【 0 2 3 5 】

トランスフェクションの 2 日後、細胞をトリプシン処理し、遠心し、150 ml の予熱した選択培地 (10%の透析した F B S 及び 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ のゲンタマイシンを添加した、10 nM、50 nM、100 nM 又は 500 nM のメトトレキセートを含む、リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドを含まない - M E M) 中に再懸濁させた後、15 個の 10 cm のペトリ皿に等分した。その後、これらを 5%の C O₂ 中、37 °C で、病巣がはっきりと見えるまで選択培地を 3 ~ 4 日毎に交換して 20 ~ 30 日間インキュベートした。最初のトランスフェクションの 2 週間後、病巣が 10 nM のプレートに発生しはじめた。8 日後、1 つの病巣が 50 nM のプレートに発生した。35 日以降は 50 nM のプレートに他の病巣は発生せず、100 nM や 500 nM のプレートには病巣が全く発生しなかった。

【 0 2 3 6 】

病巣を「拾う」ために、1 mm 四方のワットマン 1 M M 濾紙をまず 0 . 05% のトリプシン、0 . 02% の E D T A 溶液に浸した。選択培地を培養皿から丁寧に除去し、その後これを 5 ml の P B S で丁寧に洗浄した。その後、P B S を除去し、無菌鉗子を用いて、予浸した正方形の濾紙を個々の細胞の病巣上に丁寧に置いた。正方形の濾紙を病巣上

10

20

30

40

50

に 15 秒間放置した後、1 ml の適切な選択培地を含む 24 ウェルの組織培養プレートの個別のウェルに移した。

【0237】

合計 31 個の γ 1 病巣を拾い、そのうち 30 個が 10 nM の MTX のプレートからで、1 個が 50 nM のプレートからであった。これらの細胞をほぼコンフルエントになるまで選択培地中で増殖させ、個々のウェルを抗体の産生について試験した。その後、ヒト抗体を産生しているクローンを、拡大及び特異的産生の解析に選択した。特異的産生アッセイの結果を表 16 に示す。

【0238】

【表 16】

10

表 16

クローン	RH _C /RK _D BAT-1 γ 1 完全抗体の変異体の特異的 CHO 細胞産生レベル (ng/10 ⁶ 個の細胞/日)		
	アッセイ番号 1	アッセイ番号 2	アッセイ番号 3
γ 1 B9	3284.7	2921.5	1227.1
γ 1 B10	297	1288	268.3
γ 1 B13	12443	5425.2	7731.53
γ 1 B18	6.5	10.4	4.9
γ 1 B19	199.7	26.9	43
γ 1 B15	5978.6	1657.1	3015.43
γ 1 D6	2539.2	1605.5	2072.40

20

【0239】

最も良好な特異的産生レベルを示した 3 つの細胞系 (B9、B13 及び B15) を、正確な倍加時間についてさらに解析且つモニタリングした (表 17 参照)。

【0240】

【表 17】

30

表 17

細胞系	最も良好な γ 1 CHO 細胞系の 産生レベル (μ g/10 ⁶ 個の細胞/日)	最も良好な γ 1 CHO 細胞系の 倍加時間 (時間)
B9	3.5	22.5
B13	7.7	31.5
B15	3	21

【0241】

特異的産生レベル及び倍加時間に基づいて、B15 細胞系を用いて 500 μ g の量の BAT-1 γ 1 抗体の産生を始めることを決定した。

【実施例 16】

【0242】

単一トランスフェクション及び同時トランスフェクションによる、COS 細胞内の BAT-1 γ 4 RH_C/RK_D 変異体の一過性発現

Kettlborough 他の方法に従って、哺乳動物発現構築体を COS 細胞内にトランスフェクションさせた。手短に述べると、DNA (それぞれ 10 μ g の 軽鎖発現構築体 pKN110、BAT-1 γ 1 RK_D 及び重鎖発現構築体 pG4D110、BAT-1 γ 1 RH_C、又は 13 μ g のスーパーベクター構築体 pG4D110、BAT-1 γ 1 RH

40

50

c / R_D) を 1 ml の PBS あたり 10^7 個の細胞の 0.7 ml のアリコートに加え、Bio-Rad Gene Pulser 装置を用いて 1900 V、25 μ F の電気容量でパルスを与えた。室温で 10 分間回復させた後、電気穿孔した細胞を 10 % の FCS を含む 8 ml の DMEM を入れたペトリ皿に移し、5 % の CO₂、37 °C で 72 時間インキュベートした。72 時間インキュベートした後、培地を回収し、細胞片を除去するために遠心し、抗体の産生について捕捉 ELISA によって解析した。

【0243】

同時トランスフェクション及びトランスフェクションをどちらも 3 つ組で実施した。結果を表 18 に示す。この結果は、この単一ベクターからの発現レベルが同時トランスフェクションで観察された発現レベルよりも ~ 4 倍高いことを示している。

10

【0244】

【表 18】

表18

形質移入番号	形質移入した構築体	BAT-1 γ 4 抗体の一過性 COS 細胞発現レベル (ng/ml)
1	単一ベクター	519.3
2	“	522
3	“	567.2
1	軽鎖及び重鎖ベクター	65.6
2	“	152.3
3	“	129.9

20

【実施例 17】

【0245】

単一ベクター pG4KD210 . BAT - 1 . RH_C / R_D を用いた CHO dhfr - 哺乳動物細胞の安定なトランスフェクション及び安定な細胞系の産生

CHO dhfr - 細胞を、10 % の Fetal Clone II 及び 50 μ g / ml のゲンタマイシンを添加したリボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドを含む - MEM からなる非選択培地中で増殖させた。1 ml の PBS あたり 10^7 個の細胞の 0.7 ml のアリコートを、13 μ g の pG4KD110 . BAT - 1 . RH_C / R_D を用いて、Bio-Rad Gene Pulser を用いて 1900 V、25 μ F の電気容量でトランスフェクションさせた。細胞を室温で 10 分間回復させた後、10 cm のペトリ皿の 8 ml の非選択培地に移し、5 % の CO₂、37 °C で 48 時間インキュベートした。このインキュベーションの 2 日後、細胞をトリプシン処理し、遠心し、150 ml の予熱した選択培地 (10 % の透析した FBS 及び 50 μ g / ml のゲンタマイシンを添加した、10 nM、50 nM、100 nM 又は 500 nM のメトトレキサートを含む、リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドを含まない - MEM) 中に再懸濁させた後、15 個の 10 cm のペトリ皿に等分した。その後、これらを 5 % の CO₂ 中、37 °C で、病巣がはっきりと見えるまで選択培地を 3 ~ 4 日毎に交換して 20 ~ 30 日間インキュベートした。

30

40

【0246】

2 週間後、病巣が 10 nM のプレートに発生しはじめた。35 日以降は 50 nM のプレートに他の病巣は発生せず、100 nM や 500 nM のプレートには病巣が全く発生しなかった。病巣は既に記載のように拾い (実施例 15)、その後、ヒト抗体を産生しているクローンを、拡大及び特異的産生の解析に選択した。特異的産生アッセイの結果を表 19 に示す。

【0247】

【表 19】

表 19

クローン	BAT-1 γ 4 完全抗体の CHO 細胞産生レベル (ng/10 ⁶ 個の細胞 / 日)		
	アッセイ番号 1	アッセイ番号 2	アッセイ番号 3
γ 4 A9	4.8	6.08	5.7
γ 4 A13	48.5	14.8	68.8
γ 4 A12	60.7	77.0	52.7
γ 4 C4	66.0	141.7	104.4
γ 4 C8	41.7	52.4	77.6
γ 4 C9	30.7	30.6	32.2
γ 4 F2	40.7	17.9	29.30

【実施例 18】

【0248】

BATH_C 重鎖及び BAT_D 軽鎖増幅ベクターを用いた NSO 細胞の同時トランスフェクション並びに抗体産生細胞系の選択

BATH_C 重鎖カセット (図 16) 及び BAT_D 軽鎖カセット (図 11) をそれぞれ含む発現ベクターを混合し、電気穿孔によって NSO 宿主細胞系にトランスフェクションさせた。

【0249】

トランスフェクションさせた細胞を、10 個の 96 ウェルプレート中の 10 % のウシ胎児血清 (FBS) 及び 1 mg/ml の G418 (ゲンタマイシン) 培地を添加したダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) に分配した。10 ~ 14 日間後にトランスフェクションさせた細胞のコロニーが発生した後、ウェルからの調整培地の試料を、ヒト化 BAT-1 抗体についてアッセイした。産生が最も高いウェルから細胞を拾い、G418 を含む培地で拡大させた。

【0250】

予備として、また選択用のトランスフェクションさせた細胞クローンをさらに多く提供するために、1 週間後にトランスフェクションを繰り返した。10 日後、トランスフェクションさせた細胞の目に見えるコロニーが発生しており、ウェルからの調整培地を抗体の産生についてスクリーニングした。ELISA プレートにヒツジ抗ヒト抗体でコーティングした。ウェルからの培地の 25 μ l の試料を ELISA プレートに移し、PBS Tween (PEST) で 100 μ l まで希釈した。二次抗体は HRP に結合させたヒツジ抗ヒト IgG (鎖特異的) であり、色は o-フェニレンジアミン (OPD) で発色させた。陽性のウェルを顕微鏡で検査し、産生が最も高いウェルから細胞を拾って 24 ウェルプレート中の 10 % の FBS 及び 1 mg/ml の G418 を添加した 1.5 ml の DMEM に入れた。合計 15 個の産生が高いコロニーを 2 つのトランスフェクション体から拾った (表 20)。2 つの独立した細胞系から約 40 μ g/ml 以上の抗体産生レベルが得られた。

【0251】

重鎖ベクター内で dhfr 遺伝子を用いた増幅では、最初の 2 つの産生が高い細胞系を 0.02 μ M のメトトレキサートを加えた培地 (10 % の FCS 及び 1 mg/ml の G418 を含む) に移した。

【実施例 19】

【0252】

BAT-1_{RH_C} / R_D 1 遺伝子を含む単一増幅ベクターを用いた NSO 宿主細胞系のトランスフェクション及び抗体産生細胞系の選択

実施例 9 に記載の組み合わせた (単一) 抗体発現ベクターを、電気穿孔によって NSO 宿主細胞系内にトランスフェクションさせた。

【 0 2 5 3 】

トランスフェクションさせた細胞を 10 個の 96 ウェルプレート中の 10 % の FBS を含む DMEM に分配した。2 日後、0.1 μ M のメトトレキサートを含む等量の培地を加えた。培地の半分を、トランスフェクション 8 日後まで 2 日毎に同体積の 0.1 μ M の MTX 含有培地で交換した。予備として、また選択用のトランスフェクションさせた細胞クローンをさらに多く提供するために、1 週間後にトランスフェクションを繰り返した。14 ~ 21 日後、トランスフェクションさせた細胞の目に見えるコロニーが発生しており、上記実施例に記載のようにウェルからの調整培地を抗体の産生についてスクリーニングした。陽性のウェルを顕微鏡で検査し、産生が最も高いウェルから細胞を拾って 24 ウェルプレート中の 10 % の FBS 及び 0.1 μ M のメトトレキサートを添加した 1.5 ml の DMEM に入れた。合計 13 個の産生が高いコロニーを 2 つのトランスフェクション体から拾い、液体窒素中で冷凍しておいた (表 20)。6 つの独立した細胞系から 40 μ g/ml を超える抗体産生レベルが得られた。異なる選択により、単一ベクターを含む細胞系は、2 つの異なるベクター上に抗体遺伝子を含むものよりも発生するのが遅かった。

【 0 2 5 4 】

【表 20】

表 20

2つのベクターの系		単一ベクターの系	
細胞系	産生レベル (μ g/ml)	細胞系	産生レベル (μ g/ml)
31E1	43	1B7	48
33E5	15	3E3	45
33B10	40	3H5	35
34F1	8	8H7	26
35C12	12.5	9D7	41
36G4	4	24B7	26
37H5	20	26A6	24
38E8	15	26D6	33
39A3	38	26E3	43
42G7	12	27B2	23
44F4	7	27C4	45
45C2	10	23E10	45
45H12	13	29E3	22
46A10	7		
49H2	15		

【 0 2 5 5 】

BAT-1.RH_C/R_D 1 遺伝子を含む単一増幅ベクターを用いた NSO 宿主細胞系のトランスフェクション及び抗体産生細胞系の選択の後、即ちクローニングした細胞系 1B7 の、ヒト化 BAT 産生細胞の代表的な例は、ブダペスト条約の寄託形式を用いて、2003 年 5 月 9 日に寄託番号 ATCC # (PTA-5189) の下で ATCC 細胞バンクに寄託されている。

【実施例 20】

【 0 2 5 6 】

ヒト化 BAT-1.RH_C/R_D 1 変異体によるマウス BAT-1 の阻害
ヒト化 BAT-1.RH_C/R_D 1 変異体が元のネズミ BAT-1 と同じエピトープを認識できることを確認するために、BAT-1 結合性エピトープを発現するダウディ細胞への結合の競合アッセイを実施した。

【 0 2 5 7 】

ダウディ細胞を段階的に多い量のヒト化 BAT-1 又は対照としてマウス BAT-1 と

共にインキュベートした ($0 \sim 80 \mu\text{g}/\text{ml}$)。結合しなかった抗体を廃棄し、ビオチン標識したネズミ-BAT-1 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) を細胞に加え、ストレプトアビジン-FITCで染色した。図24は、ヒト化及び元のマウスのmAbのどちらでも濃度の増加に伴ってネズミBAT-1の結合が減少したことを示し、これは、予測した通りに同じエピトープを認識していることを支持している。どちらの抗体も約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の IC_{50} で類似した用量依存性を示しており、類似した抗原結合親和性が示唆される。

【実施例21】

【0258】

ネズミ腫瘍モデルにおけるヒト化BAT-1のIn vivo効果

実施例20で示したように、ヒト化BAT-1・RH_C/R_D 1mAbの形成をもたらしたCDR移植ではBAT-1抗原の認識が保たれた。この結合がネズミBAT-1の生物学的効果の特徴を伝えることができるかどうかを検査するために、ヒト化BAT-1の有効性をin vivoで研究した。これは、マウスmAbとヒトmAbとの間のアイソタイプの差に関して特に重要である。

【0259】

肺転移を誘発させるためにC57BLマウスにB16黒色腫細胞を接種した。段階的に多い量 (1 、 10 及び $20 \mu\text{g}$) のヒト化mAbを腫瘍接種後12日目に注射し、最適用量である $10 \mu\text{g}$ のネズミ-BAT-1と比較した。腫瘍接種後24日目に測定した肺重量を図25に示し、これは腫瘍の確立に対応する。処置なしのマウス及びアイソタイプがマッチした非関連のヒトIgG1で処置したマウスのどちらも、 0.9 gr の平均肺重量を有していた。ヒト化BAT-1は用量依存性の転移の増殖の障害を示し、最も高い障害が $1 \mu\text{g}$ /マウスの低用量で起こっていた。これにより腫瘍質量の67%の減少がもたらされ、最適用量のネズミBAT-1でもたらされるものに類似していた (62%)。重要なことは、この最大効果は10倍低い用量のヒト化mAbでもたらされたことで、元のネズミBAT-1 mAbと比較した場合にこの抗体の治療有効性が高いことが示唆される。

【実施例22】

【0260】

hBAT-1によるSCIDマウス中のヒト黒色腫(SK-28)の障害

マウス-BAT-1 mAbは、ヒト末梢血リンパ球(hPBL)の存在下でヒト-腫瘍転移の形成を障害することが示されている。ヒト癌の障害におけるヒト化BAT-1・RH_C/R_D 1mAbの有効性を推定するために、ヒト化抗体を腫瘍及びヒト由来のリンパ球のどちらもを組み合わせたモデルで調査した。免疫能力を修復するために重症複合免疫不全マウス(SCID)にhPBLを移植した。マウスにヒト黒色腫細胞(SK-28)を接種し、腫瘍接種後11日目に単一のi.v.用量として投与した段階的に多い濃度のヒト化抗体で処置した。図26は、23日目に測定した、観察された転移の数に関連する肺重量を示す。どちらの濃度のヒト化抗体もhPBLの存在下で腫瘍の障害を誘発した。上述したマウス腫瘍モデルで観察されたように、ヒト化抗体は、マウスBAT-1に比べて腫瘍増殖をin vivoでより効率的に障害することができた。このヒト化抗体の $1 \mu\text{g}$ の単一用量で腫瘍増殖が68%障害され、 $10 \mu\text{g}$ のマウスBAT-1抗体よりも高い有効性が示された (30%)。

【実施例23】

【0261】

ヌードマウスにおけるhBAT-1モノクローナル抗体によるヒト結腸直腸癌の肝転移の免疫療法

LIM6及びHM7は、その高いムチン合成及び転移の潜在性により選択された、ヒトCRC細胞系LS174Tの2つのサブクローンである。腫瘍細胞を麻酔したヌードマウスの露出した脾臓に注射した。1分後、脾臓を取り出して切除痕を閉じた。12日後に低用量のネズミ及びヒト化BAT-1抗体を投与し、腫瘍接種後35日目にマウスを屠殺した。肝臓を秤量し、転移結節数を数え、肝臓組織を組織学及び免疫組織化学的な研究用に

10

20

30

40

50

処理した。

【0262】

BAT-1、ネズミ及びヒト化抗体を用いた処置は、ネズミモデルにおいて肝臓転移の確立の阻害に有効であることが判明した。マウスBAT-1抗体による処置は、LIM-6異種移植片の発生を予防した。BAT-1で処置したマウス及び対照の異種移植片の平均重量はそれぞれ $0.14 \pm 0.17 \text{ gr}$ 及び $0.98 \pm 1.12 \text{ gr}$ であった($P = 0.004$)。ヌードマウスに注射したHM7細胞は肝臓に多数の大きな転移性病変をもたらし、これはネズミBAT-1及びヒト化BAT-1の単一投与によって予防された(図27)。転移結節数の主要な(40%を超える)減少、即ち対照マウスで 134.5 ± 34 からネズミBAT-1ヒト化BAT-1で処置したマウスでそれぞれ 8.36 ± 3 及び 4.88 ± 2 の減少が観察された。BAT-1を用いた処置により腫瘍の端部にリンパ球が蓄積することが予防された。転移結節周辺におけるリンパ球の浸潤の役割は癌の結果に関連しているかもしれない、BAT-1治療の機構を示唆し得る。

【実施例24】

【0263】

hBATの、CD4及びCD8との共局在

マウスBAT-1はCD4+及びCD8+サブセットのどちらも認識し、ヒトリンパ球に結合することが示されている。ヒト化BATRH_C/BATRD₁mAb(hBAT)の結合特異性を確立するために、本明細書中で以下に記載するようにヒト末梢血リンパ球(PBL)を正常ドナーの血液から単離し、既知のリンパ球マーカーを用いてhBATの共局在について解析した。

【0264】

末梢血単核細胞(PBMC)をフィコールによって単離し、接着細胞を除去するために組織培養プレート中でインキュベートした。単離したPBLをサイズ及び顆粒度に応じてリンパ球に、またヨウ化プロピジウム(PI)に応じて生細胞にゲートをかけた。結合は4、1時間で行い、リンパ球にゲートをかけたフローサイトメトリーによって決定した。

【0265】

検査した全ての試料で、PBLの少なくとも20%がhBATへの結合を示した。図28は、単離したPBLの50%がhBATに陽性であった選ばれたドナーのリンパ球への結合例を示し、これにはCD4+細胞(25%)及びCD8+細胞(15%)がどちらも含まれる。これらの部分集団内では、CD4+及びCD8+細胞のほとんどがhBATmAbに結合した(それぞれ58%及び71%)。

【実施例25】

【0266】

hBATのBリンパ球への結合

ヒト化BATRH_C/BATRD₁mAb(hBAT)をヒトBリンパ腫細胞系であるダウディ細胞の膜に対して産生させた。上述のように、正常なドナー由来のPBLをフィコールによって、次いで組織培養プレートへの接着によって単離した。非接着細胞を、CD19及びCD20を含めたB細胞マーカーも用いてhBATの共局在について検査した。結合は4、1時間で行い、リンパ球にゲートをかけたフローサイトメトリーによって決定した。図29は、代表的な正常ドナー細胞の結合の評価を示す。

【0267】

試料中のリンパ球の25~29%がヒト化BATmAbに陽性であった。これらの細胞にはB細胞のほとんど(70~75%)が含まれていたことが両方の独立したマーカーによって実証された。CD20+の70%がヒト化BATmAbに陽性であり(R1にゲートをかけ、PIに陰性;図29A)、CD19+の75%がヒト化BATmAbに陽性であった(R1にゲートをかけ、PIに陰性)。これらの結果は、細胞表面上のBAT結合部分が末梢B細胞に一般的である可能性を示唆している。

【実施例26】

【 0 2 6 8 】

細胞を活性化させると h B A T の C D 4 + T 細胞への結合が増加する

マウス B A T 抗体の結合は、以前はリンパ球の活性化に関連付けられていた。この結合活性をヒト m A b についてさらに研究した。ヒト B A T m A B の活性化させたヒト C D 4 + T 細胞に対する結合レベルを検査した。陰性選択によって細胞を正常なドナーから単離し、抗 C D 3 及び抗 C D 2 8 に結合させたビーズで刺激した (5 μ l / m l)。T 細胞受容体及び同時刺激性分子によってポリクローナル活性化を及ぼすためにこの処置を選択した。

【 0 2 6 9 】

細胞を、活性化後 0、2 及び 5 日目におけるヒト化 B A T R H_c / B A T R_D 1 m A b (h B A T) と抗 C D 4 との結合 (4、1 時間) について検査した (図 3 0 A、B 及び D)。解析は P I 染色に陰性の細胞を用いたフローサイトメトリーによって行った。象限はアイソタイプ対照によって決定した。

【 0 2 7 0 】

ヒト化 B A T R H_c / B A T R_D 1 m A b の C D 4 + 細胞への結合は、活性化後に劇的に増加した (図 3 0)。不活性細胞は、0 日目 (図 3 0 A) 及び 5 日目 (図 3 0 C) に 1 7 ~ 2 0 % の h B A T に対する陽性結合を示したが、C D 4 + 細胞の 5 2 % 及び 7 7 % が活性化のそれぞれ 2 日目 (図 3 0 B) 及び 5 日目 (図 3 0 D) に h B A T に結合した。複数の試料で同様の結果が得られ、これは C D 8 + 細胞でも実証された。これは、T 細胞に対する h B A T の結合が T C R 活性化を活性化すると増加することを実証している。

【 0 2 7 1 】

この活性化の用量依存性は、h B A T と C D 6 9 との共局在によって実証された。T 細胞の活性化は、様々な分子の細胞表面での発現によって特徴付けられており、その一部は活性化過程に関与していることが示されている。h B A T の同時発現について、初期及び後期活性化分子をどちらも含めた様々なマーカーを用いて調査した。初期活性化マーカーである C D 6 9 は、活性化されると T 細胞により上方制御される。活性化の 4 日後、細胞を h B A T と抗 C D 6 9 との結合 (4、1 時間) について検査した。解析は、P I 染色に陰性の細胞を用いたフローサイトメトリーによって行った。象限はアイソタイプ対照によって決定した。

【 0 2 7 2 】

正常なドナー由来の C D 4 + T 細胞の用量依存性の活性化を図 3 1 に示す。強い活性化の際 (5 μ l / m l の抗 C D 3 及び抗 C D 2 8 に結合させたビーズ ; 図 3 1 B)、h B A T に結合する能力を有する細胞のほとんどが (9 3 %) 活性細胞となり、C D 6 9 発現によって同定された。活性化時間を増加すると、活性化の 1 日目から始まる h B A T への結合の増加も生じた。活性化の時間依存性も実証することができ、活性化の 1 日目に始まる h B A T の結合の増加がもたらされた。興味深いことに、C D 4 + 及び C D 8 + 細胞のいずれにも対する h B A T の結合は C D 6 9 の低下後も高いまま維持され (5 日目)、これは、結合とリンパ球の活性化の複数段階との関連を示唆している。C D 6 9 + 細胞に対する h B A T の結合は、h B A T 結合性タンパク質の発現が初期活性化に関連していることを示唆している。

【 実施例 2 7 】

【 0 2 7 3 】

h B A T の、C D 2 5 及び C D 4 0 - リガンドを発現している活性 T 細胞への結合

I L 2 の高親和性受容体である C D 2 5 は T 細胞の拡大に重要であり、通常活性細胞の表面上で増殖される。時間的にはこれは C D 6 9 の出現に続き、その発現は C D 6 9 の下方制御の後数日間に及ぶ。

【 0 2 7 4 】

C D 4 + T 細胞は陰性選択によって正常なドナーから単離し、抗 C D 3 及び抗 C D 2 8 に結合させたビーズを用いて数日間刺激した (5 μ l / m l)。細胞を、活性化の 0 日目

(図32A)、1日目(図32B)、及び5日目(図32D)に、対照(活性化なしの0日目、図32A及び5日目、図32C)に対して、hBAT及び抗CD25の結合(4、1時間)について検査した。解析はPI染色に陰性の細胞を用いたフローサイトメトリーによって行った。象限はアイソタイプ対照によって決定した。

【0275】

CD4+及びCD8+T細胞のいずれもが抗CD3及び抗CD28刺激の際に、刺激の1日目から始まってCD25の発現の時間依存性の増加を示した。これらの活性細胞でhBATはCD25と共局在していた(図32)。

【0276】

CD25の発現は、活性化後1日目に細胞の55%(図32B)から5日目に93%(図32D)まで増加した。どちらの時点でも、hBAT結合細胞のほとんどがCD25+であった(それぞれ85%及び98%)。

【0277】

活性化マーカーとの関連性を、後期活性化マーカーのCD40-リガンドまで拡張した(図33)。hBATの結合は、CD4+(図33)及びCD8+T細胞内で時間依存的な様式でCD40-リガンドの発現に肯定的に関連していた。これらの結果は、T細胞の活性化により、様々な活性化段階に関連する様式でhBAT結合タンパク質の発現が誘発されることを示唆する結果となっている。

【実施例28】

【0278】

hBATが活性CD4+細胞の生存率を増加させる

活性T細胞をhBATでさらに刺激することができるかどうかを検査するために、ヒトCD4+細胞を陰性選択によって正常なドナーから単離し、最適以下の濃度(0.25 µl/ml)の抗CD3/CD28ビーズで活性化した(図34)。活性化の2日後にhBAT(0.5 µg/ml)を加え、生細胞数を決定することによってその効果を評価した。結果により、hBATが2つの別個のドナー由来の生CD4+細胞数の有意な増加を誘発させたことが示された(図34A及びB)。対照の非刺激細胞は単離の8日以内に死滅したが、活性細胞はリンパ球に典型的な様式で拡大した、即ち細胞増殖から始まり、次いで安定した細胞数の段階、次いで細胞死が優勢になる段階があった。hBATを加えることによりCD4+細胞の拡大が増強され、mAbが存在しない細胞に対して細胞数が1.5倍増加した。

【0279】

BAT抗体の*in vivo*での有効性が腫瘍の存在下で増大することと本明細書中の結果とがあいまって、増大した有効性は活性BAT標的細胞の存在に依存し得ることが示唆される。腫瘍増殖の阻害が不十分であるにもかかわらず腫瘍抗原に向けられたリンパ球が癌患者で観察されており、これはBAT活性の標的細胞として役割を果たし得る。したがって、結果を考慮すると、細胞増殖の刺激及び/又は細胞死の阻害によってhBATがCD4+細胞を活性化させるといえるかもしれない。

【実施例29】

【0280】

hBATのダウディ及びジャーカット細胞系への結合

マウスBAT-1をダウディB細胞系の膜に対して産生させ、これはヒトT細胞に結合することが示されている。このヒト化抗体の特異性を確認するために、hBATを、骨髓由来の2つのヒト細胞系、即ちヒトB細胞リンパ腫系であるダウディ細胞及びヒトT細胞白血病系であるジャーカット細胞への結合について検査した。FITCに結合させたhBATを150 µg/mlの濃度のダウディ及びジャーカット細胞と共にインキュベートした(4で1時間)。結合はフローサイトメトリーによって決定した。

【0281】

ダウディ(図35A)及びジャーカット(図35B)のどちらの細胞系もヒト化抗体に結合した。さらに、どちらの系でも培養中のほとんどの細胞が抗体を結合する能力を有し

10

20

30

40

50

ていた。アイソタイプがマッチしたヒト - I g G 1 が陰性対照として役割を果たし (図 3 5 ; アイソタイプ対照) 、読取閾値が設定された。どちらの細胞系も同様の抗体染色の強度を示し、これにより、これらが同様の数の h B A T 結合分子を発現することが示唆された。

【実施例 3 0】

【 0 2 8 2】

h B A T の癌患者の P B L への結合

h B A T が正常なドナー由来のヒト T 細胞に結合する能力を有するという観察の後、癌患者から採取したリンパ球に結合するその能力を比較した。P B L をフィコールによって、次いで組織培養プレートへの接着によって前立腺癌患者の血液から単離した。非接着細胞を、h B A T 及びリンパ球マーカーの結合について検査した。結合は 4 、 1 時間で行い、リンパ球にゲートをかけたフローサイトメトリーによって決定した。象限の決定にはアイソタイプ対照を使用した。これらの患者は以前に、しばしばリンパ球の存在及び表現型に影響を与える治療を受けている。これらの細胞に結合する h B A T はその活性に必須であり、図 3 6 に示すように、正常なドナーのリンパ球への結合に類似している。全リンパ球数は低いが、h B A T はそれでも C D 4 + 細胞の 3 9 % 、 C D 8 + 細胞の 6 0 % 及び B 細胞の 6 8 % を含めて検査したリンパ球部分集団の大部分に結合することができた。

【実施例 3 1】

【 0 2 8 3】

h B A T のヒト、霊長類及びネズミ組織との交差反応性

本研究の目的は、h B A T - 1 モノクローナル抗体の様々な正常ヒト組織との交差反応性を検査することであった。本研究は、様々なヒト組織に対するモノクローナル抗体の免疫組織化学試験を含んでいた。カニクイザル及び C D - 1 マウス由来の組織中での *i n v i t r o* 交差反応性の比較も行った。

【 0 2 8 4】

(i) 組織供給源

本研究で使用した組織は、抗体結合に影響を与えるドナー特異的因子を最小限にするために、それぞれ 3 人の血縁関係のないドナーから得た。ヒト組織は道徳的な出所から得た。本研究で使用した霊長類及びネズミの組織はそれぞれの種で 2 匹の動物から、倫理的な供給元から得た。ネズミ及び霊長類は前臨床の毒性研究で評価し得る潜在的な試験システムである。選択した組織は F D A のヒトで使用するためのモノクローナル抗体製品の製造及び試験における検討材料 (*P o i n t s t o C o n s i d e r i n t h e M a n u f a c t u r e a n d T e s t i n g o f M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t s f o r H u m a n U s e*) 、 (生物製剤研究審査局、F D A 生物製剤評価センター (*O f f i c e o f B i o l o g i c s R e s e a r c h a n d R e v i e w . C e n t e r f o r B i o l o g i c s E v a l u a t i o n a n d R e s e a r c h F D A*) 、 1 9 9 7) 及び E C 薬事規則第 3 a 巻 (*t h e R u l e s G o v e r n i n g M e d i c i n a l P r o d u c t s i n t h e E u r o p e a n C o m m u n i t y V o l . 3 a*) 、 (モノクローナル抗体の産生及び品質管理 (*P r o d u c t i o n a n d Q u a l i t y C o n t r o l o f M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s*) 、 1 9 9 4 年 1 2 月、3 A B 4 a) に規定されたものであった。本調査で使用したすべての組織は液体窒素で瞬間冷凍し、必要になるまで - 7 0 以下で保存した。クライオスタット切片を 5 μ m ~ 8 μ m の基準の厚さで調製した。陽性対照はジャークット E 6 細胞であった。使用日に新鮮な血液試料を 3 人のドナーから採取してスメアを調製した。

【 0 2 8 5】

(i i) F I T C の結合形成

本研究を開始する前に S e r o t e c 社のオーダーメイド抗体サービス部門 (*C u s t o m A n t i b o d y S e r v i c e s D i v i s i o n*) (I S O 9 0 0 1 認定書) によってヒト化モノクローナル h B A T - 1 抗体を F I T C に結合させた。結合させ

た抗体の最終濃度は 1.99 mg/ml であった。

【0286】

本方法の最初の妥当性確認は、抗体 - 組織と冷凍切片との結合の力価濃度及び抗体 - 組織結合の正しい性能に関連する他の条件を決定するために対照組織（ジャーカット E 6 細胞系）で行った。スライドを顕微鏡で検査し、抗体特異性に対して相対的にスコアをつけた（表 21）。これらのデータに基づいて、本研究に渡って使用した hBAT-1 の濃度は $1:100$ 、 $1:250$ 及び $1:500$ であった。

【0287】

【表 21】

表 21

hBAT-1 希釈率	¹ 特異性	シグナル 力価	バックグラウンド
1:25	3	+++	3
1:50	3	+++	2
1:100	3	+++	1
1:250	3	+++	0
1:500	2	++	0
1:1000	1	+	0
1:2000	0	0	0
1:4000	0	0	0
1:8000	0	0	0
Negative	0	0	0

【0288】

¹ 符号：3 は強い陽性の染色を示し、2 は陽性の染色を示し、1 は弱い陽性の染色を示し、0 は染色 / シグナルなしを示す。+++ は強い可視シグナルを示し、++ は良好な可視シグナルを示し、+ は弱い可視シグナルを示す。

【0289】

(iii) 対照

抗体を緩衝液で置換した陰性対照反応を各組織で行った。それぞれの検出反応は、陽性対照細胞であるジャーカット E 6 を含み、抗体の 3 つの所定の希釈率で反応させた。これにより、反応の一貫性をモニタリングすることが可能となった。抗アクチン抗体とインキュベートした甲状腺の切片を検出システムの対照として各アッセイの実行に含めた。

【0290】

(iv) 交差反応性の評価

各組織の切片を、その同一性及び本研究に適しているかを確認するためにヘマトキシリン及びエオシン（H & E）で染色した。また、切片を抗平滑筋アクチン（SMA；表 22）又はウサギ抗ヒトトランスフェリン対照血清ともインキュベートし、これにより組織が免疫組織化学に適していることが示された。各組織の 3 つの切片を調製し、妥当性確認段階で決定された $1:100$ 、 $1:250$ 及び $1:500$ の濃度で FITC に結合させた抗体とインキュベートした。緩衝液で洗浄し、正常血清でブロッキングした後、切片をアルカリホスファターゼ検出に適切な二次及び三次抗体と共にインキュベートし、結合部位を決定するために顕微鏡で検査する前にヘマトキシリンで対比染色した。

【0291】

アルカリホスファターゼ検出を用いた FITC 結合染色方法は以下のステップを含んでいた：

1. クライオスタット切片の空気乾燥。
2. 10 分間、室温でアセトンに浸すことによる固定。
3. 空気乾燥。

4. 緩衝液での洗浄。
5. 1 : 5 の正常血清、少なくとも 20 分間。
6. 緩衝液での洗浄
7. 1 : 100、1 : 250 及び 1 : 500 の 1022292 試験 F I T C に結合させた抗体：終夜、2 ~ 8 。
8. 緩衝液での洗浄。
9. モノクローナル抗 F I T C 抗体、1 : 50、30 分間。
10. 緩衝液での洗浄。
11. アルカリホスファターゼに結合させた抗体、1 : 200、2 時間。
12. 緩衝液での洗浄。
13. ベクターレッド (V e c t o r r e d) 及びレバミゾール、20 分間。
14. 緩衝液での洗浄。
15. 対比染色及び装着。

10

【0292】

色素原内に組み込んだレバミゾールを使用して内在性アルカリホスファターゼを最小限にした。内在性アルカリホスファターゼ活性を抑制することができなかった組織では（ヒトの結腸、回腸、胎盤及び内皮、ネズミの結腸及び脾臓、霊長類の胃、回腸及び前立腺）、1 : 200 の西洋ワサビペルオキシダーゼに結合させた抗体を 2 時間、次いでジアミノベンジデン (D A B) 試薬を 20 分間で使用した。

20

【0293】**(v) 結果**

H & E で染色した個々の組織試料を、組織の質、正常な組織学的特徴の存在及び保存の妥当性について検査した。試験したすべての試料は本研究の目的に適していると考えられた。ジャーカット E 6 細胞系中では h B A T - 1 で、また平滑筋アクチンで処置した甲状腺切片で陽性の染色が起こった。対照が予測された結果を示したので、試験は妥当であると考えられた。

【0294】

h B A T - 1 及びヒト組織の個々の交差反応性の結果を表 22 に示す。陽性の染色は血管ヒト内皮で 1 : 100 の希釈率で検出され、これは恐らく h B A T - 1 がリンパ球に結合した結果である。陽性の染色は、ヒト化モノクローナル h B A T - 1 抗体の組織結合の可能性を示している。染色、即ち h B A T - 1 との交差反応性は脾臓切片、血液スメア又は他のヒト組織で観察されなかった（ヒト内皮 - 血管を除く）。ネズミ及び霊長類組織はどれも h B A T - 1 との交差反応性の証拠を示さなかった。

30

【0295】

【表 2 2】

表 22

組織	SMA	hBAT-1 抗体			
		1:100	1:250	1:500	1:1000
副腎	+	-	-	-	-
膀胱	+	-	-	-	-
血液細胞	¹ N/A	-	-	-	-
血管	+	+	-	-	-
(内皮)					
骨髄	N/A	-	-	-	-
乳房	+	-	-	-	-
小脳	+	-	-	-	-
大脳皮質	+	-	-	-	-
結腸	+	-	-	-	-
眼(網膜)	+	-	-	-	-
輸卵管	+	-	-	-	-
心臓	+	-	-	-	-
回腸(胃腸管)	+	-	-	-	-
腎臓	+	-	-	-	-
肝臓	+	-	-	-	-
肺	+	-	-	-	-
リンパ節	+	-	-	-	-
卵巣	+	-	-	-	-
膵臓	+	-	-	-	-
副甲状腺	+	-	-	-	-
耳下腺	+	-	-	-	-
下垂体	+	-	-	-	-
胎盤	+	-	-	-	-
前立腺	+	-	-	-	-
皮膚	+	-	-	-	-
脊髄	+	-	-	-	-
脾臓	+	-	-	-	-
胃	+	-	-	-	-
横紋筋肉	+	-	-	-	-
精巣	+	-	-	-	-
胸腺	+	-	-	-	-
甲状腺	+	-	-	-	-
扁桃腺	+	-	-	-	-
輸尿管	+	-	-	-	-
子宮-子宮頸部	+	-	-	-	-
子宮- 子宮内膜	+	-	-	-	-

10

20

30

40

【0296】

¹ N/A - 結果は該当なし

【0297】

特定の実施形態の前述の説明は、他者が現在の知識を適用することによって、過度の実

50

験なしに且つ全体的な概念から逸脱せずにこのような特定の実施形態を様々な用途に容易に改変及び／又は適応させることができるように本発明の全体的な性質を完全に明らかにしており、したがって、このような適応及び改変は開示した実施形態の等価物の意味及び範囲内に包含されるべきであり、そう意図されている。本明細書中で使用する表現や術語は説明を目的とし、限定を目的とするものではないことを理解されたい。様々な開示した機能を手段、材料、及びステップは、本発明から逸脱せずに様々な代替形態をとり得る。したがって、上記明細書及び／又は以下の特許請求の範囲で見つかり得る、表現「～する手段」及び「～するための手段」、又はすべての方法ステップの言葉及び続く機能の記述には、上記明細書中に開示した実施形態又は複数の実施形態に正確に等価であるかどうかにかかわらず、列挙した機能を実行する現在又は将来存在し得る全ての構造的、物理的、科学的若しくは電気的な要素又は構造、或いは全ての方法ステップを定義及び包含することを意図する、即ち同一機能を実施するために他の手段又はステップを使用することができ、また、このような表現には最も広い解釈を与えることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0298】

【図1】ネズミBAT-1抗体の軽鎖可変領域(V)のDNA配列及びペプチド配列を示す図である。

【図2】ネズミBAT-1のV領域内のCDRの標準クラスを示す図である。「コーチア標準クラス」とはコーチアと共同研究者が定義した標準クラスを使用した場合を示し(Chothia他、1987、1989、1992、同上;Tramontano他、J. Mol. Biol., 215:175、1990)、「マーチン標準クラス」とはマーチン及びソーントンが定義した標準クラスを使用した場合を示す(Martin他、J. Mol. Biol., 263:800、1996)。FR残基を太字で強調した。

【図3】ネズミBAT-1抗体の重鎖可変領域(V_H)のDNA配列及びペプチド配列を表す図である。

【図4】ネズミBAT-1のV_H領域内のCDRの標準クラスを示す図である。「コーチア標準クラス」とはコーチアと共同研究者が定義した標準クラスを使用した場合を示し(Chothia他、1987、1989、1992、同上;Tramontano他、同上)、「マーチン標準クラス」とはマーチン及びソーントンが定義した標準クラスを使用した場合を示す(Martin他、同上)。FR残基を太字で強調した。

【図5】提案されているヒト化BAT-1のV領域の様々な変型のアミノ酸配列を示す図である(配列番号15~18)。BAT-1のV領域の残基とヒトTELL9のV領域の配列とが一致する場合は点[.]で示した。特定の残基位置でアミノ酸が存在しない場合は長音記号[-]で示した。TELL9のFR内のアミノ酸がヒト化BAT-1のV領域で変化している場合は太字で強調した。CDRは術語[==L1==]を使用して記載した。使用した番号はカバットに従うものである(Kabat他、免疫学上関心が持たれているタンパク質の配列、第5版(Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition)、米国保健社会福祉省(U.S. Department of Health and Human Services)、米国政府印刷局(U.S. Government Printing Office)、1991)。

【図6】提案されているヒト化BAT-1のV_H領域の様々な変型のアミノ酸配列を表す図である(配列番号20~24)。BAT-1のV_H領域の残基とヒトhsighv1295のV_H領域の配列とが一致する場合は点[.]で示した。特定の残基位置でアミノ酸が存在しない場合は長音記号[-]で示した。hsighv1295のFR内のアミノ酸がヒト化BAT-1のV_H領域で変化している場合は太字で強調した。CDRは術語[==H1==]を使用して記載し、[- - - -]はH1ループ構造の一部を示す。使用した記号はカバットに従うものである(Kabat他、同上)。

【図7】ヒト化BAT-1抗体の再構成ヒト軽鎖可変領域の変型A(BATR_A)のDNA配列(配列番号87)及びペプチド配列(配列番号15)を示す図である。

【図 8】ヒト化 B A T - 1 抗体の再構成ヒト 軽鎖可変領域の変型 B (B A T R_B) の DNA (配列番号 8 8) 及びペプチド (配列番号 1 6) を示す図である。

【図 9】ヒト化 B A T - 1 抗体の再構成ヒト 軽鎖可変領域の変型 D (B A T R_D) の DNA 配列 (配列番号 8 9) 及びペプチド配列 (配列番号 1 8) を表す図である。

【図 1 0】p K N 1 1 0 - B A T R_D ベクター構築体の略図である。

【図 1 1】B A T - 1 軽鎖発現ベクターに挿入された B A T - 1 軽鎖カセットの略図である。

【図 1 5】p G 1 D 1 1 0 . B A T - 1 . R H_C ベクター構築体の略図である。

【図 1 6】B A T - 1 重鎖発現ベクターに挿入された B A T - 1 重鎖カセットの略図である。

【図 1 7】p G 1 D 2 0 0 - 1 免疫グロブリン重鎖哺乳動物発現ベクターの略図である。

【図 1 8】p G 1 K D 2 1 0 . B A T - 1 . R H C / R K D 単一発現ベクターの略図である (配列番号 9 3) 。

【図 1 9】完全 B A T - 1 抗体を発現させるための単一発現ベクターに挿入された B A T R_D / B A T R H_C 重鎖及び軽鎖カセットの略図である。

【図 2 0】B A T - 1 キメラ抗体に対するヒト化 B A T R H_B / B A T R_B 変異体のダウディ細胞 E L I S A を示す図である。

【図 2 1】B A T - 1 キメラ抗体に対するヒト化 B A T R H_B / B A T R_A 及び B A T R H_A / B A T R_A 変異体のダウディ細胞 E L I S A を示す図である。

【図 2 2】B A T - 1 キメラ抗体に対するヒト化 B A T R H_C / B A T R_B 及び B A T R H_C / B A T R_D 変異体のダウディ細胞 E L I S A を示す図である。

【図 2 3】B A T - 1 キメラ抗体に対するヒト化 B A T R H_B / B A T R_D 変異体のダウディ細胞 E L I S A を示す図である。

【図 2 4】ネズミ B A T - 1 m A b 及びヒト化 B A T R H_C / B A T R_D 1 m A b のダウディ細胞への用量依存結合曲線である。

【図 2 5】対照 (処置なし) 及び元のネズミ B A T - 1 m A b で処置したものに対する、ネズミ B 1 6 肺腫瘍中のヒト化 B A T R H_C / B A T R_D 1 m A b (h B A T) の用量依存的な転移抑制活性を例示する図である。全ての処置は腫瘍接種後 1 4 日目に静脈内投与し、処置の 1 0 日後に肺を検査した。

【図 2 6】ヒトリンパ球を移植した S C I D マウス中のヒト黒色腫 (S K - 2 8) に対するヒト化 B A T R H_C / B A T R_D 1 m A b の阻害効果を表す図である。腫瘍増殖に対するヒト化 B A T - 1 の効果を、対照 (処置なし) 又はネズミ B A T - 1 m A b (m B A T - 1) で処置したものと比較した。

【図 2 7】B A L B / c ヌードマウスに移植したネズミ腫瘍モデル (H M 7) におけるヒト化 B A T R H_C / B A T R_D 1 m A b の転移抑制活性を実証する図である。

【図 2 8】リンパ球にゲートをかけたフローサイトメリーによって決定したヒト化 B A T R H_C / B A T R_D 1 m A b (h B A T) と C D 4 (A) 及び C D 8 (B) との共局在を示す図である。

【図 2 9】ヒト化 B A T R H_C / B A T R_D 1 m A b の、正常なドナーから単離した B リンパ球の細胞マーカー C D 1 9 (A) 及び C D 2 0 (B) への結合を表す図である。

【図 3 0】ヒト化 B A T m A b の、不活性 (0 日目、A ; 5 日目、C) 及び活性 (2 日、B ; 5 日、D) C D 4 + T 細胞への結合を表す図である。

【図 3 1】ヒト化 B A T m A b の、抗 C D 3 及び抗 C D 2 8 に結合させたビーズで活性化させた C D 6 9 + T 細胞の用量依存的な結合を示す図である (活性化なし、A ; 0 . 2 5 μ l、B ; 0 . 5 μ l、C) 。

【図 3 2】ヒト化 B A T R H_C / B A T R_D 1 m A b と T 細胞の C D 2 5 マーカーとの時間依存的な共局在を表す図である : 0 日目、A ; 活性化 2 日目及び 5 日目、それぞれ B 及び D ; 活性化なしの 5 日目、C 。

10

20

30

40

50

【図 3 3】ヒト化 B A T R H_C / B A T R_D 1 m A b と T 細胞の C D 4 0 - リガン
ドマーカ-との時間依存的な共局在を示す図である：0 日目、A；活性化の 1 日目、2 日
目及び 5 日目、それぞれ B ~ C 及び E；活性化なしの 5 日目、D。

【図 3 4】h B A T に誘発された、2 人の別個のドナー（A 及び B）から単離した生 C D
4 + 細胞数の増加を表す図である。

【図 3 5】ダウディ（A）及びジャーカット（B）細胞系に結合している h B A T を表す
図である。

【図 3 6】癌患者の P B L に結合している h B A T を実証する図である。

【配列表】

SEQ LIST CT004 PCT
SEQUENCE LISTING

10

<110> CURETECH LTD.
MOR - RESEARCH APPLICATIONS LTD.

<120> HUMANIZED IMMUNOMODULATORY MONOCLONAL ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF
NEOPLASTIC DISEASE OR IMMUNODEFICIENCY

<130> CT/004 PCT

<150> IL 149820
<151> 2002-05-23

<160> 93

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 23
<212> PRT
<213> synthetic peptide

20

<400> 1

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> synthetic peptide

30

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Phe or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa = Trp or Leu

<400> 2

Trp Xaa Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Xaa Ile Tyr
1 5 10 15

40

<210> 3
<211> 32
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa = Asp or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE

SEQ LIST CT004 PCT

<222> (15)..(15)

<223> Xaa = Tyr or Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa = Cys or Thr

<400> 3

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 4

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> synthetic peptide

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Ile or Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa = Thr or ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa = Thr or Ser

30

<400> 5

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Xaa Phe Xaa
 20 25 30

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> synthetic peptide

40

SEQ LIST CT004 PCT

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Arg or Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Gln or Lys

<400> 6

Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Xaa Trp Met Gly
 1 5 10

10

<210> 7
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Val or Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Asn or Ser

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = Thr or Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa = Val or Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa = Arg or Lys

30

<400> 7

Arg Phe Xaa Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Xaa Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Ile Thr Ser Leu Xaa Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

40

SEQ LIST CT004 PCT

<400> 8

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 9

Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 10

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> synthetic peptide

20

<400> 11

Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 12

Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5

30

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 13

Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 8

40

SEQ LIST CT004 PCT

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 14

Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 15

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10

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

20

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

30

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu

40

```

65          70      SEQ LIST CT004 PCT            80
                        75
Asp Phe Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
                  85                      90                95

```

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210>	17
<211>	106
<212>	PRT
<213>	synthetic peptide
<400>	17

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210>	18
<211>	106
<212>	PRT
<213>	synthetic peptide
<400>	18

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

SEQ LIST CT004 PCT

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 129
<212> PRT
<213> synthetic peptide

10

<400> 19

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
50 55 60

20

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

Ser Ser Phe Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

30

Lys

<210> 20
<211> 117
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<400> 20

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr

40

										SEQ LIST CT004 PCT																																											
20										25	30																																										
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Met																																						
										35											40											45																					
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Glu	Glu	Phe																																						
										50											55											60																					
Lys	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr																																						
										65											70											75											80										
Leu	Gln	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Met	Tyr	Phe	Cys																																						
																					85											90											95										
Ala	Lys	Val	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu																																						
																					100											105											110										
Val	Thr	Val	Ser	Ser																																																	
										115																																											
<210>															21																																						
<211>															117																																						
<212>															PRT																																						
<213>															synthetic peptide																																						
<400>															21																																						
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala																																						
										1											5											10											15										
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr																																						
																					20											25											30										
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Met																																						
										35											40											45																					
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Glu	Glu	Phe																																						
										50											55											60																					
Lys	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr																																						
										65											70											75											80										
Leu	Gln	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Met	Tyr	Phe	Cys																																						
																					85											90											95										
Ala	Lys	Val	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu																																						
																					100											105											110										
Val	Thr	Val	Ser	Ser																																																	
										115																																											
<210>															22																																						
<211>															117																																						

SEQ LIST CT004 PCT

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 22

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 23

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

10

20

30

SEQ LIST CT004 PCT
 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 24

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

10

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

20

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Asn Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

30

<400> 25
 atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcaccataa cctgcagtgc cagggtcaagt gtaagttaca tgcactgggt ccagcagaag 180
 ccaggcactt ctcccaaact ctggatttat aggacatcca acctggcttc tggagtcctt 240
 gctcgcttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactgtc tcacaatcag ccgaatggag 300
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gtttccact cacgttcggc 360
 tcggggacaa agttggaaat aaaa 384

SEQ LIST CT004 PCT

<210> 26
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 26

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

10

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala
 65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Asn Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

20

Tyr Phe Cys Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 27
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 27
 atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagcacag 60
 atccagttgg tgcagtctgg acctgagttg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
 tgcaaggcct ctggatatac tttcacaaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180
 ggaaaggggt taaagtggat gggctggata aacaccgaca gtggagagtc aacatatgct 240
 gaagagttca agggacgggt tgccttctct ttggaaacct ctgccaacac tgcctatttg 300
 cagatcaaca acctcaaca tgaggacacg gctacatatt tctgtgtgag agtcggctac 360
 gatgctttgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctctctca 408

30

<210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

40

SEQ LIST CT004 PCT

<400> 28

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

10

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> synthetic peptide

20

<400> 29

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ser His
 20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Ser Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

30

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Lys Glu Ser His Ser Ser Ala Leu Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

SEQ LIST CT004 PCT

<210> 30		
<211> 43		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 30		
cccaagcttg ccgccaccat ggacatgagg gtccccgctc agc	43	
<210> 31		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		10
<400> 31		
tcctggggct cctgctgctc tggtcccag gtgccaaatg	40	
<210> 32		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 32		
tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca	40	
<210> 33		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		20
<400> 33		
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt	40	
<210> 34		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 34		
caagtgtgtaag ttacatgcac tggatatcagc agaaaccagg	40	
<210> 35		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		30
<400> 35		
gaaagcccct aagctcctga tctataggac atccaacctg	40	
<210> 36		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 36		
gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg	40	
<210> 37		
<211> 40		
<212> DNA		40

SEQ LIST CT004 PCT
<213> synthetic polynucleotide

<400> 37
ggacagattt cactctcacc atcaacagcc tgcagcctga 40

<210> 38
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 38
agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc 40

<210> 39 10
<211> 55
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 39
ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat ccgcg 55

<210> 40
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 40
gagcagcagg agccccagga gctgagcggg gaccctcatg 40

<210> 41 20
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 41
actgcgtcaa cacaatttca catttggcac ctgggagcca 40

<210> 42
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 42
gtgactctgt ctctacaga tgcagacagg gaggatggag 40

<210> 43 30
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 43
gtgcatgtaa cttacacttg acctggcact gcaagtgatg 40

<210> 44
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 44
tcaggagctt aggggctttc cctggtttct gctgatacca 40

SEQ LIST CT004 PCT

<210> 45		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 45		
ctagatggga cccagaagc caggttgat gtcctataga	40	
<210> 46		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 46		10
ggtgagagtg aaatctgtcc cagatccact gccgctgaat	40	
<210> 47		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 47		
aatagtaagt tgcaaaatct tcaggctgca ggctgttgat	40	
<210> 48		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 48		20
cctccgccga acgtgagtgg gaaactactc ctttgcctggc	40	
<210> 49		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 49		
cgcggatcca ctcacgtttg atctccagct tggtc	35	
<210> 50		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 50		30
caagtgtatg ttacatgcac tgggtccagc agaaaccagg	40	
<210> 51		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 51		
gaaagccctt aagctctgga tctataggac atccaacctg	40	
<210> 52		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
		40

SEQ LIST CT004 PCT

<400> 52		
ggacagatta cactctcacc atcaacagcc tgcagcctga	40	
<210> 53		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 53		
tccagagctt aggggctttc cctggtttct gctggaacca	40	
<210> 54		
<211> 40		10
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 54		
ggtgagagtg taatctgtcc cagatccact gccgctgaac	40	
<210> 55		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 55		
ggtgagacag taagatgtcc cagatccact gccgctgaac	40	
<210> 56		
<211> 40		20
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 56		
ggacatctta ctgtctcacc atcaacagcc tgcagcctga	40	
<210> 57		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 57		
cccaagcttg ccgccaccat ggactggacc tggaggatcc	40	
<210> 58		
<211> 33		30
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 58		
tcttcttggt ggcagcagca acaggtgccc act	33	
<210> 59		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 59		
cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa	40	

SEQ LIST CT004 PCT

<210>	60		
<211>	40		
<212>	DNA		
<213>	synthetic polynucleotide		
<400>	60		
	gcctggggcc tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga	40	
<210>	61		
<211>	40		
<212>	DNA		
<213>	synthetic polynucleotide		
<400>	61		
	tatagcttca gtaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg	40	10
<210>	62		
<211>	40		
<212>	DNA		
<213>	synthetic polynucleotide		
<400>	62		
	cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac	40	
<210>	63		
<211>	40		
<212>	DNA		
<213>	synthetic polynucleotide		
<400>	63		
	cgacagtgga gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga	40	20
<210>	64		
<211>	40		
<212>	DNA		
<213>	synthetic polynucleotide		
<400>	64		
	cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc agcacggcat	40	
<210>	65		
<211>	40		
<212>	DNA		
<213>	synthetic polynucleotide		
<400>	65		
	atctgcagat caccagcctc acggctgagg aactggcat	40	30
<210>	66		
<211>	35		
<212>	DNA		
<213>	synthetic polynucleotide		
<400>	66		
	gtatttctgt gcgaaagtcg gctacgatgc tttgg	35	
<210>	67		
<211>	54		
<212>	DNA		
<213>	synthetic polynucleotide		

SEQ LIST CT004 PCT

<400> 67		
actactgccc ccaggggaacc ctggtcaccg tctcttcagg tgagtggatc cgcg	54	
<210> 68		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 68		
tgctgccacc aagaagagga tccttcacagg tggagtccat ggtgg	45	
<210> 69		
<211> 36		
<212> DNA		10
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 69		
ttgcaccagc tgcacctggg agtgggcacc tgttgc	36	
<210> 70		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 70		
tcttcactga ggccccaggc ttcttaagct cagaccaga	40	
<210> 71		
<211> 39		
<212> DNA		20
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 71		
ccatagttac tgaagctata tccagaagct tgcaggaga	39	
<210> 72		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 72		
ctgaagccct tgtccagggg cctgtcgcac ccagttcatt	40	
<210> 73		
<211> 40		
<212> DNA		30
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 73		
atgttgactc tccactgtcg gtgtttatcc atcccatcca	40	
<210> 74		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 74		
tccaaggaga agacaaaccg tcccttgaac tcttcagcat	40	
<210> 75		

SEQ LIST CT004 PCT

<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 75		
gaggctgggtg atctgcagat atgccgtgct gacagagggtg	40	
<210> 76		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 76		
cgactttcgc acagaaatac atgccagtgt cctcagccgt	40	10
<210> 77		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 77		
ttccctggcc ccagtagtcc aaagcatcgt agc	33	
<210> 78		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 78		
cgcggatcca ctcacctgag gagacgggtga ccaggg	36	20
<210> 79		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 79		
tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg	40	
<210> 80		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 80		
ccatagtttg tgaaagtata tccagaagcc ttgcaggaga	40	30
<210> 81		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 81		
cggtttgct tctccttgga cacctctgtc aacacggcat	40	
<210> 82		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 82		

SEQ LIST CT004 PCT

gtatttctgt gtgagagtcg gctacgatgc tttag	35	
<210> 83		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 83		
cgactctcac acagaaatac atgccagtgt cctcagccgt	40	
<210> 84		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		10
<400> 84		
atctgcagat caccagcctc aacgctgagg aactggcat	40	
<210> 85		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 85		
gaggctggtg atctgcagat atgccgtgtt gacagagggtg	40	
<210> 86		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		20
<400> 86		
tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgaagcagg	40	
<210> 87		
<211> 412		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 87		
aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc tcctggggct cctgctgctc	60	
tggtctccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca	120	
tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt caagtgtgtaag ttacatgcac	180	
tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct aagctcctga tctataggac atccaacctg	240	30
gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	300	
atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc	360	
ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc	412	
<210> 88		
<211> 412		
<212> DNA		
<213> synthetic polynucleotide		
<400> 88		
aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc tcctggggct cctgctgctc	60	

SEQ LIST CT004 PCT
 tggctcccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca 120
 tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt caagtgtgag ttacatgcac 180
 tggttccagc agaaaccagg gaaagcccct aagctctgga tctataggac atccaacctg 240
 gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacagatta cactctcacc 300
 atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc 360
 ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc 412

<210> 89
 <211> 412
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

10

<400> 89
 aagcttgccg ccaccatgga catgaggggtc cccgctcagc tcctggggct cctgtctgctc 60
 tggctcccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca 120
 tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt caagtgtgag ttacatgcac 180
 tggttccagc agaaaccagg gaaagcccct aagctctgga tctataggac atccaacctg 240
 gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacatctta ctgtctcacc 300
 atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc 360
 ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc 412

20

<210> 90
 <211> 436
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 90
 aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca 60
 ggtgcccact cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc 120
 tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg 180
 gtgcgacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtggg 240
 gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga cggtttgtct tctccttggg caccctctgtc 300
 aacacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg acactggcat gtatttctgt 360
 gtgagagtcg gctacgatgc tttggactac tggggccagg gaaccctggg caccgtctcc 420
 tcaggtgagt ggatcc 436

30

<210> 91
 <211> 436
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 91
 aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca 60
 ggtgcccact cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc 120
 tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg 180

40

SEQ LIST CT004 PCT

gtgCGacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga 240
 gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga cggtttgtct tctccttga cacctctgtc 300
 agcacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg aactggcat gtatttctgt 360
 gcgaaagtcg gctacgatgc tttggactac tggggccagg gaacctggt caccgtctcc 420
 tcaggtgagt ggatcc 436

<210> 92
 <211> 436
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

10

<400> 92
 aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca 60
 ggtgcccact ccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc 120
 tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg 180
 gtgCGacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga 240
 gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga cggtttgtct tctccttga cacctctgtc 300
 agcacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg aactggcat gtatttctgt 360
 gcgaaagtcg gctacgatgc tttggactac tggggccagg gaacctggt caccgtctcc 420
 tcaggtgagt ggatcc 436

20

<210> 93
 <211> 10259
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> pG1KD210.BAT-1.RHC/RkD single expression vector

<400> 93
 ttgaagacga aaggcctcgc tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 60
 ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 120
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 180
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 240
 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgcacacca gaaacgctgg tgaaagtaaa 300
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 360
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgtttttcca atgatgagca cttttaaagt 420
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgcccgg caagagcaac tcggtcgccg 480
 catacactat tctcagaatg acttgggtga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgtc 600
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa 660
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 720

30

SEQ LIST CT004 PCT

aaacgacgag	cgtgacacca	cgaigcctgc	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	780
aactggcgaa	ctacttactc	tagcttcccc	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcgga	840
taaagttagc	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	900
atctggagcc	ggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gactggggc	cagatggtaa	960
gccctcccgt	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	1020
tagacagatc	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	1080
ttactcatat	atactttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	1140
gaagatcctt	tttgataatc	tcatgacca	aatcccttaa	cgtgagtttt	cgttccactg	1200
agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcgcgt	1260
aatctgctgc	ttgcaaaca	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttgtt	tgccggatca	1320
agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatac	1380
gtcctttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	1440
atacctcgct	ctgctaatac	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	1500
taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	1560
gggttcgtgc	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gataacctaca	1620
gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggt	1680
aagcggcagg	gtcggaacag	gagagcgac	gagggagctt	ccagggggaa	acgcctggta	1740
tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	cgtcgatttt	tgtgatgctc	1800
gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	gcctttttac	ggttcctggc	1860
cttttgctgg	ccttttgctc	acatgttctt	tcctgcgtta	tcccctgatt	ctgtggataa	1920
ccgtattacc	gcctttgagt	gagctgatac	cgctcgccgc	agccgaacga	ccgagcgcag	1980
cgagtcagtg	agcgaggaag	cggaagagcg	cctgatgcgg	tattttctcc	ttacgcacct	2040
gtgcggtatt	tcacaccgca	tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	2100
gttaagccag	tatacactcc	gctatcgcta	cgtgactggg	tcatggctgc	gccccgacac	2160
ccgccaacac	ccgtgacgc	gccctgacgg	gcttgtctgc	tcccggcatc	cgcttacaga	2220
caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgctagaggt	tttcaccgtc	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggc	agcatgcata	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccgcgcc	taactccgcc	2340
catcccggcc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatttt	2400
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggt	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatgggtc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtggaagg	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctggttc	2760

10

20

30

SEQ LIST CT004 PCT

tccattcctg	agaagaatcg	accttttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgccttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagtaaa	gtagacatgg	tttgtagatg	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atgcaggaat	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atgtggggaa	atataaactt	3060
ctcccagaat	accagggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagtataag	3120
tttgaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctcccctc	3180
ctaaagctat	gcatttttat	aagaccatgg	gacttttgct	ggcttttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacctt	tggaactgat	gaatgggagc	agtgggtgaa	tgcctttaat	3420
gaggaaaacc	tgttttgctc	agaagaaatg	ccatctagt	atgatgaggc	tactgctgac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaaagaag	agaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcagtct	gtgtttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctattitaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactgtt	ttttcttact	3720
ccacacaggc	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	tacctttagc	3780
tttttaattt	gtaaaggggt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaacc	tcccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aatgaatgc	aattgtttgt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	4020
actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctactagt	4080
gccggcccg	gcgatcgctc	gagatatcta	ttaatagtaa	tcaattacgg	ggtcattagt	4140
tcatagccca	tatatggagt	tccgcgttac	ataacttacg	gtaaatggcc	cgcttggtg	4200
accgccaac	gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	tatgttccca	tagtaacgcc	4260
aatagggact	ttccattgac	gtcaatgggt	ggagtattta	cggtaaactg	cccacttggc	4320
agtacatcaa	gtgtatcata	tgccaagtac	gccccctatt	gacgtcaatg	acggtaaagt	4380
gcccgcctgg	cattatgccc	agtacatgac	cttatgggac	tttcctactt	ggcagtacat	4440
ctacgtatta	gtcatcgcta	ttaccatggt	gatgcggttt	tggcagtaca	tcaatgggag	4500
tggatagcgg	tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	cccattgacg	tcaatgggag	4560
tttgttttgg	cacaaaaatc	aacgggactt	tccaaaatgt	cgtaacaact	ccgccccatt	4620
gacgcaaagt	ggcggtaggc	gtgtacggtg	ggagggtctat	ataagcagag	ctcgtttagt	4680
gaaccgtcag	atcgccctgga	gacgccatcc	acgctgtttt	gacctccata	gaagacaccg	4740
ggaccgatcc	agcctccgcg	gccgggaacg	gtgcattgga	acgcggattc	cccgtgccaa	4800

10

20

30

SEQ LIST CT004 PCT

gagtgacgta agtaccgcct atagagtcta taggcccacc cccttggtt cttatgcatg	4860
ctatactgtt tttggcttgg ggtctatata cccccgcttc ctcatgttat aggtgatggt	4920
atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga ccactcccct attggtgacg	4980
atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctcttt attggctata	5040
tgccaataca ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct	5100
catttattat ttacaaattc acatatacaa caccaccgtc cccagtgcc gcagttttta	5160
ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcggtacg tgttccggac atgggctctt	5220
ctccggtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgctcc catgcctcca gcgactcatg	5280
gtcgtcggc agctccttgc tcctaacagt ggaggccaga cttaggcaca gcacgatgcc	5340
caccaccacc agtgtgccgc acaaggccgt ggcggtaggg tatgtgtctg aaaatgagct	5400
cggggagcgg gcttgaccg ctgacgcatt tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga	5460
tgcaggcagc tgagttgtt tgttctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct	5520
gttaacgggt gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag	5580
acataatagc tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg	5640
tccttgacac gcgtctcggg aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc	5700
tcctggggct cctgctgctc tggctcccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt	5760
ctccatctc cctgtctgca tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt	5820
caagtgtaa ttacatgcac tggttccagc agaaaccagg gaaagcccct aagctctgga	5880
tctataggac atccaacctg gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggtctg	5940
ggacatctta ctgtctcacc atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt	6000
gccagcaaag gagtagtttc ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac	6060
gtgagtggat ccatctggga taagcatgct gttttctgtc tgtccctaac atgcctgtg	6120
attatgcgca aacaacacac ccaaggcag aactttgtta cttaaaccac atcctgtttg	6180
cttctttctc caggaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgc atctgatgag	6240
cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcttctga ataacttcta tcccagagag	6300
gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc	6360
acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa	6420
gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg	6480
cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgtagaggg agaagtgcc ccacctgctc	6540
ctcagttcca gcctgacccc ctccatcct ttggcctctg accctttttc cacaggggac	6600
ctaccctat tgcggtcctc cagctcatct ttacactcac ccccctctc ctcttggt	6660
ttaattatgc taatgttga ggagaatgaa taaataaagt gaatctttgc acctgtggtg	6720
gatctaataa aagatattta ttttcattag atatgtgtgt tggttttttg tgtgcagtgc	6780
ctctatctgg aggccaggta gggctggcct tgggggaggg ggaggccaga atgactcaa	6840

10

20

30

SEQ LIST CT004 PCT

gagctacagg aaggcagggtc agagacccca ctggacaaac agtggctgga ctctgcacca 6900
 taacacacaa tcaacagggg agtgagctgg aaatttgcta gcgaattcta ttaatagtaa 6960
 tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 7020
 gtaaatggcc cgcctggctg accgcccac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 7080
 tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 7140
 cggtaaacctg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt 7200
 gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac ctatggggac 7260
 tttctacttt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcgggtt 7320
 tggcagtaca tcaatggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac 7380
 cccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 7440
 cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaag ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggctctat 7500
 ataagcagag ctggtttagt gaaccgtcag atcgcttggg gacgccatcc acgctgtttt 7560
 gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga 7620
 acgcggttc cccgtgcaa gagtgacgta agtaccgct atagagtcta taggccacc 7680
 cccttggtt cttatgcatg ctatactgtt ttggttgg ggtctatata cccccgttc 7740
 ctcatgttat aggtgatggt atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga 7800
 ccactccct attggtgacg atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac 7860
 aactctctt attggttata tgccaatata ctgtccttca gagactgaca cggactctgt 7920
 atttttacag gatggggtct catttattat ttacaaatc acatatacaa caccaccgtc 7980
 cccagtggcc gcagttttta ttaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcggttacg 8040
 tgttccggac atgggtctct ctccgtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgctcc 8100
 catgcctcca gcgactcatg gtcgctcggc agctccttgc tcctaacagt ggaggccaga 8160
 cttaggcaca gcacgatgcc caccaccacc agtggtcgcg acaaggccgt ggcggtaggg 8220
 tatgtgtctg aaaatgagct cggggagcgg gcttgaccg ctgacgcatt tggaagactt 8280
 aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc tgagttgttg tgttctgata agagtcagag 8340
 gtaactcccg ttgcgggtct gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt 8400
 gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc tgacagacta acagactgtt cttttccatg 8460
 ggtcttttct gcagtcaccg tccttgacac cgtctcggg aagcttgccg ccaccatgga 8520
 ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca ggtgcccact ccaggtgca 8580
 gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc tcagtgaaga tctcctgcaa 8640
 ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg ccctgggaca 8700
 agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga gagtcaacat atgctgaaga 8760
 gttcaaggga cggtttctct tctccttggc cactctgtc aacacggcat atctgcagat 8820
 caccagcctc acggctgagg acactggcat gtatttctgt gtgagagtcg gctacgatgc 8880

10

20

30

SEQ LIST CT004 PCT

tttggactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcg agcgccctcca ccaagggccc	8940
atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg	9000
ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct	9060
gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag	9120
cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa	9180
tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac	9240
tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga atcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt	9300
cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggta catgcgtggt	9360
ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga	9420
ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtag aacagcacgt accgggtggt	9480
cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaagg	9540
ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc	9600
ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgagg gagatgacca agaaccagg	9660
cagcctgacc tgcctggta aaggcttcta tcccagcag atcgccgtgg agtgggagag	9720
caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc	9780
cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt	9840
ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct	9900
gtctccgggt aaatgagtgc gacggccggc aagccccgct cccgggctc tcgcggtcgc	9960
acgaggatgc ttggcacgta cccctgtac atacttccc ggcgcccagc atggaataa	10020
agcaccggat ctaataaaag atatttattt tcattagata tgtgtgttg ttttttgtgt	10080
gcagtgcctc tatctggagg ccaggtaggg ctggccttg gggaggggga ggccagaatg	10140
actccaagag ctacaggaag gcaggtcaga gacccactg gacaaacagt ggctggactc	10200
tgcaccataa cacacaatca acaggggagt gagctggaat tttgctagcg aattaattc	10259

10

20

【図 1】

```

ATGGATTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATTAATGTCC
1  - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 60
TACCTAAATGTCCACGCTTAATAGTCGAGGACGATTAGTCACGGAGTCAGTATTACAGG
M D L Q V Q I I S F L L I S A S V I M S

AGAGGACAAATTTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAG
61  - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 120
TCTCCTGTTTAAACAAGACTGGGTACAGAGTTCGTTAGTACAGACGTAGAGGTCCTCCTCTC
R G Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K

GTCACCATTAACCTGCAGTCCAGGTCAAGTGTAAAGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAGAAG
121 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 180
CAGTGGTATTGGACGTACCGGTCCAGTTCAGATTCAATGTACGTGACCAAGCTCGTCTTC
V T I T C S A R S S V S V M H W F Q Q K

CCAGGCACCTTCTCCCAAACCTCTGGATTATAGAGACATCCAAACCTGGCTCTCGAGTCCCT
181 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 240
GGTCCGTGAAGAGGGTTTGAGACCTAAATATCTGTAGGTGGACCGAAGACCTCAGGGA
P G T S P K L W I Y R T S N L A S G V P

GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTGTCTCAACAATCAGCGAATGGAG
241 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 300
CGAGCGAAGTCAACCTACCTAGACCTGGAGAAATGACAGAGTGTAGTGGCTTACCTC
A R F S G S G S G T S Y C L T I S R M E

GCTGAAGATGCTGCCACTTTATTTACTGCCAGCAAGGAGTAGTTTCCCACTCAAGTTCGGC
301 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 360
CGACTTCTACGACGCTGAATTAATGACGCTCGTTTCTCTCAICAAAGGTGAGTGCAGCGG
A E D A A T Y Y C Q Q R S S F P L T F G

TCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA
361 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 384
AGCCCTGTTCACCTTTATTTT
S G T K L E I K

```

FIGURE 1

【図 3】

```

ATGGCTTGGGTGGACCTTGCTATTTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATCCAGCACAG
1  - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 60
TACCGAACCCACACCTGGAAAGATAAGGACTACCGTGGACGGGTTTCATAGSITTCGTTC
M A W V W T L L F L M A A A Q S I Q A Q

ATCCAGTGTGGTGCAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCC
61  - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 120
TAGGTCAACCACTGACAGCTGGAGTCAACTTCTTCGGACCTCTCTGTAGTCTAGAGG
I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S

TGCAAGGCTTCTGGATATACCTTTCACAAACCTATGGAATGAAGTGGTGAAGCAGGCTCCA
121 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 180
ACGTTCGGAAGACCTATATGAAGTGTGTTGATACCTTACTTGACCCACTTCGTCCGAGGT
C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P

GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACAACCGACAGTGGAGAGTCAACATATGCT
181 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 240
CCTTTCCCAAATTTCACTACCGACCTATTTTGGGCTGTCACCTCTCAGTTGTATAGGA
G K G L K W M G W I N T D S G E S T Y A

GAAGAGTTCAAGGGACGGTTGCTCTCTCTTTGGAACCTCTGCCAACCTGCCTATTTG
241 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 300
CTTCTCAAGTTTCCTGCCAAACGGAAGAGAAACCTTTGGAGACGGTGTGACGGATAAAC
E E F K G R P A F S L E T S A N T A Y L

CAGATCAACAACCTCAACAATGAGGACCGGCTACATATTTCTGTGTGAGAGTCCGGCTAC
301 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 360
GTCTAGTTGTGGAGTTGTCTACTCTCTGTGCCGATGATAAAGACACACTCAGCCGATG
Q I N N L N N E D T A T Y F C V R V G Y

GATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAACGCTCTCCTCA
361 - - - - + - - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 408
CTACGAAACCTGATGACCCAGTTCCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGT
D A L D Y W G Q G T S V T V S S

```

FIGURE 3

【図 2】

コーチア標準クラス

- L1 (10個のアミノ酸) = クラス1*
- 主要残基: 2(L); 25(A); 29(Y); 33(LM); 71(YF)
- L2 (7個のアミノ酸) = クラス1
- 主要残基: 48(I); 51(A); 52(S); 64(C)
- L3 (9個のアミノ酸) = クラス1
- 主要残基: 90(QNH); 95(P)

マーチン標準クラス

- L1 (10個のアミノ酸) = クラス未定義(しかしクラス1/10A*に最も類似)
- 主要残基: 2(L); 4(L); 23(C); 25(A); 30(Y); 33(LM); 35(W); 71(Y); 88(C); 90(Q); 93(SYR)
- L2 (7個のアミノ酸) = クラス1/7A
- 主要残基: 23(C)
- L3 (9個のアミノ酸) = クラス未定義(しかしクラス1/9Aに最も類似)
- 主要残基: 2(ILV); 3(VQLE); 4(ML); 28(SNDIE)*; 30(DLYVISNHFHT); 31(SNTKG); 32(FYNAHSR); 33(MLVIF); 88(C); 89(QSGFL); 90(QNH); 91(NFGSRDHTYV); 92(NYWTSRQHAD); 93(ENGHTSRAQHAD); 94(DYTVLHNIWTS)*; 95(E); 96(PLYRIWF); 97(I); 98(E)

* このクラスはカバットマウス_kサブグループVI*で見られる

* L1ループは10個のアミノ酸の長さでしかないので、BATのV_k領域内ではこの位置に残基が存在しない

◇ BATのV_k領域内ではアミノ酸Phe(F)がこの位置で見つかる

【図 4】

コーチア標準クラス

- H1 (10個のアミノ酸*) = クラス1
- 主要残基: 24(TAVGS); 26(G); 27(FYTG); 29(ELIV); 34(MIVLT); 94(RTKHGL)
- H2 (17個のアミノ酸) = クラス2
- 主要残基: 52a(P₁A); 55(S); 71(A₁L₁T)

マーチン標準クラス

- H1 (10個のアミノ酸*) = クラス1/10A
- 主要残基: 2(VIG); 4(LV); 20(LIMV); 22(C); 24(TAVGS); 26(G); 29(IFS); 32(IHYFINCED); 33(YAWGTLV); 34(VMW); 35(HENQSYT); 36(W); 48(IMLV); 51(LIVTSN); 69(ILFMV); 78(ALVYF); 80(LM); 90(YF); 92(C); 94(RKGS₁HN); 102(YHVIDSG)

- H2 (10個のアミノ酸*) = クラス未定義(しかしクラス2/10Aに最も類似)

主要残基: 33(YWGATL); 47(WY); 50(REWYGGQVLNKA); 51(LJ); 52(DLSY); 53(AGYSKTN)*; 54(NSTKDG); 56(YREDGVSA); 58(KN₁TS₁DRGFY); 59(Y); 69(I₁FLM); 71(V₁AL); 78(ALV)

* H1ループは実際にCDR1の5個のアミノ酸とFR1のN末端の5個のアミノ酸とからなる

* AbMは、H2ループを10個のアミノ酸の長さでしかない、即ちCDR2においてカバットの定義よりも7個のアミノ酸短いと定義している

◇ BATのV_k領域内ではアミノ酸Asp(D)がこの位置で見つかる

【 図 5 】

[illegible]

【圖 7】

1 AAGCTTCGGCCACATGAGCATGAGGTGCCCGCTAGCTCTCGGGCTCTGCTGCTC
60 TTGGAACGGCGGTGGTACTGTACTGCCAGGGCGAGATGAGAGCACCCGAGGACGACGAG
M D M R V P A Q L L G L L L L L

61 TGGCTCCGAGTCCGCAATGTGAAGTTGTGTGAGCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCA
120 ACCGAGAGGTCACGTTTACACTTTAAACACTCTGCTGCAGAGTAGGAGACAGCAAGT
N L P G A K E I V L T Q S P S S L S A

121 TCTTAGGAGACAGGTACCACACTCTCAGTGCCAGCTCAAGTTAGTTACATGCAC
180 AGACATCTCTGTCTCAGTGGTAGTACGTCGGGTCCAGTTACATCAAGTAGCTGG
S V G D R V T I T C A R S S V S Y M H

181 TGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCGTAGTCTCTGAICTATAGACATCCAACTGT
240 ACCATATGCTGTTTGGTCCOCTTCGGGGATCGAGGACTAGATCTCTGTAGGTGGAC
W Y Q Q K P K G R A P K L L I Y R T S N L

241 GCTTCGGGTCGCCATAGACTAGACTCGCGGACGTGATCTGGGACAGATTTCACTCCAC
300 CGAAGCCCGAGGTAGATCTAAGTCGGCTCAGCTACCGCTCTAAAGTTGAGAGTGG
A S G V P S R F S G S G T D T T L T

301 ATCACAGCGCTCGACGCTGAAGATTTTGACRATCTACTATTGCCAGCAAGGATAGTTTC
360 TAGTTGTCGAGACTCGSACTCTTAAAGCTTGAAGTATACGGTCTTTCTCTCATCAAG
I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

361 CCATCACTGCTTGGCGGAGGACCAAGCTGAGAGTCAACAGCTGATGGATCC
420 GTGGAGCGAAGCGCTCTGTTGGTTCGACCTTAGTTTGCACTCACTAGG
P L T F G G G T K L E I K

FIGURE 7

【 図 6 】

[illegible]

【圖 8】

1 AAGCTTGGCGGCACATCGACATGAGGTTGCCCGCTCAGCTCTGGGGGCTCTGCTGCTC
60 TCGAAGCCGCGSTGGTACTCTGTATCCCAAGGGCGAGTCSAGGACCCCGAGGACACGAG
M D M R V P A Q L L G L L L L

61 TGCTCCAGAGTCCCAATATGAAATTGGTTGAGCGAGCTCTCATCTCCCTCGTCTGGA
120 ACGAGGCTCCACGGTTTACACTATTAAACACTGCTCGAGGTAGGAGGGACAGAGT
W L P G A K C S I V L T Q S F S S L S A

121 TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTCAGTGCAGAGTCAAGTGTAAATTACATGCAC
180 AGACATCTCTGTCTCAGTGTAGTGAAGCTCAGCTCCAGGTCAGATTCAATCAAGTACGTG
S V G D R V T I T C S A R S S V S Y M H

181 TGGTTCAGACAGAAACAGGGAAGGCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACTG
240 ACCAGAGTCGTCTTGGTCCCTTCTCGGGATTGAGACCTAGATATCTCTAGGTAGGAC
W F Q Q K P G K A P K L W I Y R T S N L

241 GCTTCTGGGGTCCCATCTAGATTACGCGGACGTGATCTGGGACAGATTACACTCTCACC
300 CAGACGCCAGGATGATCATAGTGCCTGCTCATACCTCTGTATCTGTAGAGTGG
A S G V P S R F S G S G S T G T D Y T L T

301 ATCAACGAGCTGCAGCCTGAGATTTCGCACTTACTATTGCCAGCAAGAGTAGTATTC
360 TAGTGTCCGAGCTCGGACTCTCAAAAGTTGAGAGATACAGCTCGTGTTCCTCATCAAG
I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

361 CCACTCAAGTTCGGCGAGGAGGACAGAGCTGGAGATCAAACTGTAGTGGATCC
412 GTGGTAGTCAAGCCGCTCCGTGTTCGACCTCTAGTTGGACTCAACTAGG
P L T F G G G T K L E I K

FIGURE 8

【図 9】

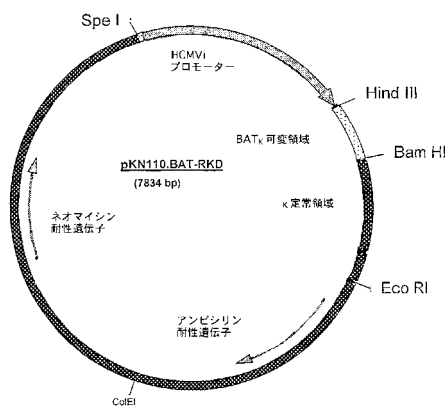
```

1  AAGCTTCCGCGCCACCATGGACATGAGGTCCCGCTCAGCTCTCGGGGCTCTGCTGCTC
   -----
   TTGGAACGCGGTGGTGGTACCTGTACTCCAGGGGCGAGTCGAGACCCGAGGACGACGAG
   M D N R V P A Q L L G L L L L
61  TGGCTCCAGGTGCCAAATGTGAATTGTGTGACGCGAGTCCATCCTCCTGTCTGCA
   -----
   ACGAGGGTCCACGGTTTACACTTTAACACAACTGCTCAGAGTAGGAGGACAGACGT
   W L P G A K C E I V L T Q S P S S L S A
121 TCTGTAGGACAGAGATCACCATCACTTGCAGTGCCAGGTCAAGTGAAGTTACATGCAC
   -----
   AGACATCCTCTGTCTCAGTGTAGTGAACGTCACGCTCAGTTCACATTCAATGTACGTG
   S V G D R V T I T C S A R S S V S Y N H
181 TGGTCCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTTAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACTG
   -----
   ACCAGGTCTCTCTTTGTCCTCTTTCGGGGATTCGAGACCTAGATATCCTGTAGGTTGAC
   W F Q Q K P G K A P K L W I Y R T S N L
241 GCTTCTGGGGTCCATCTAGATTACAGGCGCAGTGGATCTGGGACATCTTACTGTCTACC
   -----
   CGAAGACCCGAGGTAGATCTAAGTCGCGCTCACCTAGACCTGTAGAAATGACAGATGG
   A S G V P S R F S G S G S G T S Y C L T
301 ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCACCTACTATTGCCAGCAAGAGTAGTTTC
   -----
   TAGTTGTGCGAGCTCGGACTTCTAAACCTTGAATGATACGGGTCTTTCTCATCAAG
   I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F
361 CCACCTCAGTTTCGGCGAGGGACCAAGCTGGAGATCAACGCTGAGTGGATCC
   -----
   GGTGAGTGCAGACCGCTCCTCTGTTCCGACCTTAGTTTGCACCTACCTAGG
   P L T F G G G T K L E I K

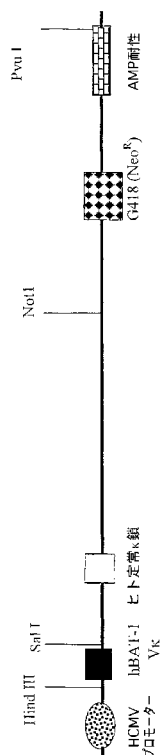
```

FIGURE 9

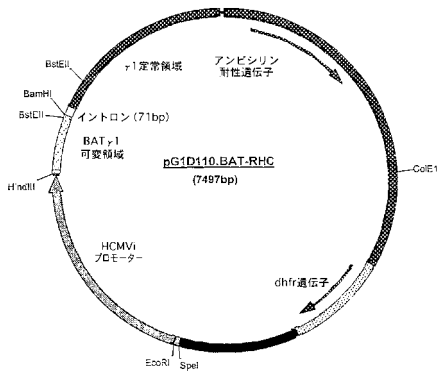
【図 10】



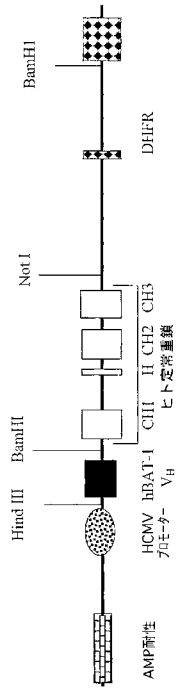
【図 11】



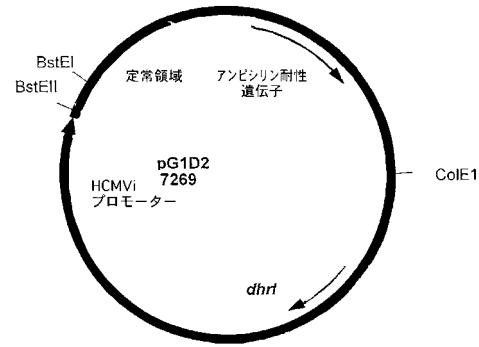
【図 15】



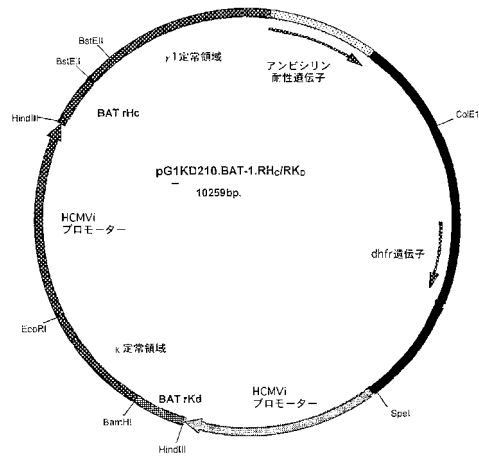
【図 16】



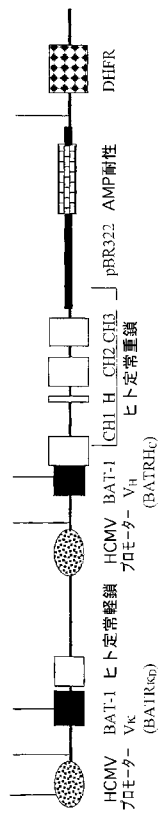
【図 17】



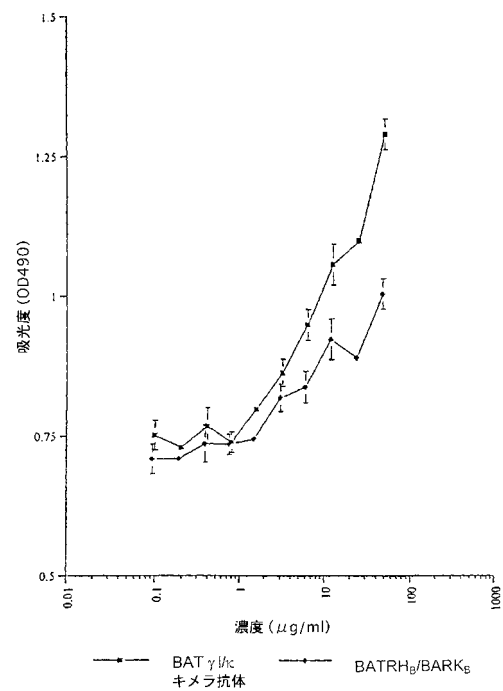
【図 18】



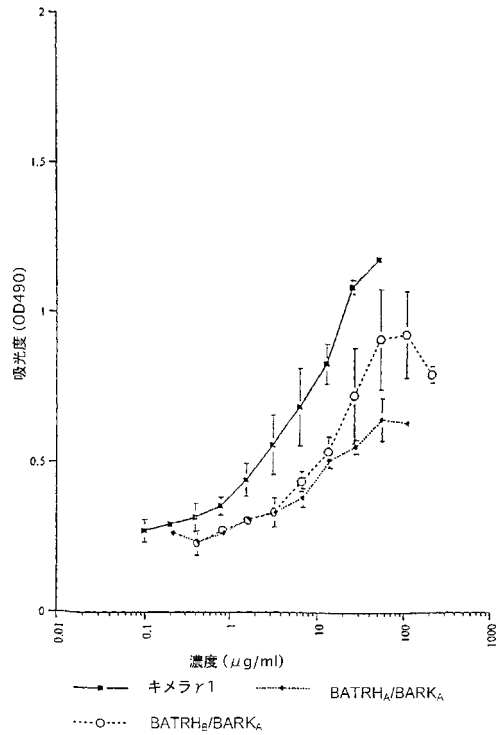
【図 19】



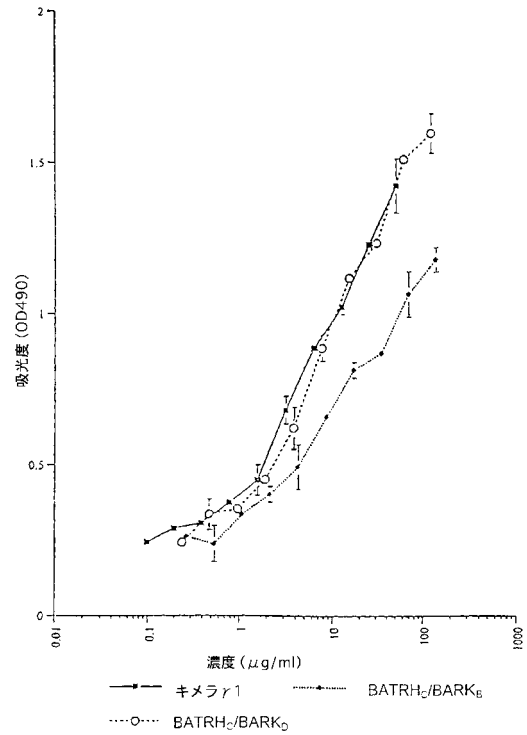
【図 20】



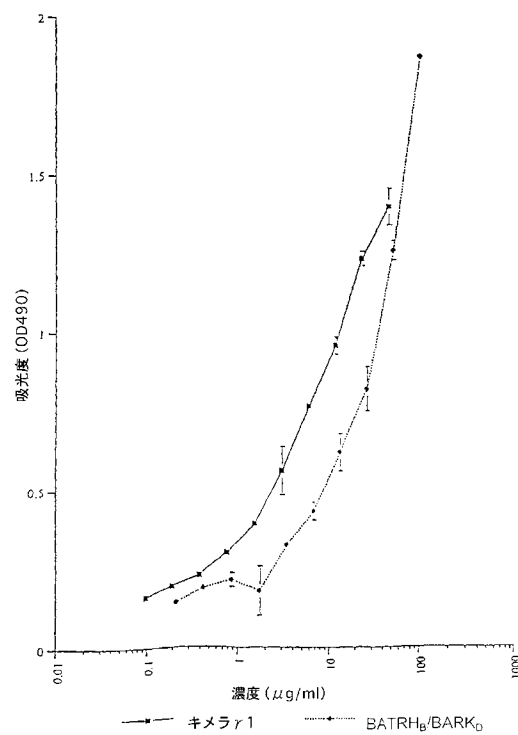
【図 2 1】



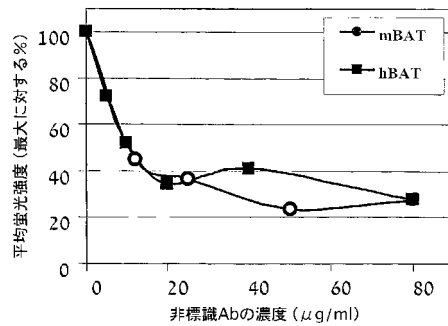
【図 2 2】



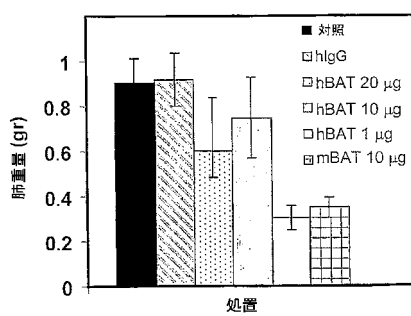
【図 2 3】



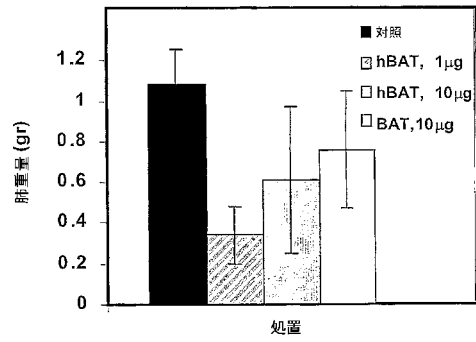
【図 2 4】



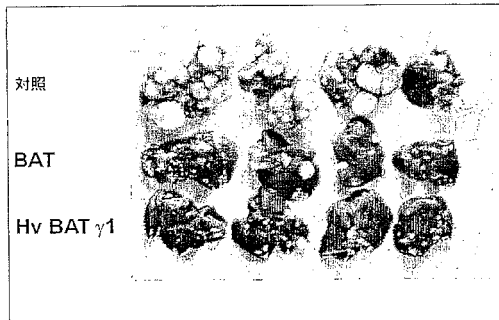
【図 2 5】



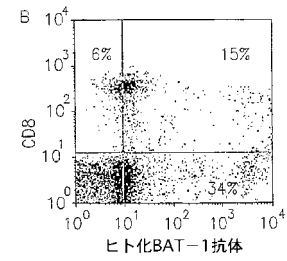
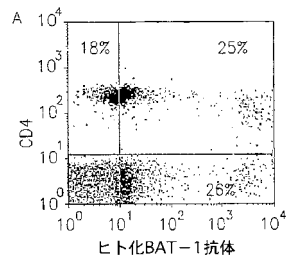
【図 26】



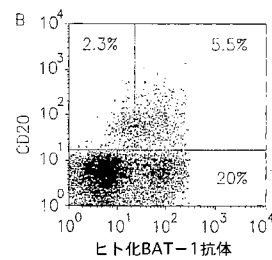
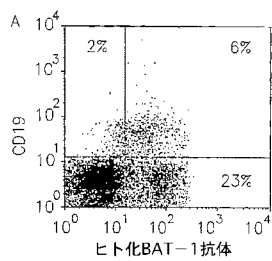
【図 27】



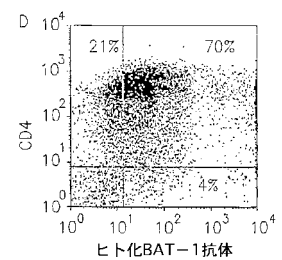
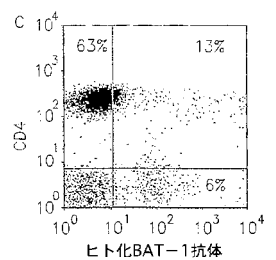
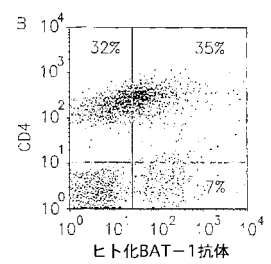
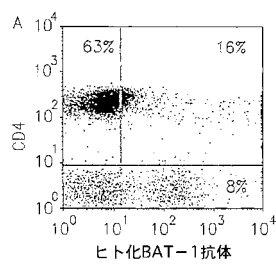
【図 28】



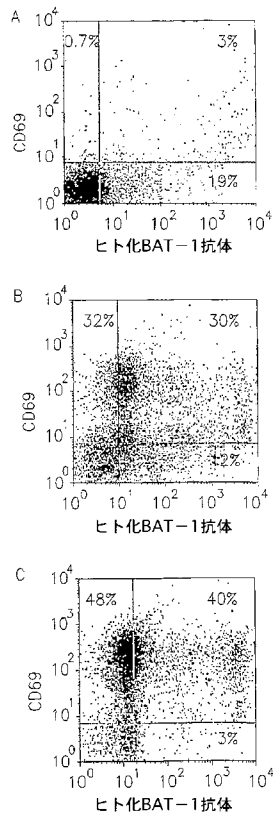
【図 29】



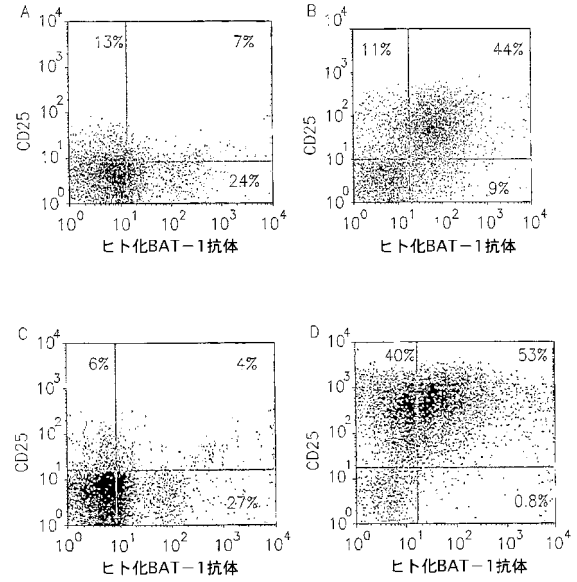
【図 30】



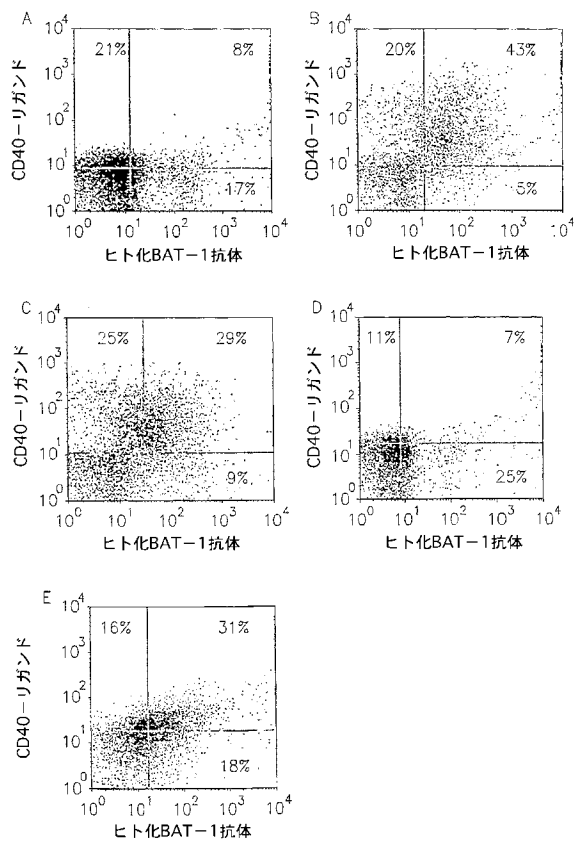
【図 3 1】



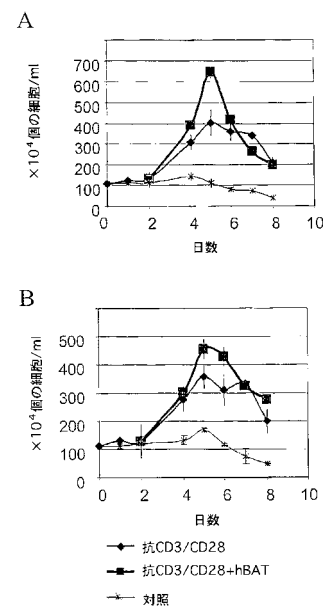
【図 3 2】



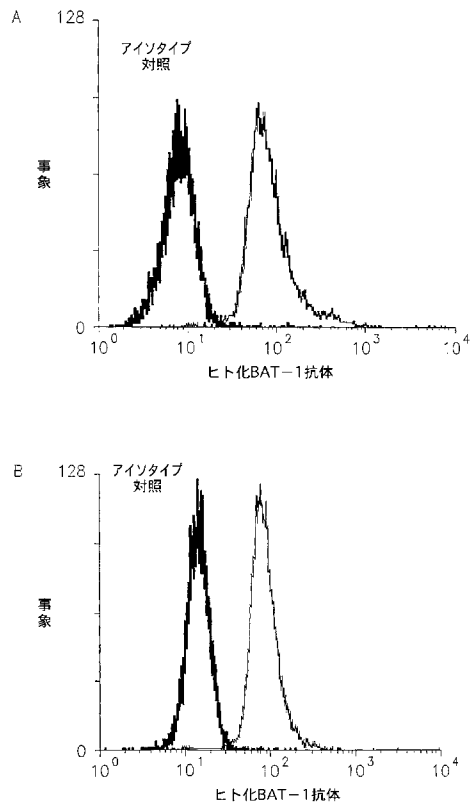
【図 3 3】



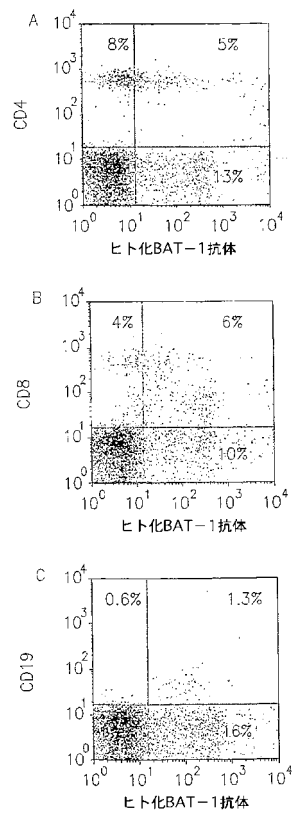
【図 3 4】



【図 35】



【図 36】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00		H
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395		T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1	
A 6 1 K 38/21 (2006.01)		A 6 1 K 37/66		G
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08		
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)		C 1 2 N 5/00	2 0 2 L	

(74)代理人 100163485

弁理士 渡邊 義敬

(74)代理人 100102897

弁理士 池田 幸弘

(72)発明者 ハーディ、ブリッタ

イスラエル国、テル アヴィヴ、エリアフ ハキム ストリート 6

(72)発明者 ジョーンズ、ステイーヴン、タラン

イギリス国、ハートフォードシア、ラドレット、 クリストチャーチ クレセント 1

(72)発明者 クラッペル、リーア

イスラエル国、ジヴァタイム、ベン - シオン ストリート 1 0

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 5 8 3 6 3 (WO, A 1)

特表平 0 9 - 5 0 8 3 9 0 (JP, A)

International Immunology, 2 0 0 0 年, Vol.12, No.11, pp.1623-1628

Cancer Res., 1 9 9 4 年, Vol.54, pp.5793-5796

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 7 年, Vol.94, pp.5756-5760

Immunology Letters, 1 9 9 9 年, Vol.69, pp.247-251

J. Immunol., 1 9 9 1 年, Vol.147, pp.1709-1719

Molecular Immunology, 1 9 9 1 年, Vol.28, No.4/5, pp.489-498

J. Mol. Biol., 1 9 9 2 年, Vol.224, pp.487-499

J. Exp. Med., 1 9 9 4 年, Vol.179, pp.1445-1456

J. Mol. Biol., 1 9 9 1 年, Vol.222, pp.581-597

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

C12N 15/00-15/90

JSTPlus(JDreamII)

PubMed

Science Direct

MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/CAPLUS(STN)