

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4804357号
(P4804357)

(45) 発行日 平成23年11月2日(2011.11.2)

(24) 登録日 平成23年8月19日(2011.8.19)

| | |
|--------------------------|---------------------|
| (51) Int.Cl. | F I |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01) | C 0 7 K 16/28 Z N A |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01) | C 1 2 P 21/02 C |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01) | A 6 1 P 35/02 |

請求項の数 15 (全 37 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2006-537487 (P2006-537487) | (73) 特許権者 | 307043050 |
| (86) (22) 出願日 | 平成16年10月29日(2004.10.29) | | メルク パテント ゲーエムペーハー |
| (65) 公表番号 | 特表2007-534304 (P2007-534304A) | | ドイツ連邦共和国 ダルムシュタット 6 |
| (43) 公表日 | 平成19年11月29日(2007.11.29) | | 4 2 9 3 フランクフルター ストラッセ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/IB2004/003879 | | 2 5 0 |
| (87) 国際公開番号 | W02005/042581 | (74) 代理人 | 100102978 |
| (87) 国際公開日 | 平成17年5月12日(2005.5.12) | | 弁理士 清水 初志 |
| 審査請求日 | 平成19年10月18日(2007.10.18) | (74) 代理人 | 100119507 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/516, 210 | | 弁理士 刑部 俊 |
| (32) 優先日 | 平成15年11月1日(2003.11.1) | (74) 代理人 | 100128048 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 新見 浩一 |
| 前置審査 | | (74) 代理人 | 100129506 |
| | | | 弁理士 小林 智彦 |
| | | (74) 代理人 | 100130845 |
| | | | 弁理士 渡邊 伸一 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変抗CD52抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号:4のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号:12のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、抗CD52抗体。

【請求項2】

重鎖がヒトIgG1定常領域ドメインをさらに含む、請求項1記載の抗体。

【請求項3】

軽鎖がヒト 定常領域ドメインをさらに含む、請求項1記載の抗体。

【請求項4】

重鎖がヒトIgG1定常領域ドメインをさらに含み、かつ軽鎖がヒト 定常領域ドメインをさらに含む、請求項1記載の抗体。 10

【請求項5】

請求項1~4のいずれか一項記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項6】

請求項5に記載の薬学的組成物を調製するための、請求項1~4のいずれか一項記載の抗体の有効量の使用。

【請求項7】

リンパ性悪性疾患を処置するための薬学的組成物を調製するための、請求項1~4のいずれか一項記載の抗体の有効量の使用。

【請求項 8】

リンパ性悪性疾患が白血病またはリンパ腫である、請求項 7 記載の使用。

【請求項 9】

抗体の重鎖が配列番号:4のアミノ酸配列およびヒトIgG1定常領域ドメインを含み、かつ抗体の軽鎖が配列番号:12のアミノ酸配列およびヒト定常領域ドメインを含む、請求項 7 または 8 記載の使用。

【請求項 10】

患者の自己免疫病態を処置するための薬学的組成物を調製するための、請求項1～4のいずれか一項記載の抗体の有効量の使用。

【請求項 11】

自己免疫病態が、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性血管炎、ブドウ膜炎、炎症性腸疾患、または強皮症である、請求項 10 記載の使用。

【請求項 12】

抗体の重鎖が配列番号:4のアミノ酸配列およびヒトIgG1定常領域ドメインを含み、かつ抗体の軽鎖が配列番号:12のアミノ酸配列およびヒト定常領域ドメインを含む、請求項 10 または 11 記載の使用。

【請求項 13】

臓器移植の前または後に患者の免疫反応を抑制するための薬学的組成物を調製するための、請求項1～4のいずれか一項記載の抗体の有効量の使用。

【請求項 14】

臓器移植が腎移植である、請求項 13 記載の使用。

【請求項 15】

抗体の重鎖が配列番号:4のアミノ酸配列およびヒトIgG1定常領域ドメインを含み、かつ抗体の軽鎖が配列番号:12のアミノ酸配列およびヒト定常領域ドメインを含む、請求項 13 または 14 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、特に治療用途のために特にヒトに対して投与するポリペプチドに関する。ポリペプチドは改変ポリペプチドであり、その改変によって潜在的T細胞エピトープの数が減少し、ヒト対象への投与に際してポリペプチドが免疫応答を誘発する傾向が低くなる。本発明は特に、CD52ヒト白血球抗原に反応する抗体の改変に関連し、潜在的T細胞エピトープの数が少ないがCD52に結合する能力を保持する抗CD52抗体を提供する。

【0002】

本出願は2003年11月1日に出願した米国特許仮出願第60/516,210号の優先権を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

治療タンパク質の有効性が治療タンパク質に対する望ましくない免疫反応によって制限される例が多数存在する。いくつかのマウスモノクローナル抗体は、多くのヒト疾患設定における治療法として見込みを示しているが、場合によってはヒト抗マウス抗体(HAMA)応答をかなりの程度誘導することが原因で失敗に終わっている [Schroff et al. (1985) Cancer Res. 45: 879-885; Shawler et al. (1985) J. Immunol. 135: 1530-1535]。モノクローナル抗体に関しては、HAMA応答を低減させる試みにおいて多くの技術が開発されてきた [WOA第8909622号; EPA第0239400号; EPA第0438310号; WOA第9106667号; EPA0699755号]。これらの組換えDNAアプローチでは一般に、最終抗体構築物中のヒトの遺伝情報を増加させつつ、最終構築物中のマウスの遺伝情報を低減させていた。それにもかかわらずいくつかの例では、得られた「ヒト化」抗体は患者の免疫応答をなお誘発した [Issacs

10

20

30

40

50

J.D. (1990) *Sem. Immunol.* 2: 449, 456 ; Rebello et al. (1999) *Transplantation* 68 : 1417-1420]。

【 0 0 0 4 】

免疫応答を開始し得る、治療薬として投与されるポリペプチド分子の種類は抗体だけではない。ヒト起源でありヒトに存在するのと同じアミノ酸配列を有するタンパク質でさえも、なおヒトにおいて免疫応答を誘導し得る。注目すべき例として、特に顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 [Wadhwa et al., (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 1353-1361] およびインターフェロン 2 [Russo et al. (1996) *Br. J. Haem.* 94: 300-305 ; Stein et al. (1988) *New Engl. J. Med.* 318: 1409-1413] の治療上の使用が挙げられる。

【 0 0 0 5 】

免疫応答の誘導の鍵は、MHCクラスII分子上での提示を介してT細胞の活性を促進し得るペプチド、いわゆる「T細胞エピトープ」のタンパク質における存在である。そのような細胞エピトープは一般に、MHCクラスII分子に結合する能力を有する任意のアミノ酸残基配列と定義される。「T細胞エピトープ」とは暗黙のうちに、MHC分子に結合した場合にT細胞受容体 (TCR) によって認識され得り、少なくとも原理上はTCRにT細胞応答を促進させることでこれらのT細胞の活性化を引き起こし得るエピトープを意味する。

【 0 0 0 6 】

MHCクラスII分子は、ヘルパーT細胞の選択および活性化において中心的役割を担う、高度な多型を示すタンパク質群である。ヒト白血球抗原群DR (HLA-DR) はこの群のタンパク質の主要なアイソタイプであるが、アイソタイプHLA-DQおよびHLA-DPも同様の機能を担う。ヒト集団において、個体は2つ~4つのDR対立遺伝子、2つのDQ対立遺伝子、および2つのDP対立遺伝子を有する。多くのDR分子の構造が解明されており、これらはペプチドの疎水性残基 (ポケット残基) がはまり込む多くの疎水性ポケットを有する開口したペプチド結合溝のように見える [Brown et al., *Nature* (1993) 364: 33 ; Stern et al. (1994) *Nature* 368: 215]。クラスII分子の異なるアロタイプを特定する多型は、ペプチド結合溝におけるペプチドに対する異なる結合表面の幅広い多様性に寄与し、集団レベルにおいては、外来性タンパク質を認識し、病原体に対する免疫応答を開始する能力に関して最大限の柔軟性を保証する。

【 0 0 0 7 】

治療タンパク質に対する免疫応答は、MHCクラスIIペプチド提示経路を介して進行する。ここで、外因性タンパク質は貪食され、プロセッシングを受けて、DR、DQ、またはDP型のMHCクラスII分子と結合して提示される。MHCクラスII分子は、特にマクロファージおよび樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC) によって提示される。T細胞表面上の同種T細胞受容体がMHCクラスIIペプチド複合体と結合し、さらにCD4分子などの特定の他の補助受容体が交差結合することで、T細胞の活性化状態が誘導され得る。活性化により、抗体を産生するためのB細胞または十分な細胞性免疫応答としての活性化キラーT細胞などの他のリンパ球をさらに活性化するサイトカインが放出される。

【 0 0 0 8 】

WO第98/52976号およびWO第00/34317号で認められているように、T細胞エピトープの同定がエピトープ除去の第一段階である。これらの技法では、関心対象のタンパク質内の賢明なアミノ酸置換の使用により、予測されるT細胞エピトープが除去される。コンピュータを利用した技法に加えて、合成ペプチドがMHCクラスII分子に結合する能力を測定するインビトロ法が存在する。例示的な方法では、MHCクラスII結合表面の供給源として明確なMHCアロタイプのB細胞株を使用し、この方法はMHCクラスIIリガンド同定に適用することができる [Marshall et al. (1994) *J. Immunol.* 152:4946-4956 ; O'Sullivan et al. (1990) *J. Immunol.* 145: 1799-1808 ; Robadey et al. (1997) *J. Immunol* 159: 3238-3246]。しかしこのような技法は、多様なMHCアロタイプに対して複数の潜在的エピトープをスクリーニングするのに適しておらず、また結合ペプチドがT細胞エピトープとして機能する能力を確認することができない。

【 0 0 0 9 】

10

20

30

40

50

最近になって、組換えMHC分子と合成ペプチドの可溶性複合体を利用する技法が使用されるようになった [Kern et al. (1998) *Nature Medicine* 4:975-978 ; Kwok et al. (2001) *TRENDS in Immunol.* 22:583-588]。これらの試薬および手順は、ヒトまたは実験動物対象の末梢血試料から、特定のMHC-ペプチド複合体に結合し得るT細胞クローンの存在を同定するために使用されるが、多様なMHCアロタイプに対して複数の潜在的エピトープをスクリーニングするには適していない。

【 0 0 1 0 】

上記の通りおよびその重要性から、基本的に治療上価値があるがもともと免疫原性を示す所与のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質から潜在的T細胞エピトープを同定し、これを除去するかまたは少なくとも減じることが望ましいと考えられる。治療上価値のあるこれらの分子の1つは、CD52ヒト白血球抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。本発明の好ましいモノクローナル抗体は、「CAMPATH」と称するラット抗体の改変型である。1つまたは複数の潜在的T細胞エピトープが除去された改変型のCAMPATH抗体を提供することが本発明の目的である。

【 0 0 1 1 】

CD52分子は分子量21~28 kDaを有し、その成熟タンパク質はグリコホスファチジルイノシトールアンカーにより膜に結合しているN結合オリゴ糖を有する12アミノ酸ペプチドを含む。この抗原はヒト末梢血リンパ球の少なくとも95%上に存在し、また精子に加えて単球/マクロファージ系の細胞上にも存在する。この抗原は、赤血球、血小板、組織樹状細胞、および骨髄幹細胞上には存在しない (Hale et al. (1990) *Tissue Antigens* 35: 873 ; Buggins et al. (2002) *Blood*. 100:1715)。

【 0 0 1 2 】

最初のCD52抗体は、移植前にドナー骨髄からT細胞を除去するために使用する、補体を活性化する抗体を得る目的で、ヒトリンパ球で免疫化したラットで産生された [Hale et al. (1983) *Blood* 62: 873-882]。溶解性抗体の大部分は抗CD52 IgM抗体であった。CD52 IgM (CAMPATH-1M) が媒介する補体活性化はエキスピボではT細胞の除去に有用であったが、インピボでは有効ではなかった。IgG2a抗体クローンからアイソタイプスイッチにより得られたラットIgG2bモノクローナル抗体、CAMPATH-1Gは、ヒトFc受容体と結合し、細胞死抗体依存性細胞障害 (cell death antibody-mediated cellular toxicity: ADCCD) を媒介し、インピボにおいて細胞の除去に有効である [Friend et al. (1991) *Transplant. Proc.* 23: 2253-2254 ; Hale et al. (1998) *Blood* 92: 4581-4590]。しかし、CAMPATH-1Gの使用は、患者において誘発される免疫応答により制限される [Cobbold, J.S. (1990) *J. Immunol. Methods* 127: 19-24 ; Dyer, M.J.S. (1989) *Blood* 73: 1431-1439]。免疫原性を減じるため、Kabat超可変領域をヒトNEWおよびRei骨髄腫タンパク質から提供されるフレームワークにクローニングして、ヒト化IgG1抗体、CAMPATH-1Hが作製された [Richmann et al., (1988) *Nature* 332: 323-327]。ヒト化抗体はCAMPATH-1Gと比較して免疫原性は低下したものの、患者によってはなお免疫応答を誘発する。関節リウマチの処置の初期の報告によれば、初回の静脈内投与により処置した8名の患者では抗グロブリン応答は報告されなかったが、2回目のCAMPATH-1Hを受けた患者4名のうち3名が抗グロブリン抗体を生じた (Issacs et al. (1992) *Lancet*, 21:1103-06)。関節リウマチ患者での次の単回投与による静脈内投与の段階的増大試験では、対象の63%が抗グロブリン応答を起こし、これは主に抗イディオタイプ応答であった [Weinblatt et al. (1995) *Arthritis. Rheum.* 38: 1589-1594]。抗グロブリン応答はまた、CAMPATH-1Hの段階的に増大させた用量を皮下投与した10名の関節リウマチ患者の全員で報告された (Schnitzer et al., *J. Rheumatol.* (1997) 24:1031-36)。

【 0 0 1 3 】

したがって、潜在的T細胞エピトープの数が少なく、ヒト対象において免疫応答を誘導する可能性が低くなり得るかまたはなくなり得る抗CD52抗体を提供することが望ましい。そのようなタンパク質は、未改変抗体に対して免疫応答を開始し得るヒト対象において循環時間が延長することが期待され、CAMPATHの多くの適応症で見られるような慢性疾患ま

10

20

30

40

50

たは再発性疾患設定において特に有用となり得る。したがって本発明は、潜在的T細胞エピトープの数が少なく、低免疫原性を示すと考えられるが、親の未改変抗体の有効性を伴う有用な治療特性を実質的に保持する改変型の抗CD52抗体を提供する。

【0014】

本発明は、MHCクラスII結合能に基づいて潜在的T細胞エピトープである、抗CD52抗体の重鎖および軽鎖の可変領域配列内に同定される配列を開示する。

【0015】

他の研究者も「ヒト化」型を含め抗CD52抗体分子を提供しているが[米国特許第5,846,543号；第6,120,766号；第6,569,430号；WO第0230460号]、これらのどの教示もタンパク質の免疫原性特性に対するT細胞エピトープの重要性を認識しておらず、また本発明の構
10
想による特定のかつ管理された方法でそのような特性に直接影響を及ぼすことに着想して
いない。

【発明の開示】

【0016】

発明の概要および説明

本発明は、潜在的T細胞エピトープの数を減少させて免疫特性を改変した改変抗体を提供する。MHCクラスII結合能に基づいて潜在的T細胞エピトープである、重鎖および軽鎖の
20
CAMPATH-1G可変領域配列内に同定される配列を開示する。本発明は、ヒトにおいて免疫原性を示し得る抗体V領域配列内の主要な領域、およびこれらの部位の潜在的免疫原性効果を除去するかまたは低減させるための改変配列を開示する。

【0017】

1つの局面において、本発明は、ラット抗体CAMPATH-1Gが認識するCD52抗原に対する特異性を有し、CAMPATH-1G抗体の可変領域内の1つまたは複数のアミノ酸が置換されてこの領域に由来するペプチドのMHCクラスII認識が低下した改変抗体分子を提供する。本発明の改変抗体に適用する場合に、「抗CD52抗体」および「CAMPATH抗体」という用語において暗に意味するのは、そのような改変抗体がCD52に結合する能力を保持する能力である。本発明の態様は、表1に記載した置換の1つまたは複数を有する配列番号:1の置換変種を含む重鎖V領域を含み(アミノ酸残基の番号づけは配列番号:1のものと一致する)、かつ表2
30
に記載した置換の1つまたは複数を有する配列番号:2の置換変種を含む軽鎖V領域を含む(アミノ酸残基の番号づけは配列番号:1のものと一致する)抗CD52抗体を包含する。いくつかの態様において、抗CD52抗体重鎖はヒトIgG1定常領域ドメインをさらに含み、軽鎖はヒト定常領域ドメインをさらに含む。

【0018】

(表1) CAMPATH-1G可変重鎖内の潜在的T細胞エピトープにおける置換(配列番号:1)

| VH 残基 番号 | WT 残基 | 置换 |
|----------------|----------|-----------------------------------|
| 3 | K | Q |
| 5 | L | A C B Z G H K P R S T |
| 12 | V | B E H K P Q R S T |
| 13 | Q | A F H K N P Q R S T |
| 15 | G | D H P Q R S T |
| 17 | S | G M P W |
| 18 | M | A G P L |
| 19 | R | A C F G I L M P V W Y |
| 20 | L | A C F G H I K B M Z P R S T V W Y |
| 21 | S | P |
| 23 | A | B Z G H K P R S T |
| 25 | S | F G L P W Y |
| 26 | G | B Z H K P R S T W Y |
| 31 | D | A F G I M P V W Y |
| 33 | Y | A G M P |
| 35 | N | P |
| 36 | W | A D E G H K N P Q R S T |
| 37 | I | V |
| 38 | R | F H P Y |
| 40 | P | A |
| 41 | A | B Z H K P R S T W |
| 42 | G | I P T Y |
| 44 | A | G H N P Q S T W Y |
| 45 | P | L |
| 48 | L | V I |
| 71 | T | F L P W Y |
| 72 | I | D E H K N P Q R S T |
| 73 | S | A G P |
| 74 | R | A F G I M P W Y |
| 76 | N | A G M P W Y |
| 77 | T | A H I P S |
| 78 | Q | K |
| 79 | N | A F G I M P V W Y |
| 80 | M | A D E G H K N P Q R T S |
| 82 | Y | A D E G H K N P Q R S T |
| 84 | Q | A F G I L M P V W Y |
| 85 | M | A D E G H K N P Q R S T |
| 87 | T | S |
| 88 | L | D E G H K N P Q R S T |
| 89 | R | F P W Y |
| 90 | A | B Z H K P R S T W Y |
| 91 | E | P |

10

20

30

40

| | | |
|-----|---|-------------------------|
| 92 | D | A F G I L M P V W Y |
| 95 | T | V |
| 109 | D | A F G I L M P V W Y |
| 111 | W | A D E G H K N P Q R S T |
| 114 | G | H P S T |
| 115 | V | T |
| 116 | M | L F I P T V W Y |
| 117 | V | A F G I M P W Y |

【 0 0 1 9 】

10

(表2) CAMPATH-1G軽鎖内の潜在的T細胞エピトープにおける置換(配列番号:2)

| VK 残基 番号 | WT 残基 | 置換 |
|----------------|----------|-----------------------|
| 3 | K | Q |
| 10 | F | A B Z G H K P R S T |
| 15 | V | A G H P |
| 17 | D | P |
| 19 | V | P W |
| 21 | L | P I |
| 22 | N | T |
| 24 | K | R |
| 33 | L | A B Z G H K P R S T |
| 40 | L | B Z G H K P R S T |
| 42 | E | K |
| 43 | S | A |
| 46 | L | S |
| 56 | T | A F G I M P S W Y |
| 58 | I | A G M P V |
| 60 | S | A F G I M P W Y |
| 61 | R | P |
| 63 | S | F L P W Y |
| 64 | G | B Z H K P R S T |
| 78 | L | B Z G H K P R S T |
| 83 | V | A B Z G H I K P R S T |
| 87 | F | Y |

20

30

【 0 0 2 0 】

種々の態様において、3個以上のアミノ酸置換、または4個以上のアミノ酸置換、または5個以上のアミノ酸置換、または6個以上のアミノ酸置換、または7個以上のアミノ酸置換、または8個以上のアミノ酸、または9個以上、または10個以上、または11個以上、または12個以上、または13個以上の置換が、重鎖および/または軽鎖においてなされる。いくつかの態様においては、5~20個または7~14個のアミノ酸置換が重鎖および/または軽鎖においてなされる。

40

【 0 0 2 1 】

いくつかの態様において、抗CD52抗体は、以下の置換の1つまたは複数を含む配列番号:1の置換変種を含むV領域重鎖を含み(アミノ酸残基の番号づけは配列番号:1のものと一致する):

アミノ酸残基3位のLysのGlnによる置換;

アミノ酸残基5位のLeuのAla、Cys、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Pro、Arg、S

50

er、またはThrによる置換；

アミノ酸残基18位のMetのArg、Gly、Pro、Leuによる置換；

アミノ酸残基20位のLeuのAla、Cys、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Asn、Asp、Met、Gln、Glu、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrによる置換；

アミノ酸残基23位のAlaのAsp、Asn、Glu、Gln、Gly、His、Lys、Pro、Arg、Ser、Thrによる置換；

アミノ酸残基37位のIleのValによる置換；

アミノ酸残基40位のProのAlaによる置換；

アミノ酸残基41位のAlaのProによる置換；

アミノ酸残基44位のAlaのGly、His、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Trp、Tyrによる置換； 10

アミノ酸残基45位のProのLeuによる置換；

アミノ酸残基48位のLeuのIleまたはValによる置換；

アミノ酸残基77位のThrのAla、His、Ile、Pro、またはSerによる置換；

アミノ酸残基78位のGlnのLysによる置換；

アミノ酸残基80位のMetのAla、Asp、Glu、Gly、His、Lys、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、またはSerによる置換；

アミノ酸残基82位のTyrのAla、Asp、Glu、Gly、His、Lys、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、またはThrによる置換；

アミノ酸残基85位のMetのAla、Asp、Glu、Gly、His、Lys、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、またはThrによる置換； 20

アミノ酸残基87位のThrのSerによる置換；

アミノ酸残基95位のThrのValによる置換；

アミノ酸残基115位のValのThrによる置換；

アミノ酸残基116位のMetのThr、Phe、Ile、Leu、Pro、Val、Trp、またはTyrによる置換

；

かつ以下の置換の1つまたは複数を有する配列番号:2の置換変種を含むV領域軽鎖を含む（アミノ酸残基の番号づけは配列番号:2のものと一致する）：

アミノ酸残基3位のLysのGlnによる置換；

アミノ酸残基10位のPheのAla、Asp、Asn、Glu、Gln、Gly、His、Lys、Pro、Arg、Ser、またはThrによる置換； 30

アミノ酸残基21位のLeuのProまたはIleによる置換；

アミノ酸残基22位のAsnのThrによる置換；

アミノ酸残基24位のLysのArgによる置換；

アミノ酸残基40位のLeuのAsp、Asn、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Pro、Arg、Ser、またはThrによる置換；

アミノ酸残基42位のGluのLysによる置換；

アミノ酸残基43位のSerのAlaによる置換；

アミノ酸残基46位のLeuのSerによる置換；

アミノ酸残基56位のThrのAla、Phe、Gly、Ile、Met、Pro、Ser、Trp、またはTyrによる置換； 40

アミノ酸残基58位のIleのAla、Gly、Met、Pro、またはValによる置換；

アミノ酸残基83位のValのAla、Asp、Asn、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Lys、Pro、Arg、Ser、Thrによる置換；および

アミノ酸残基87位のPheのTyrによる置換。

【0022】

本発明のいくつかの態様において、抗CD52抗体は、以下の置換の1つまたは複数を有する配列番号:1の置換変種を含むV領域重鎖を含み（アミノ酸残基の番号づけは配列番号:1のものと一致する）：

アミノ酸残基3位のLysのGlnによる置換；

アミノ酸残基5位のLeuのGlnによる置換； 50

- アミノ酸残基18位のMetのLeuによる置換；
 アミノ酸残基20位のLeuのIleによる置換；
 アミノ酸残基23位のAlaのSerによる置換；
 アミノ酸残基37位のIleのValによる置換；
 アミノ酸残基40位のProのAlaによる置換；
 アミノ酸残基41位のAlaのProによる置換；
 アミノ酸残基44位のAlaのGlyによる置換；
 アミノ酸残基45位のProのLeuによる置換；
 アミノ酸残基48位のLeuのIleまたはValによる置換；
 アミノ酸残基77位のThrのAlaまたはSerによる置換；
 アミノ酸残基78位のGlnのLysによる置換；
 アミノ酸残基80位のMetのThrまたはSerによる置換；
 アミノ酸残基82位のTyrのHisによる置換；
 アミノ酸残基85位のMetのAlaによる置換；
 アミノ酸残基87位のThrのSerによる置換；
 アミノ酸残基95位のThrのValによる置換；
 アミノ酸残基115位のValのThrによる置換；
 アミノ酸残基116位のMetのLeuによる置換；
 かつ以下の置換の1つまたは複数を有する配列番号:2の置換変種を含むV領域軽鎖を含む（
 アミノ酸残基の番号づけは配列番号:2のものと一致する）：
- アミノ酸残基3位のLysのGlnによる置換；
 アミノ酸残基10位のPheのSerによる置換；
 アミノ酸残基21位のLeuのIleによる置換；
 アミノ酸残基22位のAsnのThrによる置換；
 アミノ酸残基24位のLysのArgによる置換；
 アミノ酸残基40位のLeuのProによる置換；
 アミノ酸残基42位のGluのLysによる置換；
 アミノ酸残基43位のSerのAlaによる置換；
 アミノ酸残基46位のLeuのSerによる置換；
 アミノ酸残基56位のThrのSerによる置換；
 アミノ酸残基58位のIleのValによる置換；
 アミノ酸残基83位のValのIleによる置換；
 アミノ酸残基87位のPheのTyrによる置換。
- 【0023】
- 本発明のさらなる局面では、配列番号:3～配列番号:7または配列番号:13～配列番号:40から選択される配列を含む重鎖V領域、および配列番号:8～配列番号:12または配列番号41～配列番号:70から選択される配列を含む軽鎖V領域の組み合わせを含む、潜在的T細胞エピトープの数を減じた変種モノクローナル抗体を提供する。いくつかの好ましい態様において、本発明は、配列番号:3～配列番号:7から選択される配列を含む重鎖V領域、および配列番号:8～配列番号:12から選択される配列を含む軽鎖V領域の組み合わせを含む、潜在的T細胞エピトープの数を減じた変種モノクローナル抗体を提供する。いくつかの態様において、抗CD52抗体はヒトIgG1定常領域ドメインおよびヒト 定常領域ドメインをさらに含む。さらなる態様において、ヒトIgG1定常領域およびヒト 定常領域を含む抗CD52抗体は、配列番号:4を含む重鎖V領域および配列番号:12を含む軽鎖V領域、または配列番号:7を含む重鎖V領域および配列番号:12を含む軽鎖V領域、または配列番号:7を含む重鎖V領域および配列番号:10を含む軽鎖V領域、または配列番号:3を含む重鎖V領域および配列番号:10を含む軽鎖V領域、または配列番号:6を含む重鎖V領域および配列番号:10を含む軽鎖V領域を含む。
- 【0024】
- 本発明はまた、アミノ酸残基の変化が特定の位置における本来存在するアミノ酸残基の

10

20

30

40

50

他のアミノ酸残基による置換、付加、または欠失である特定の分子；必要に応じて、一般に特定のアミノ酸の置換、付加、または欠失によるさらなる変化がそのような分子の生物活性を回復するように行われた特定の分子；以下のような配列(A)～(S)（これらの配列はこの分子のCAMPATH-1G抗体V領域配列ドメインに由来し、一文字コードを使用している）の一連の連続した残基のいずれかまたはすべてに由来する1つまたは複数の残基において変化が行われた特定の分子を包含する；

A. = KLL ESGGGLVQPG;

B. = GLVQPGGSMRLSC;

C. = GSMRLSCAGSGFT;

D. = DFYMNWIRQPAGK;

E. = MNWIRQPAGKAPE;

F. = FTISRDN TQNMLY;

G. = QNMLYLQMNTLRA;

H. = MLYLQMNTLRAED;

I. = LQMNTLRAEDTAT;

J. = NTLRAEDTATYYC;

K. = DYWGQGVMTVSS;

L. = PSFLSASVGDRVT;

M. = ASVGDRVTLNCKA;

N. = DRVTLNCKASQNI;

O. = KYLNWYQQKLGES;

P. = QKLGESPKLLIYN;

Q. = TGIPSRFSGSGSG;

R. = SSLQPEDVATYFC;

S. = EDVATYFCLQHIS.

10

20

30

【 0 0 2 5 】

本発明の1つの局面は、潜在的T細胞エピトープの数を減じるように改変され、かつCD52に結合する能力を有する改変CAMPATH-1G分子を含む薬学的組成物であり、このような組成物は薬学的に許容される担体を含む。

【 0 0 2 6 】

本発明の別の局面は、本発明の改変重鎖または改変軽鎖をコードする核酸配列を含む発現ベクターである。いくつかの態様において、発現ベクターは、発現制御配列に機能的に連結された、潜在的T細胞エピトープの数を減じた配列番号:1の改変置換変種を含むV領域重鎖をコードする核酸配列を含む。種々の態様において、発現ベクターは、配列番号:71～配列番号:75および配列番号:81～配列番号:108からなる群より選択される核酸配列、またはその縮重変種を含む。ポリヌクレオチドに関する縮重とは、遺伝暗号において多くのアミノ酸は2つ以上のコドンによって規定されるという当技術分野において十分に認識されている事実を指す。この暗号の縮重は、20の異なるアミノ酸が4つの異なる塩基の64の可能なトリプレット配列によってコードされることの説明となる。いくつかの態様において、発現ベクターは、発現制御配列に機能的に連結された、潜在的T細胞エピトープの数を減じた配列番号:2の改変置換変種を含むV領域軽鎖をコードする核酸配列を含む。種々の態様において、発現ベクターは、配列番号:76～配列番号:80および配列番号:109～配列

40

50

番号:138からなる群より選択される核酸配列、またはその縮重変種を含む。本発明の重鎖の適切な発現ベクターの例を図1に示し、本発明の軽鎖の適切な発現ベクターの例を図2に示す。本発明の別の局面は、上記のベクターの1つまたは複数を含む培養細胞である、本発明のさらなる局面は、適切な発現制御配列の制御下において発現を可能にする条件下で上記の細胞を培養する段階、および細胞培養液から免疫グロブリンを精製する段階を含む、免疫グロブリンを調製する方法である。

【0027】

本発明の他の局面は、治療処置の方法である。態様は、本発明の改変抗体の有効量を患者に投与する段階を含む、リンパ性悪性疾患を処置する方法を包含する。いくつかの態様において、リンパ性悪性疾患は白血病またはリンパ腫である。他の態様は、本発明の改変抗体の有効量を投与する段階を含む、患者の自己免疫病態を処置する方法を含む。種々の態様において、自己免疫病態は、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性血管炎、ブドウ膜炎、炎症性腸疾患、または強皮症である。

10

【0028】

態様はまた、本発明の抗体の有効量を患者に投与する段階を含む、臓器移植の前または後に患者の免疫反応を抑制する方法を含む。いくつかの態様において、臓器移植は腎移植である。

【0029】

「実質的に非免疫原性」または「免疫原性の低下」への言及は、親抗体、すなわち未改変の齧歯動物もしくはキメラ（齧歯動物V領域；ヒト定常領域）モノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体CAMPATH-1Hと比較した場合の免疫原性の低下を含む。「免疫原性」という用語は、宿主動物において、特に「宿主動物」がヒトである場合に、体液性およびもしくはT細胞媒介性応答を誘発する、誘導する、もしくは別の方法で促進する能力、または適切なインビトロアッセイ法、例えば本明細書に記載する樹状細胞/T細胞アッセイ法において応答を誘発する能力を含む。

20

【0030】

本発明の改変抗体の好ましい特徴は、未改変もしくは「親」抗体CAMPATH-1Gまたはヒト化抗体CAMPATH-1Hの機能活性を実質的に保持することである。したがって本発明の態様は、CAMPATH-1Hまたは親の未改変抗体の治療有効性に付随する有益な技術的特徴の1つまたは複数が見られる改変抗体を包含する。そのような改変抗体は、特に白血病およびリンパ腫などのリンパ性悪性疾患、これらに限定されるわけではないが多発性硬化症、関節リウマチ、全身性血管炎、ブドウ膜炎、炎症性腸疾患、および強皮症を含む自己免疫病態を含むヒトの多くの重大な疾患において、さらに移植での使用に有用である。

30

【0031】

したがって、本発明の改変抗体はCD52に結合する能力を示し、好ましい態様において、その標的抗原CD52に対する親和性は、モノクローナル抗体CAMPATH-1Hの示す親和性の1オーダー分の範囲内で高いまたは低い。

【0032】

親分子の治療有効性はまた、抗体が抗体依存性細胞障害（ADCC）および補体依存性細胞障害（CDC）を誘導する能力により媒介されると考えらる。ADCCおよびCDCの現象は全抗体分子の重鎖定常領域ドメインによって媒介され、よって本発明はADCCおよびCDCの誘導と適合する定常領域ドメインを含む全抗体分子の産生を意図する。好ましい態様において、改変抗体はヒトIgG1定常領域およびヒト定常領域ドメインを含む。

40

【0033】

「抗体」とは、抗原と結合し得る、相互作用し得る、または別の方法で会合し得る免疫グロブリンファミリーのタンパク質を意味する。本明細書において「抗原」という用語は、抗体と相互作用し得る物質を指すために用いられ、本明細書ではCD52を意味する。

【0034】

本明細書において「免疫グロブリン」という用語は、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされる1つまたは複数のポリペプチドからなるタンパク質を指すために用い

50

られる。認識されている免疫グロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 μ 、 δ （IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、 α 、 β 、および μ 定常領域遺伝子、ならびに事実上複数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。免疫グロブリンの1つの天然形態は同一の対を2つ含む四量体であり、各対は一本の軽鎖および一本の重鎖を有する。各対において、重鎖および軽鎖の可変領域は共に抗原と相互作用し得る結合表面を提供する。本明細書においてVhという用語は重鎖可変領域を指すために用いられ、本明細書においてVkという用語は軽鎖可変領域を指すために用いられ、この場合多くのモノクローナル抗体に共通して軽鎖は「 κ 」（k）型の鎖である。

【0035】

本明細書で使用するVhとは、その配列がVkとの組み合わせでCD52抗原と結合し得る特定のVh鎖のいずれかに相当する、約110~125アミノ酸残基長のポリペプチドを意味する。同様にVkとは、その配列がVhとの組み合わせでCD52抗原と結合し得る特定のVk鎖のいずれかに相当する、約95~130アミノ酸残基長のポリペプチドを意味する。全長免疫グロブリン重鎖は分子量約50kDaであり、N末端はVh遺伝子によってコードされ、C末端は定常領域遺伝子（例えば μ ）の1つによってコードされる。同様に、全長免疫グロブリン軽鎖は分子量約25kDaであり、N末端はV領域遺伝子によってコードされ、C末端は κ または λ 定常領域遺伝子によってコードされる。

【0036】

免疫グロブリンは、完全な抗体（四量体）に加えて、組換えDNA技法またはタンパク質生化学を応用することによって得られる多くの他の形態として存在し得る。これらの形態には、例えばFv、Fab、Fab'、および(Fab)₂分子が含まれ、すべて本発明のVh配列またはVk配列のいずれかを含み得る。さらなる例には、本発明のVh/Vkの組み合わせと、異なる抗原特異性を有する第2のVh/Vkの組み合わせを含む「二重特異性」抗体が含まれ得る。

【0037】

「潜在的T細胞エピトープ」という用語は、本発明の理解によると、MHCクラスIIと結合する能力を有するアミノ酸配列を意味する。そのような配列はMHCクラスIIと複合体を形成して、T細胞を刺激し得る、および/またはT細胞と結合し得る（必ずしも測定できる程度に活性化する必要はない）。

【0038】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する「ペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸を含む化合物である。アミノ酸はペプチド結合によって相互に連結される（本明細書において以下に定義する）。ペプチドの生物学的産生に關与する20の異なる天然アミノ酸が存在し、これらの任意の数が任意の順に連結されてペプチド鎖またはペプチド環が形成され得る。ペプチドの生物学的産生に使用される天然アミノ酸はすべてL型構造を有する。合成ペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または2つの異なる構造のアミノ酸の種々の組み合わせを用いて、従来合成法により調製され得る。ペプチドによっては少数のアミノ酸単位のみを含む。例えば10個未満のアミノ酸単位を有する短いペプチドは、「オリゴペプチド」と称されることもある。他のペプチドは、例えば最大で100個以上の多数のアミノ酸残基を含み、「ポリペプチド」と称される。慣例により、「ポリペプチド」は3個以上のアミノ酸を含む任意のペプチド鎖と見なされ得り、「オリゴペプチド」は通常、特定の種類の「短い」ポリペプチドと見なされる。したがって、本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」への任意の言及はオリゴペプチドも含むと理解される。さらに、「ペプチド」への任意の言及は、ポリペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質を含む。アミノ酸のそれぞれ異なる配列は、異なるポリペプチドまたはタンパク質を形成する。形成され得るポリペプチドの数、よって異なるタンパク質の数は、事実上無制限である。

【0039】

改変抗CD52抗体をもたらす本発明の一般的方法は以下の段階を含む：

- (a) ポリペプチドまたはその一部のアミノ酸配列を決定する段階。
- (b) インビトロ技法もしくはコンピュータによる技法または生物学的アッセイ法を用い

10

20

30

40

50

たペプチドのMHC分子への結合の判定を含む任意の方法により、タンパク質のアミノ酸配列内の1つまたは複数の潜在的T細胞エピトープを同定する段階。

(c) 同定された潜在的T細胞エピトープ内の1つまたは複数のアミノ酸が、インビトロ技法もしくはコンピュータによる技法または生物学的アッセイ法により測定されるペプチドのMHC分子への結合を実質的に減じるかまたは除去する方法で改変された新たな配列変種を設計する段階。そのような配列変種は、新たな潜在的T細胞エピトープが次にペプチドのMHCクラスII分子への結合を実質的に減じるかまたは除去する方法で改変されない限り、配列の変化による新たな潜在的T細胞エピトープの作製が回避される方法で作製される。

(d) 組換えDNA技法によりそのような配列変種を構築する段階、および所望の特性を有する1つまたは複数の変種を同定するためにそのような変種を試験する段階。

【0040】

段階(b)による潜在的T細胞エピトープの同定は、当技術分野において以前に記載された方法に従って実施し得る。適切な方法は、WO第98/59244号；WO第00/34317号；米国特許出願第20030153043号に開示されており、これらはすべて参照により本明細書に組み入れられる。

【0041】

実際には、多くの変種抗CD52抗体が産生され、所望の免疫特性および機能特性について試験され得る。タンパク質配列に対して改変を行う場合、意図した変化が新たな免疫原性エピトープを導入しないことが特に重要である。この事象は実際には、任意の適切な手段により、意図した配列をエピトープおよびまたはMHCクラスIIリガンドの存在について再度試験することで回避される。

【0042】

種々の態様において、本発明の改変抗体は、本明細書において特定するVh遺伝子およびVk遺伝子の様々な組み合わせの発現によって作製される。そのような重鎖と軽鎖の組み合わせはすべて、本発明によって包含される。

【0043】

本発明は、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換が分子のV領域内の位置で行われ、その結果タンパク質から1つまたは複数の潜在的T細胞エピトープが除去された抗CD52抗体に関する。アミノ酸の改変(例えば、置換)が親分子の最も免疫原性の高い領域内で行われた改変抗体分子を提供することが最も好ましい。本発明の種々の態様は、MHCクラスIIリガンドのいずれかが、結合を排除するかまたはさもなくばペプチドが結合し得るMHCアロタイプの数が増加するように改変された改変抗体分子を含む。本発明者らは、ヒトにおけるCAMPATH抗体分子の免疫原性領域を見出し、本明細書において開示した。特定の状況下では、本明細書において開示する領域に加えて配列のさらなる領域が免疫原性エピトープとなり得ることが理解され、例えばそれはこの場合の配列と同様の配列を有するタンパク質またはペプチドを発現する病原体に感染した場合である。

【0044】

MHCクラスIIエピトープの除去は、潜在的T細胞エピトープが欠如した改変変種を作製するためのアミノ酸置換を伴った。アミノ酸置換は、望ましくない潜在的T細胞エピトープの活性の実質的な減少または除去を達成することが予測される、ペプチド配列内の適切な位置で行った。この点において特に有用な置換の例を表1および表2に提供するが、表1はVh領域の置換に関し、表2はVk領域の置換に関する。

【0045】

当業者に明らかであるように、望ましくないエピトープを除去するという目的を達成する複数の選択的な置換のセットが得られた。しかし、得られる配列は本明細書に開示する特定の組成物と依然として広範に相同であり、よってこれらの配列は本発明の範囲内に入る。最も相同性の低い領域で本発明の特定の配列と約70%、または約90%、または約95%、または約99%、またはそれ以上相同であり、なお機能上同等である配列が得られる場合が多い。このような配列も同様に本発明の範囲内に入る。

10

20

30

40

50

【0046】

所与の潜在的T細胞エピトープ内の単一のアミノ酸置換がエピトープを除去し得る最も好ましい手段であることが理解される。単一のエピトープ内の置換の組み合わせも意図され得り、例えばこれは個々に規定されるエピトープが相互に重複している場合に特に適合し得る。さらに、所与のエピトープ内で単一であるかまたは単一のエピトープ内で組み合わせであるアミノ酸置換は、MHCクラスII結合溝に関する「ポケット残基」と等しくない位置で行われ得るが、ペプチド配列の任意の位置で行われてよい。そのような置換はすべて本発明の範囲内に入る。

【0047】

本発明が改変抗CD52抗体に関する限り、そのような改変抗体または改変抗体の断片を含む組成物および関連する組成物は、本発明の範囲内であるとみなされるべきである。したがって本発明は、例えばFv、Fab、Fab'、およびF(ab')₂断片を含む抗体断片の使用および作製を意図する。このような断片は、標準的な方法によって調製し得る [例えば; Coligan et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons 1991-1997、参照により本明細書に組み入れられる]。本発明はまた、当技術分野において周知である様々な組換え型の抗体由来分子種を意図する。このような種には、VhドメインとVkドメインを連結するペプチドリinkerを含む一本鎖Fv型(例えば、scFv)、またはVhドメインとVkドメインの結合を促進するように操作されたさらなるシステイン残基を含む、鎖間ジスルフィド結合により安定化されたFv(dsFv)を含む安定化Fv断片が含まれる。同様に、他の組成物も当技術分野において知られており、これには「ミニボディ」、および単独可変ドメイン「dAb」と称される種も含まれ得る。他の種は改変抗体V領域ドメインの結合価を増大させる手段をさらに取り込み得り、すなわちこれは例えば二量体形成ドメイン(例えば、「ロイシンジッパー」)の操作によりまたは化学修飾戦略により複数の抗原結合部位を有する種である。

【0048】

本発明の構想において、多くの様々なH鎖V領域配列およびL鎖V領域配列が提供される。本開示は、完全な抗体分子を構成するために提供され得るH鎖とL鎖の可能な組み合わせに制限を与えない。完全な抗体分子の構築は、組換えDNA技法ならびに当技術分野において周知である抗体分子を精製および操作する方法によって達成され得る。必要な技法は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual,」 second edition (Sambrook et al., 1989); 「Oligonucleotide Synthesis」 (M. J. Gait, ed., 1984); 「Animal Cell Culture」 (R. I. Freshney ed., 1987); 「Methods in Enzymology」 (Academic Press, Inc.); 「Handbook of Experimental Immunology」 (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」 (J. M. Miller & M. P. Calos, eds, 1987); 「Current Protocols in Molecular Biology」 (Ausubel et al., eds., 1987); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction,」 (Mullis et al., eds., 1994); 「Current Protocols in Immunology」 (Coligan et al., eds., 1991)などの文献において十分に説明されている。

【0049】

本発明の好ましい分子はいくつかの方法のいずれかにより調製し得るが、ルーチンの組換え法を利用して行うことが最も好ましい。本明細書に提供するタンパク質の配列および情報を使用して、好ましい抗体V領域のいずれかをコードするポリヌクレオチド(DNA)を推定することは比較的容易な手順である。これは、例えばDNASTARソフトウェアスイート [DNASTAR Inc、米国、ウィスコンシン州、マディソン]などのコンピュータソフトウェアツールを使用して達成し得る。本発明の好ましいポリペプチドをコードする機能を有する任意のそのようなDNA配列またはその有効な相同体は、本発明の態様として見なされるべきである。

【0050】

一般的な構想として、Vh鎖遺伝子またはVk鎖遺伝子のいずれかを遺伝子合成により作製し、適切な発現ベクターにクローニングすることができる。次に発現ベクターを宿主細胞

10

20

30

40

50

に導入し、細胞を選択して培養する。抗体分子は培養液から容易に精製され、治療投与に適した調製物に製剤化される。

【0051】

非限定的な例として、1つのそのような構想は、一群の合成オリゴヌクレオチドを使用する遺伝子合成過程を含む。遺伝子は、相補的末端を伴うオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、次いで増幅させるリガーゼ連鎖反応法(LCR法)により構築し、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)により空いた部分を埋める。PCRは、プライマーとして働くフランキングオリゴヌクレオチドを高濃度で添加することにより駆動する。5'および3'免疫グロブリン遺伝子フランキング領域を含むベクターからさらにPCRし、抗体全体を発現させるための発現ベクターにサブクロニングすることにより、PCR産物を全長抗体遺伝子になるよう構築する。構築されたVh遺伝子およびVk遺伝子は、突然変異誘発のための、および本明細書に開示する複数の変種抗体配列のいずれかのような配列を構築するための鋳型となり得る。Higuchi et al., [1988, Nucleic Acids Res. 16: 7351]によって記載されているような「重複伸長PCR法」の戦略を用いることが特に簡便であるが、他の方法および系を容易に適用することも可能である。

10

【0052】

可変領域カセットを含む全長免疫グロブリン遺伝子は、最も簡便には重複PCR法により構築し、所望の免疫グロブリン定常領域ドメインを含む発現ベクターにサブクロニングする。発現ベクターは、例えばエレクトロポレーション法により哺乳動物または他の宿主細胞に導入し得る。NS0細胞株は欧州動物細胞培養コレクション(European Collection of Animal Cell Cultures: ECACC)から得られる免疫グロブリン非産生マウス骨髄腫であり、この手順の特に適した例示的宿主細胞株である。抗体を分泌する細胞株を拡大し、例えばプロテインAアフィニティークロマトグラフィー[Harlow & Lane、同書]を使用して抗体を容易に精製することができる。精製抗体の濃度は、関心対象の抗体のヒト定常領域を検出する酵素結合免疫吸着測定法(ELISA法)を用いて決定することができる。

20

【0053】

さらなる局面において、本発明は、改変抗体組成物を用いてヒトを治療処置する方法に関する。個体に投与するには、改変抗体組成物のいずれかを、好ましくは少なくとも80%の純度で、かつ発熱物質および他の混入物を含まないように作製する。改変抗体タンパク質の治療組成物は薬学的に許容される賦形剤と共に使用されることがさらに理解される。本発明の薬学的組成物は、賦形剤、担体、佐剤、および緩衝液を含む、医薬品に通例使用される物質(例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (Alfonso R. Gennaro, ed, 18th edition, 1990)を含めて簡便に調製される。組成物は、例えば非経口的に、経腸的に、筋肉内に、皮下に、静脈内に、または効果を達成するのに有用な他の経路で投与し得る。例えば:抗CD52抗体は、静脈内投与(Cloes et al. (1999) Ann. Neurol., 46:296-304; Moreau et al. (1996) Multiple Sclerosis, 1:357-65; Moreau et al. (1994) Lancet, 344:298-301、すべて参照により本明細書に組み入れられる)および皮下投与(Schnitzer et al. (1997) J. Rheumatol., 24:1031-6; Bowen et al. (1997) Br. J. Hematol., 96:617-9、すべて参照により本明細書に組み入れられる)することができる。従来の賦形剤には、非経口投与、経腸投与、および薬剤と有害な反応を起こすことのない他の投与経路に適した、薬学的に許容される有機または無機担体物質が含まれる。非経口的適用に特に適しているのは、注射用滅菌溶液、好ましくは油剤または水溶液、および懸濁剤、乳剤、または坐剤を含む埋め込み錠である。アンプルは簡便な単位調剤である。薬学的調製物は滅菌し、必要に応じて安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に作用する塩、緩衝液、または活性化化合物と有害な反応を起こすことのない他の物質と混合することができる。

30

40

【0054】

本発明の方法では、本発明の抗CD52抗体の実際の使用用量は、処置する疾患の種類および重症度、ならびに他の選択された処置様式を含む種々の要因に依存することになる。投与計画の手引きは、当技術分野において周知であるCAMPATH-1Hの投薬から得られる。

【0055】

50

実験実施例

実施例1 - 抗CD52抗体V_H遺伝子およびV_K遺伝子の構築

ラット抗CD52抗体の配列を、可変ドメイン重鎖 (V_H) についてはデータベースエントリー-RNIGHCC1Gから、および可変ドメイン軽鎖 (V_K) についてはRNIGKCC1Gから得た。内部のHindIII部位およびBamHI部位を除去するため、これらの配列をアミノ酸配列を変更することなくわずかに改変した。V_H遺伝子およびV_K遺伝子は遺伝子合成により作製した。簡潔に説明すると、一群の合成オリゴヌクレオチドを設計し合成した。相補的末端を伴うオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、次いで増幅させるリガーゼ連鎖反応法 (LCR法) により遺伝子を構築し、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR法) により空いた部分を埋めた。PCRは、プライマーとして働くフランキングオリゴヌクレオチドを高濃度で添加することにより駆動させた。5'および3'免疫グロブリン遺伝子フランキング領域を含むベクターからさらにPCRし、抗体全体を発現させるための発現ベクターにサブクローニングすることにより、PCR産物を全長抗体遺伝子になるよう構築した。構築したV_H遺伝子およびV_K遺伝子を、突然変異誘発のための、および潜在的T細胞エピトープが除去された複数の変種抗体配列を構築するための鋳型とした。

【0056】

V_H遺伝子の構築には、表3に列挙したオリゴヌクレオチドVH1~VH20を使用した。V_K遺伝子の構築には、表4に列挙したオリゴヌクレオチドVK1~VK20を使用した。両遺伝子とも、リン酸化オリゴヌクレオチド20μlをPfu DNAリガーゼ (Stratagene, Amsterdam, NL) 1μl、(酵素に同梱されている) 10X反応緩衝液10μl、および水69μlと混合してLCRを行った。反応混合液をサーマルサイクラーにセットし、95℃で2分インキュベートし、次いで95℃で30秒、50℃への緩やかな冷却、50℃で30秒、および55℃で20分の25サイクルを行い、最後に55℃で3時間インキュベートした。1%アガロースゲル電気泳動によりLCRの試料を解析したところ、スミアな中に妥当な大きさのかすかなバンドが認められた。オリゴヌクレオチドはすべてSigma-Genosys (Pampisford, UK) から入手し、T4 DNAキナーゼ (Promega, Southampton, UK) を使用し供給業者の推奨する手順によりインピトロでリン酸化した。LCRの後、反応物5μlをPCR混合液に移し、構築された断片を増幅した。オリゴヌクレオチドVH1およびVH20を用いてV_H反応を駆動し、オリゴヌクレオチドVK1およびVK20を用いてV_K反応を駆動した。PCRは、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene, Amsterdam, NL) 1μlを用いて、全量50μlで30サイクル行った。1%アガロースゲル電気泳動によりPCRの試料を解析したところ、V_Hの380bpのバンドおよびV_Kの377bpのバンドが認められた。

【0057】

可変領域カセットは重複PCR法により構築した。簡潔に説明すると、ベクターM13-VHPCR1およびM13-VKPCR1 [Orlandi et al. (1989), PNAS, 89: 3833-7] に由来するDNAを鋳型として使用し、V_H鎖およびV_K鎖それぞれについてリーダーシグナルペプチドをコードする5'フランキング配列ならびにスプライス部位およびイントロン配列を含む3'フランキング配列を含むさらなる2つの重複PCR断片を作製した。このようにして作製されたV_HおよびV_KのDNA断片を、全長DNA配列を得るために必要なフランキングプライマーを用いてPCRで結合した。これらの「連結」反応で使用したプライマー対は、V_H遺伝子の場合はオリゴヌクレオチドVHVK5'CHO / VHVK3'SIGおよびVH19 / VH12であり、V_K遺伝子の場合はオリゴヌクレオチドVHVK5'CHO / VHVK3'SIGおよびVK19 / VK3'CHOであった。

【0058】

Qiagen (Crawley, UK) PCR PREPキットを用いてPCR産物を精製した後、これをHindIIIおよびBamHI (Promega, Southampton, UK) で切断し、1%アガロースゲルで泳動した。所望のバンドを採取し、Qiagen (Crawley, UK) DNA抽出キットを用いて精製した。この産物をHindIIIおよびBamHIで切断したpUC19ベクターにクローニングし、配列を確認した。

【0059】

(表3) V_H遺伝子合成用のオリゴヌクレオチド

| 名称 | 配列 | 配列番号: |
|-----------|--|-------|
| VH1 | TCCACAGGTGTCCACTCCGA | 141 |
| VH2 | CCAGATTCCAACAGTTTCACCTCGGAGTGGACACCTGTGGA | 142 |
| VH3 | GGTGAAACTGTTGGAATCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCC | 143 |
| VH4 | GGAGAGTCTCATAGAACCCCCGGCTGTACCAAGCCTCCT | 144 |
| VH5 | GGGGGGTTCTATGAGACTCTCCTGTGCAGGTTCTGGATTCA | 145 |
| VH6 | CATGTAGAAATCAGTGAAGGTGAATCCAGAACCTGCACA | 146 |
| VH7 | CCTTCACTGATTTCTACATGAACTGGATTGCGCCAGCCTGC | 147 |
| VH8 | GCCACTCAGGTGCCTTCCCTGCAGGCTGGCGAATCCAGTT | 148 |
| VH9 | AGGGAAGGCACCTGAGTGGCTGGGTTTTATTAGAGACAAA | 149 |
| VH10 | TCTGTTGTGTAACCTTTAGCTTTGTCTCTAATAAAACCCA | 150 |
| VH11 | GCTAAAGGTTACACAACAGAGTACAATCCATCTGTGAAGGGG | 151 |
| VH12 | TCTGGAGATGGTGAACCGCCCTTCACAGATGGATTGTAC | 152 |
| VH13 | CGGTTCACCATCTCCAGAGATAATACCCAAAACATGCT | 153 |
| VH14 | GGGTGTTCAATTTGAAGATAGAGCATGTTTTGGGTATTATC | 154 |
| VH15 | CTATCTTCAAATGAACACCCTAAGAGCTGAGGACACTGCC | 155 |
| VH16 | TCTCTTGCACAGTAGTAAGTGGCAGTGTCTCAGCTCTTA | 156 |
| VH17 | ACTTACTACTGTGCAAGAGAGGGCCACACTGCTGCTCCTTTT | 157 |
| VH18 | CTCCTTGGCCCCAGTAATCAAAAGGAGCAGCAGTGTGGCCC | 158 |
| VH19 | GATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACCGTCTCCTCA | 159 |
| VH20 | TGAGGAGACGGTGACCATGA | 160 |
| VHVK5'CHO | GCATGTTGACCCTGACGCAAGCTTGCCGCCACCATGGG | 161 |
| VHVK3'SIG | GGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGC | 162 |
| VH12 | GCGATAGCTGGACTGAATGGATCCTATAAATCTCTG | 163 |

10

20

【 0 0 6 0 】

(表4) V_k 遺伝子合成用のオリゴヌクレオチド

| 名称 | 配列 | 配列番号: |
|-----------|--|-------|
| VK1 | TCCACAGGTGTCCACTCCGAC | 164 |
| VK2 | AGACTGGGTCATCTTGATGTCGGAGTGGACACCTGTGGA | 165 |
| VK3 | ATCAAGATGACCCAGTCTCCCTCATTCCTGTCTGCATCTG | 166 |
| VK4 | AGAGTGACTCTGTCTCCCACAGATGCAGACAGGAATGAGGG | 167 |
| VK5 | TGGGAGACAGAGTCACTCTCAACTGCAAAGCAAGTCAGAA | 168 |
| VK6 | GTTTAAAGTATTTGTCAATATTCTGACTTGCTTTGCAGTTG | 169 |
| VK7 | TATTGACAAATACTTAAACTGGTATCAGCAAAAGCTGGGA | 170 |
| VK8 | TCAGGAGTTTGGGAGATTCTCCCAGCTTTTGTGATACCA | 171 |
| VK9 | GAATCTCCCAAACCTCTGATATATAATACAAACAATTTGC | 172 |
| VK10 | CCTTGATGGGATGCCCGTTTGCAAATTTGTTTGTATTATATA | 173 |
| VK11 | AAACGGGCATCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG | 174 |
| VK12 | GGTGAGTGTGAAATCAGTACCAGATCCACTGCCACTGAA | 175 |
| VK13 | TACTGATTTACACTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA | 176 |
| VK14 | CAGAAATATGTGGCAACATCTTCAGGCTGCAGGCTGCTGAT | 177 |
| VK15 | GATGTTGCCACATATTTCTGCTTGCAGCATATAAGTAGG | 178 |
| VK16 | CCCAGTTCCAAACGTGCGCGGCCACTTATATGCTGCAAG | 179 |
| VK17 | CCGCGCACGTTTGGAACTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC | 180 |
| VK18 | AAAGTTTAAATTCTACTCACGTTTCAGCTCCAGCTTGGT | 181 |
| VK19 | GTGAGTAGAATTTAAACTTTGCTTCGTCGACTGGATCC | 182 |
| VK20 | GGATCCAGTCGACGAAGC | 183 |
| VHVK5'CHO | GCATGTTGACCCTGACGCAAGCTTGCCGCCACCATGGG | 184 |
| VHVK3'SIG | GGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGC | 185 |
| VK3'CHO | GCGATAGCTGGACTGAATGGATCCAGTCGACGAAGC | 186 |

30

40

【 0 0 6 1 】

50

ヒトIgG1定常領域 [Takahashi et al. (1982) Cell 29: 671] または 定常領域 [Heiter et al. (1980) Cell 22: 197] に連結されたラット抗CD52可変領域からなるキメラ重鎖および軽鎖発現ベクターを構築した。次いで、これらの複合抗体遺伝子を、組換え抗体を産生させるための発現ベクターに移した。抗体遺伝子はヒトサイトメガロウイルス前初期プロモーターの制御下にある。哺乳動物細胞での選択のため、重鎖ベクターはdhfr遺伝子を含み、軽鎖ベクターはneo遺伝子を含む。DNA配列は、キメラ発現ベクター内でV_HおよびV_Kについて正確であることを確認した。

【 0 0 6 2 】

実施例2 - 改変抗体V_H遺伝子およびV_K遺伝子の構築

改変V_H遺伝子およびV_K遺伝子は、実施例1で作製したラット抗CD52可変領域カセットを鋳型として使用し、PCR突然変異誘発により構築した。表5は、改変V_Hの作製に使用したオリゴヌクレオチドを収載する。以下の変異は残基のKabat番号により特定し、括弧内にそれぞれ同定されるポリペプチド配列に関連する直鎖番号を記す。DIVHv1 (ポリペプチド配列番号:3; ポリヌクレオチド配列番号:71) は、変異K3Q (3)、M18L (18)、I37V (37)、P40A (40)、A41P (41)、A44G (44)、P45L (45)、L48V (48)、T74S (77)、Q75K (78)、M77T (80)、T82bS (87)、T89V (95)、V107T (115)、M108L (116)を含み、オリゴヌクレオチドVHK5'CHO、DIVH1、DIVH2、DIVH3、DIVH4、DIVH5、DIVH6、DIVH7、DIVH8、DIVH9、DIVH10、およびVH12を使用した。DIVHv2 (ポリペプチド配列番号:4; ポリヌクレオチド配列番号:72) は、変異K3Q (3)、M18L (18)、A41P (41)、L48I (48)、T74S (77)、Q75K (78)、M77T (80)、T82bS (87)、T89V (95)、V107T (115)、M108L (116)を含み、オリゴヌクレオチドVHK5'CHO、DIVH1、DIVH2、DIVH3、DIVH4、DIVH5A、DIVH6A、DIVH7、DIVH8、DIVH9、DIVH10、およびVH12を使用した。DIVHv3 (ポリペプチド配列番号:5; ポリヌクレオチド配列番号:73) は、L5Q (5)、L20I (20)、A23S (23)、A41P (41)、A44G (44)、L48I (48)、M77T (80)、Y79H (82)、M82A (85)、T89V (95)、V107T (115)、M108T (106)を含み、オリゴヌクレオチドVHK5'CHO、DIVH11、DIVH12、DIVH13、DIVH14、DIVH15、DIVH16、DIVH17、DIVH18、DIVH19、DIVH20、およびVH12を使用した。DIVHv4 (ポリペプチド配列番号:6; ポリヌクレオチド配列番号:74) は、変異K3Q (3)、M18L (18)、I37V (37)、P40A (40)、A41P (41)、A44G (44)、P45L (45)、L48V (48)、T74A (77)、Q75K (78)、M77S (80)、T82bS (87)、T89V (95)、V107T (115)、M108L (116)を含み、オリゴヌクレオチドVHK5'CHO、DIVH1、DIVH2、DIVH3、DIVH4、DIVH5、DIVH6、DIVH7、DIVH8、DIVH9、DIVH10、DIVH21、DIVH22、およびVH12を使用した。DIVHv5 (ポリペプチド配列番号:7; ポリヌクレオチド配列番号:75) は、変異K3Q (3)、M18L (18)、A41P (41)、T74S (77)、Q75K (78)、M77T (80)、T82bS (87)、T89V (95)、V107T (115)、M108L (116)を含み、オリゴヌクレオチドVHK5'CHO、DIVH1、DIVH2、DIVH3、DIVH4、DIVH23、DIVH6A、DIVH7、DIVH8、DIVH9、DIVH10、およびVH12を使用した。

【 0 0 6 3 】

(表5) 改変抗CD52V_Hの構築に使用したオリゴヌクレオチド

10

20

30

| 名称 | 配列 | 配列番号: |
|-----------|--|-------|
| VHVK5'CHO | GCATGTTGACCCTGACGCAAGCTTGCCGCCACCATGGG | 187 |
| DIVH1 | CCACTCCGAGGTGCAACTGTTGGAATCTGG | 188 |
| DIVH2 | CCAGATTCCAACAGTTGCACCTCGGAGTGG | 189 |
| DIVH3 | AGCCGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTG | 190 |
| DIVH4 | CACAGGAGAGTCTCAGAGAACCCCCGGCT | 191 |
| DIVH5 | AGGGAAGGGACTTGAGTGGGTGGGTTTTATTAGAG | 192 |
| DIVH5A | CGGGAAAGCACCTGAGTGGATTGGTTTTATTAGAG | 193 |
| DIVH6 | CCACTCAAGTCCCTTCCCTGGAGCCTGGCGGACCCAGTTCATG | 194 |
| DIVH6A | CCACTCAGGTGCTTTCCCGGGAGGCTGGCGAATCC | 195 |
| DIVH7 | TCTTCAAATGAACTCCCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTTTACTACTG | 196 |
| DIVH8 | AGGGAGTTCATTTGAAGATAGAGGGTGTTTTTGGAATTATCTCTGG | 197 |
| DIVH9 | TGGGGCCAAGGAACACTGGTCACCGTCTCCTCAGG | 198 |
| DIVH10 | GGAGACTGTGACCAGTGTTCCTTGGCCCCAG | 199 |
| DIVH11 | TCCGAGGTGAAACTGCAGGAATCTGGAGGAGGC | 200 |
| DIVH12 | CCAGATTCCTGCAGTTTACCTCGGAGTGG | 201 |
| DIVH13 | GGGGGTTCTATGAGAATCTCCTGTTTACGGTCTGG | 202 |
| DIVH14 | GAACCTGAACAGGAGATTCTCATAGAACCCCCCGG | 203 |
| DIVH15 | CGGGAAAGGACCTGAGTGGATTGGTTTTATTAGAG | 204 |
| DIVH16 | CCAATCCACTCAGGTCCCTTCCCGGGAGGCTGGCG | 205 |
| DIVH17 | GCTAACACCCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTTTACTACTG | 206 |
| DIVH18 | CTCTTAGGGTGTAGCTTGAAGATGGAGGGTGTTTTTGGG | 207 |
| DIVH19 | TGGGGCCAAGGAACACTACCGTCACCGTCTCCTCAGG | 208 |
| DIVH20 | GGAGACGGTGACGGTAGTTCCTTGGCCCCAG | 209 |
| DIVH21 | GATAATGCCAAAACTCCCTCTATCTTCAAATGAAC | 210 |
| DIVH22 | ATAGAGGGAGTTTTTGGCATTATCTCTGGAGATGG | 211 |
| DIVH23 | CGGGAAAGCACCTGAGTGGCTGGGTTTTATTAGAG | 212 |
| VH12 | GCGATAGCTGGACTGAATGGATCCTATAAATCTCTG | 213 |

10

20

【 0 0 6 4 】

表6は、改変 V_K の作製に使用したオリゴヌクレオチドを収載する。以下の変異は残基のKabat番号により特定し、これはそれぞれ同定されるポリペプチド配列の直鎖番号と同じである。DIVKv1 (ポリペプチド配列番号:8; ポリヌクレオチド配列番号:76) は、変異K3Q、F10S、L21I、N22T、K24R、L40P、E42K、S43A、L46S、T56S、I58V、V83I、F87Yを含み、オリゴヌクレオチドVHVK5'CHO、DIVK1、DIVK2、DIVK3A、DIVK4A、DIVK5B、DIVK6、DIVK7、DIVK8A、DIVK9、DIVK10、およびVK3'CHOを使用した。DIVKv2 (ポリペプチド配列番号:9; ポリヌクレオチド配列番号:77) は、変異K3Q、F10S、L21I、N22T、L40P、E42K、S43A、I58V、V83I、F87Yを含み、オリゴヌクレオチドVHVK5'CHO、DIVK1、DIVK2、DIVK3、DIVK4、DIVK5、DIVK6、DIVK7、DIVK8、DIVK9、DIVK10、およびVK3'CHOを使用した。DIVKv3 (ポリペプチド配列番号:10; ポリヌクレオチド配列番号:78) は、変異K3Q、F10S、L21I、N22T、K24R、L40P、E42K、S43A、T56S、I58V、V83I、F87Yを含み、オリゴヌクレオチドVHVK5'CHO、DIVK1、DIVK2、DIVK3A、DIVK4A、DIVK5、DIVK6、DIVK7、DIVK8A、DIVK9、DIVK10、およびVK3'CHOを使用した。DIVKv4 (ポリペプチド配列番号:11; ポリヌクレオチド配列番号:79) は、変異K3Q、F10S、L21I、N22T、L40P、E42K、S43A、L46S、I58V、V83I、F87Yを含み、オリゴヌクレオチドVHVK5'CHO、DIVK1、DIVK2、DIVK3、DIVK4、DIVK5B、DIVK6、DIVK7、DIVK8、DIVK9、DIVK10、およびVK3'CHOを使用した。DIVKv5 (ポリペプチド配列番号:12; ポリヌクレオチド配列番号:80) は、変異K3Q、F10S、L21I、N22T、L40P、E42K、I58V、V83I、F87Yを含み、オリゴヌクレオチドVHVK5'CHO、DIVK1、DIVK2、DIVK3、DIVK4、DIVK5A、DIVK6A、DIVK7、DIVK8、DIVK9、DIVK10、およびVK3'CHOを使用した。

30

40

【 0 0 6 5 】

(表6) 改変抗CD52 V_K の構築に使用したオリゴヌクレオチド

| 名称 | 配列 | 配列番号: |
|-----------|--|-------|
| VHVKS'CHO | GCATGTTGACCCTGACGCAAGCTTGCCGCCACCATGGG | 214 |
| DIVK1 | ATGACCCAGTCTCCCTCATCCCTGTCTGCATC | 215 |
| DIVK2 | GAGGGAGACTGGGTCATCTGGATGTCGGAGTGGAC | 216 |
| DIVK3 | CAGAGTCACTATCACCTGCAAAGCAAGTCAGAAT | 217 |
| DIVK3A | CAGAGTCACTATCACCTGCAAGCAAGTCAGAAT | 218 |
| DIVK4 | ATTCTGACTTGCTTTGCAGGTGATAGTACTCTGT | 219 |
| DIVK4A | ATTCTGACTTGCTCTGCAGGTGATAGTACTCTGT | 220 |
| DIVK5 | CCCGGAAAAGCTCCCAAACCTCCTGATATATAATAC | 221 |
| DIVK5A | CCCGGAAAATCTCCCAAACCTCCTGATATATAATAC | 222 |
| DIVK5B | CCCGGAAAAGCTCCCAAATCCCTGATATATAATAC | 223 |
| DIVK6 | TTTGGGAGCTTTTCCGGGCTTTTGCTGATACC | 224 |
| DIVK6A | TTTGGGAGATTTTCCGGGCTTTTGCTGATACC | 225 |
| DIVK7 | CGTCCCATCAAGGTCAGTGGCAGTGG | 226 |
| DIVK8 | GCCACTGAACCTTGATGGGACGCCCGTTTGC | 227 |
| DIVK8A | CACTGAACCTTGATGGGACGCCAGATTGCAAATTG | 228 |
| DIVK9 | GCCTGAAGATATTGCCACATATTACTGCTTGCAGC | 229 |
| DIVK10 | TGCAAGCAGTAATATGTGGCAATATCTTCAGGCTG | 230 |
| VK3'CHO | GCGATAGCTGGACTGAATGGATCCAGTCGACGAAGC | 231 |

10

20

【 0 0 6 6 】

作製された改変 V_H および V_K 発現カセットをHindIII ~ BamHI断片 (DIVHyv1 ~ DIVHv5のDNAおよびアミノ酸配列を図3 ~ 図7に示し、DIVKv1 ~ DIVKv5のDNAおよびアミノ酸配列を図8 ~ 図12に示す)としてプラスミドベクター-pUC19にクローニングし、全DNA配列が改変 V_H および V_K それぞれについて正確であることを確認した。

【 0 0 6 7 】

改変 V_H および V_K 発現カセットを、それぞれヒトIgG1定常領域 (配列番号:139; 図13) [Takahashi et al. (1982) Cell 29: 671] および 定常領域 (配列番号:140; 図14) [Heiter et al. (1980) Cell 22: 197] に連結した。次いで、これらの複合抗体遺伝子を、組換え抗体を産生させるための発現ベクターに移した。抗体遺伝子はヒトサイトメガロウイルス前初期プロモーターの制御下にある。哺乳動物細胞での選択のため、重鎖ベクターはdhfr遺伝子を含み、軽鎖ベクターはneo遺伝子を含む。DNA配列は、発現ベクター内で V_H および V_K について正確であることを確認した。

30

【 0 0 6 8 】

実施例3 - 抗CD52抗体の発現、精製、および定量

抗体発現に使用した宿主細胞株は、欧州動物細胞培養コレクション、Porton、UKから入手したCHO dhFr⁻であった (ECACC No 94060607)。重鎖発現ベクターおよび軽鎖発現ベクターをエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時にトランスフェクションした。ヌクレオシドを含まず、10%透析ウシ胎児血清および400 μ g/ml ジェネティシン (G-418硫酸) (すべてGibco、Paisley、UKから入手) を添加したイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM) 中で、neo遺伝子およびdhfr遺伝子を発現するコロニーを選択した。トランスフェクトされた細胞クローンを、ヒトIgGのELISA [Tempest et al. (1991) BioTechnology 9: 266] によりヒト抗体の産生についてスクリーニングした。抗体を産生する細胞株を拡大し、最も高く産生する細胞株を選択し、液体窒素中で凍結した。Prosep (登録商標) -A (Bioprocessing Ltd) を製造業者の説明書に従って使用し、抗CD52抗体を精製した。ヒトIgG1抗体に関するELISAにより濃度を決定した。

40

【 0 0 6 9 】

アッセイは96ウェルプレートで行い、測定はすべて二つ組で行った。アッセイのため、炭酸/重炭酸コーティング緩衝液 pH9.6 (Sigma、Poole、UK) で1:250に希釈したヒツジ抗ヒト抗体 (The Binding Site、Birmingham、UK) をウェル当たり100 μ l使用して、プレ

50

ート (Dynatech Immulon 2) をコーティングした。コーティングは37 °Cで1時間行い、ウェルをPBST (0.05% Tween20を含むPBS) で3回洗浄した。ウェルをPBST 100 µLで満たし、対照および被験抗体の希釈物を設定した。負の対照にはPBSTのみを使用し、抗体は添加しなかった。標準抗体 (ヒトIgG1/ 精製骨髄タンパク質、The Binding Site、UK) は、PBSTで2 µg/mlとなるよう希釈した。1列目の二つ組のウェルに100 µLを添加し (最終濃度1 µg/mlとなる)、プレートの全体にわたって2倍希釈を繰り返した。被験抗体調製物についても、2倍希釈系列を同様に設定した。プレートを室温で1時間インキュベートし、ウェルを上記の通り洗浄した。結合した抗体を、ペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗ヒトIgG 鎖特異的試薬 (The Binding Site、Birmingham、UK) を使用して検出した。この二次抗体はPBSTで1:1000に希釈し、プレートの各ウェルに100 µl添加した。プレートを室温でさらに1時間インキュベートし、上記の通り洗浄した。検出にはo-フェニレンジアミン (OPD) 基質を使用した。OPD (Sigma、Poole、UK) 1錠 (20mg) を、使用する直前に30% (w/w) 過酸化水素水 (Sigma、Poole、UK) 10 µLを添加したペルオキシダーゼ緩衝液 (Sigma、Poole、UK) 45mlで溶解した。ウェル当たり100 µLの基質を添加し、室温で5分間または必要に応じてインキュベートした。12.5% H₂SO₄ 25 µLを添加して発色を停止し、492nmで結果を得た。抗体濃度に対してA₄₉₂をプロットし、抗体検量線と比較することで試料抗体の濃度を決定した。

【0070】

実施例4 - 結合アッセイによる改変抗CD52抗体の試験

ヒトT細胞リンパ腫細胞株HUT-78はCD52陽性であり、これを用いて本発明の改変抗体の結合を評価した。本実施例では、様々な濃度の被験抗体を細胞と共にインキュベートし、蛍光標識レポーター試薬と共にインキュベートした後に結合した抗体の量を評価した。レポーターは蛍光活性化セルソーター (FACS) を用いて測定した。

【0071】

簡潔に説明すると、各アッセイについて、10⁶個のHUT-78細胞を、被験抗体ならびに対照としてのヒト化 (CAMPATH-1H) およびキメラ抗CD52抗体の段階希釈物と共にインキュベートした。抗体の濃度はng/ml表記で以下の通りであった: 40000、20000、10000、5000、2500、1250、625、312.5、156.25、78.125、39.06、19.53、および0。インキュベーションはすべて、96ウェルプレートで最終容量100 µl PBS/2% FBSで行った。

【0072】

抗体と細胞の混合液を氷上で暗下にて1時間インキュベートし、冷PBS/2% FBS 200 µlで2回洗浄した。

【0073】

検出のため、細胞をFITC標識抗ヒトIgG Fcドメインの1:1000希釈物と共に氷上で1時間インキュベートした。この試薬は、Sigma (Poole、UK) から入手したヤギ抗ヒトIgG (Fc特異的) である。細胞を上記の通り洗浄し、PBS/2% FBS 100 µlに再懸濁し、PBS/2% FBS/ヨウ化プロピジウム (1:1000) 900 µlを含む4 ml FACSチューブ (Becton Dickinson) に移した。従来のBecton Dickinson FACS Calibur装置により細胞を解析した。

【0074】

平均蛍光値を用いて、被験抗体および対照抗体の結合を決定した。平均蛍光-抗体ゼロの平均蛍光と抗体濃度のプロットから、抗体の飽和濃度を決定した。SigmaPlotを用いて結合曲線をロジスティック4パラメータシグモイド式 (sigmoidal equation) に適合化させ、信頼水準95%の優れた適合を得た。力価、すなわち最大結合の50%を生じる濃度を表7に示す。結果から、本発明の抗体の多くがキメラCAMPATH-1G抗体およびヒト化CAMPATH-1H抗体とほぼ同等の結合を示すことが示される。

【0075】

(表7)

10

20

30

40

| 抗体 | 力価 ($\mu\text{g/ml}$) (最大結合の50%を与える濃度) |
|----------------|--|
| ヒト化 CAMPATH-1H | 1.49, 1.44, 2.62, 2.99 |
| キメラ CAMPATH-1G | 1.03, 1.99, 2.55, 2.35, 4.20 |
| DIVH1/DIVK1 | 2.99 |
| DIVH1/DIVK2 | 1.66 |
| DIVH1/DIVK3 | 1.71 |
| DIVH1/DIVK4 | 3.45 |
| DIVH1/DIVK5 | 1.85 |
| DIVH2/DIVK1 | 5.56 |
| DIVH2/DIVK2 | 3.70 |
| DIVH2/DIVK3 | 3.89 |
| DIVH2/DIVK4 | 6.21 |
| DIVH2/DIVK5 | 1.18 |
| DIVH3/DIVK1 | 9.60 |
| DIVH3/DIVK2 | 17.79 |
| DIVH3/DIVK3 | >40.0 |
| DIVH3/DIVK4 | 8.63 |
| DIVH3/DIVK5 | 3.30 |
| DIVH4/DIVK1 | 4.43 |
| DIVH4/DIVK2 | 1.59 |
| DIVH4/DIVK3 | 2.28 |
| DIVH4/DIVK4 | 8.54 |
| DIVH4/DIVK5 | 2.39 |
| DIVH5/DIVK1 | 4.01 |
| DIVH5/DIVK2 | 2.45 |
| DIVH5/DIVK3 | 2.55 |
| DIVH5/DIVK4 | 4.05 |
| DIVH5/DIVK5 | 3.00 |

10

20

【0076】

30

実施例5 - 競合アッセイによる改変抗CD52抗体の試験

本発明の改変抗体を用いて競合結合アッセイを行った。このアッセイでは、被験抗体を、CD52に対する結合に関してヒト化CAMPATH-1H試薬と競合する能力について評価した。本実施例では、HUT-78細胞を、飽和量より少ない量のビオチン化CAMPATH-1Hおよび種々の濃度の競合非標識被験抗体と共にインキュベートする。アビジン-FITCレポーターと共にさらにインキュベートし、実施例4と同様にFACS装置を用いて蛍光測定した後、細胞に結合したビオチン化参照抗体の量を決定した。

【0077】

簡潔に説明すると、それぞれの競合アッセイに対して、 10^6 個のHUT-78細胞をビオチン化ヒトCAMPATH-1H $2\mu\text{g}$ と共にインキュベートした。ビオチン化CAMPATH-1Hおよび非標識CAMPATH-1Hを用いてあらかじめ予備実験を行い、次に各アッセイに添加するのに必要なビオチン化抗体の至適量を決定しておいた。

40

【0078】

被験抗体および対照抗体の段階希釈物を、最終容量 $100\mu\text{l}$ PBS/2% FBSで96ウェルプレートに設定した。被験抗体は、0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100、500、および $1000\mu\text{g}/10^6$ 細胞で設定した。

【0079】

細胞と抗体の混合液を氷上で暗下にて1時間インキュベートし、氷冷PBS/2% FBS $200\mu\text{l}$ で2回洗浄した。アビジン-FITC試薬 (Sigma, Poole, UK) の1:200希釈物と共にインキュベートすることで、結合しているビオチン化抗体を検出した。インキュベーションは氷上

50

で1時間行い、その後上記の通り洗浄を2サイクル行った。細胞をPBS/2% FBS 100 μ lに再懸濁し、PBS/2% FBS/ヨウ化プロピジウム (1:1000希釈) 900 μ lを含む4mlチューブに移した。Becton Dickenson FACS Calibur装置により細胞を解析した。

【0080】

被験抗体および対照抗体の結合は、ビオチン標識対照の最大結合に対するパーセント阻害として表した。

【0081】

パーセント阻害値は以下のように決定した：

$$\%阻害 = \frac{[\text{競合物なしでのゲート内の細胞の}\% - \text{競合物ありでのゲート内の細胞の}\%]}{[\text{競合物なしでのゲート内の細胞の}\%]} \times 100 \quad 10$$

SigmaPlotを用いて結合曲線をロジスティック4パラメータシグモイド式に適合化させ、信頼水準95%の優れた適合を得た。EC₅₀値を計算し、これを表8に示す。結果から、本発明の抗体が、キメラCAMPATH-1G抗体およびヒト化CAMPATH-1H抗体と同等の効率でHUT-78細胞上のCD52に結合することが示される。

【0082】

(表8)

| 抗体 | EC ₅₀ |
|---------------|------------------|
| ヒト化CAMPATH-1H | 1.13, 1.43, 1.00 |
| キメラCAMPATH-1G | 1.00, 2.02, 0.87 |
| DIVH1/DIVK2 | 2.15, 2.84 |
| DIVH1/DIVK3 | 0.93, 2.20 |
| DIVH1/DIVK5 | 1.95, 2.75 |
| DIVH2/DIVK5 | 0.79, 1.04 |
| DIVH4/DIVK2 | 1.25, 2.05 |
| DIVH4/DIVK3 | 2.19, 2.40 |
| DIVH4/DIVK5 | 2.20 |
| DIVH5/DIVK1 | 2.05 |
| DIVH5/DIVK2 | 2.25, 1.65 |
| DIVH5/DIVK3 | 1.97, 1.10 |
| DIVH5/DIVK5 | 1.39, 2.43 |

【0083】

実施例6 - T細胞免疫原性解析

改変抗体CAMPATH-1G DIVHv2/DIVKv5を、L-グルタミンおよび抗菌-抗真菌剤 (Gibco/Invitrogen Cat No: 15240-062) を添加したCHOタンパク質フリー動物成分フリー培地 (Sigma Cat No: G7513) で培養した細胞株CHO CAMPATH-1G DIVH2/DIVK5から調製した。PROSEPAクロマトグラフィー (Millipore) により抗体を精製し、0.1Mグリシン pH3.0で溶出し、中和してリン酸緩衝食塩水に対して透析し、最後にろ過滅菌した。

【0084】

DIVH2/DIVK5改変抗体およびヒト化CAMPATH対照を、陽イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを用いた2段階の精製に供した。Sephadex G25 (PD10カラム) で50mM MES pH 6に緩衝液交換した後、タンパク質を陽イオン交換カラム (Mono-S 10/10) に通し、塩化ナトリウムの勾配 (0~0.5M) により溶出した。次いで、溶出されたタンパク質を含む画分を、PBSで流出するSuperdex 200分取カラム (XK16/60) に供した。ピーク画分をプールし、4℃で保存した。ヒトIgGのELISAにより抗体濃度を測定した。

【0085】

実験：

抗CD52CAMPATH抗体はそれ自体でT細胞に抑制的であり、標準的なT細胞アッセイにおけ

20

30

40

50

る免疫原性の解析を妨げることが考えられた。CAMPATH抗CD52抗体がT細胞に及ぼす影響を試験するため、予備実験を行った。3名の健常ドナーの血液からPBMCを調製した。これらをヒト化CAMPATH-1H (Ilexより供与)のみ、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)のみ、KLHおよびCAMPATH-1H抗体と共にインキュベートし、また非処置対照を用意した。結果から、3名のドナーすべてにおいて、抗体のT細胞に及ぼす影響が理由で、対照抗原KLHに対する応答の競合阻害が存在することが示された。

【0086】

原型の抗CD52抗体の免疫原性を解析するため、樹状細胞(DC)を抗CD52抗体全体と共に添加し、洗浄により外来性(プロセッシングを受けていない)抗原を除去してから、自己T細胞を添加するというより複雑なT細胞アッセイ手順を使用した。この方法で、抗CD52抗体の抑制効果が回避され、KLHに対する正常な応答が得られた。ヒト化CAMPATH-1Hを試験対照抗原として用いるこの代替手順において、全部で10名の健常ドナーを使用した。

10

【0087】

簡潔に説明すると、PBMCを単球の供給源として使用し、単球は組織培養プラスチックへの接着によって単離した(>90% CD14⁺)。単球をウェル(24ウェルプレート)当たり1 x 10⁶個という適切な密度で、3%熱非働化ヒトAB血清(Autogen Bioclear)を添加したAIM V培地(Gibco)(成長培地)で培養した。APC様表現型(CD40⁺、CD80^{hi}、CD83^{hi}、CD86^{hi}、MHCクラスII^{hi})を誘導するため、単球をヒトIL-4(Peprotech)およびGM-CSF(Peprotech)を含む成長培地中で4日間インキュベートした。4日目に、被験抗原(ヒト化CAMPATH-1H抗体または改変CAMPATH-1G DIVHv2/DIVKv5抗体)50 μg/mlを添加した。対照ウェルには培地のみを添加した。24時間後、成長培地および抗原を除去し、細胞を1度洗浄してから、TNF- (Peprotech)、GM-CSF、およびIL-4を含む新鮮な成長培地を添加して4日間培養した。接着および非接着樹状細胞(DC)を両方回収し、計数した。ドナー当たり処理(ヒト化CAMPATH-1H抗体もしくは改変CAMPATH-1G DIVHv2/DIVKv5抗体または対照)当たり6つ組の培養という様式で、DCを96ウェル丸底プレートのウェル当たり1 x 10⁴個にて分注した。DCに4000ラドのガンマ線を照射し、その後PBMCからネガティブ単離した(Dyna Human CD4⁺ Negative Isolation Kit)自己CD4⁺ T細胞をウェル当たり1 x 10⁵個にて添加した。プレートを7日間インキュベートし、トリチウム標識したチミジンの取り込みにより増殖を測定した(1 μCi/ウェルの³H-チミジンによる6時間パルス)。

20

これらのデータは以下のような刺激指数として表す：

30

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{被験抗原のCPM}}{\text{非処置対照のCPM}}$$

正の結果は2を超える刺激指数(SI)と定義する。予備段階の結果(図15)から、これら10名のドナーのうち2名がCAMPATH-1Hに反応し、そのうち1名が非常に高い刺激指数を有したことが示される。

【0088】

CAMPATH-1H抗体と改変DIVHv5/DIVKv2抗体との比較：

T細胞アッセイにおいてヒト化抗体および改変抗体をスクリーニングするために、HLA-D R分類に基づいて20名の健常ドナーの一群を選択した(表9を参照のこと)。これにより、世界の人口で発現されるDR対立遺伝子の80%を超えるDR対立遺伝子に対する抗体のスクリーニングが可能になった。

40

【0089】

(表9)ヒト化および改変CAMPATH抗体の免疫原性を試験するために用いた20名の健常ドナーセットのHLA DRハプロタイプ

| ドナー | アロタイプ |
|-----|----------------------------------|
| 1 | DRB1*04, DRB4*01 |
| 2 | DRB1*03, DRB1*04, DRB4*01, DRB5 |
| 3 | DRB1*01, DRB1*13, DRB3 |
| 4 | DRB1*01, DRB1*07, DRB4*01 |
| 5 | DRB1*11 AND DRB1*13 OR 14, DRB3 |
| 6 | DRB1*03およびDRB1*08, 11または13, DRB3 |

10

| ドナー | アロタイプ |
|-----|---------------------------------|
| 7 | DRB1*01, DRB1*11, DRB3 |
| 8 | DRB1*10, DRB1*15, DRB5 |
| 9 | DRB1*04, DRB1*15, DRB4*01, DRB5 |
| 10 | DRB1*03, DRB1*15, DRB3, DRB5 |
| 11 | DRB1*13, DRB1*16, DRB3, DRB5 |
| 12 | DRB1*03, DRB1*07, DRB3, DRB4 |
| 13 | DRB1*03, DRB1*10, DRB3 |
| 14 | DRB1*04, DRB1*09, DRB4*01 |
| 15 | DRB1*09, DRB1*15, DRB4*01, DRB5 |
| 16 | DRB1*03, DRB1*08, DRB3 |
| 17 | DRB1*08, DRB1*15, DRB5 |
| 18 | DRB1*13およびDRB1*14またはDRB13, DRB3 |
| 19 | DRB1*07, DRB4*01 |
| 20 | DRB1*07, DRB1*16, DRB4*01, DRB5 |

20

30

【 0 0 9 0 】

図16から、ヒト化CAMPATH 1Hが3名の健常個体（ドナー14、17、および19）において有意な（ $P < 0.05$ ）増殖応答（非処置対照に対するcpm）を誘導したことが示される。しかし、ドナー14および17のT細胞のみが、それぞれ4.2および2.5という有意に高い（ $SI > 2$ ）刺激指数を生じた。ドナー19の応答は、刺激指数が本実験の閾値設定よりもかなり低い（ SI 約1.5）ために除外した。ドナー8については、非処置対照で400cpm未満しか得られなかったため、本研究から除外した。重要なことには、どのドナーも改変DIVHv5/DIVKv2抗体に

40

【 0 0 9 1 】

このように、ヒト化CAMPATH 1H抗体は、特定のMHCクラスIIアロタイプを有する一部のヒト患者においてT細胞依存性液性免疫応答（親和性成熟しアイソタイプスイッチした抗CAMPATH 1H抗体によって特徴づけられる）を誘導する可能性を有する。この知見は、少なくとも2名の健常個体（ドナー14および17）において、抗原処理されたCAMPATH 1H（成熟DCにより提示される）による処理に反応してT細胞活性化が生じたというエキスピボT細胞アッセイにより支持された。抗原処理された改変DIVHv5/DIVKv2抗体を用いてエキスピボT細胞応答を比較した結果、試験したいずれのドナーにおいても抗原処理されたこの抗体はT細胞増殖を十分に誘導し得ないことが示された。これらのデータから、改変抗体は、ヒ

50

ト化CAMPATH-1Hに代替した場合、特に反復投与が必要な適応症に使用する場合に、治療分子の改善をもたらす可能性が高いことが実証される。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】 改変重鎖、「camp VH」の例示的なベクターを示す。dhfrはジヒドロ葉酸還元酵素選択であり；CMV proはCMV IEプロモーターであり；pAはポリAであり；Amp Rはアンピシリン耐性である。

【図2】 改変軽鎖、「camp VL」の例示的なベクターを示す。Neoはネオマイシン（G418）選択であり；CMV proはCMV IEプロモーターであり；pAはポリAであり；Amp Rはアンピシリン耐性である。

10

【図3】 改変重鎖可変領域DIVHv1のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図4】 改変重鎖可変領域DIVHv2のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図5】 改変重鎖可変領域DIVHv3のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図6】 改変重鎖可変領域DIVHv4のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図7】 改変重鎖可変領域DIVHv5のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図8】 改変軽鎖可変領域DIVKv1のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図9】 改変軽鎖可変領域DIVKv2のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図10】 改変軽鎖可変領域DIVKv3のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図11】 改変軽鎖可変領域DIVKv4のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図12】 改変軽鎖可変領域DIVKv5のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

20

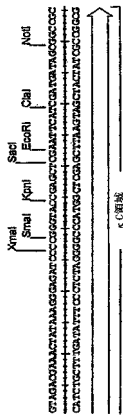
【図13】 ヒトIgG1定常領域のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

【図14】 ヒト定常領域のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

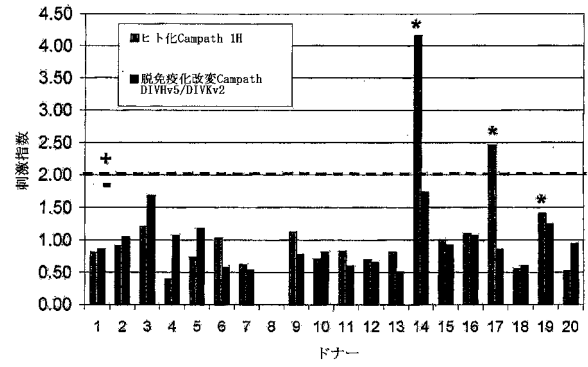
【図15】 改変DIVHv5/DIVKv2抗体を用いた、別法の樹状細胞：T細胞手順による予備研究の結果を要約する。

【図16】 ヒト化CAMPATH 1H抗体および改変DIVHv5/DIVKv2抗体のT細胞免疫原性（樹状細胞：T細胞アッセイ）の比較を要約する。cpm値はスチューデントのT検定を用いて非処置対象と比較した（*）（ $P < 0.05$ ）。

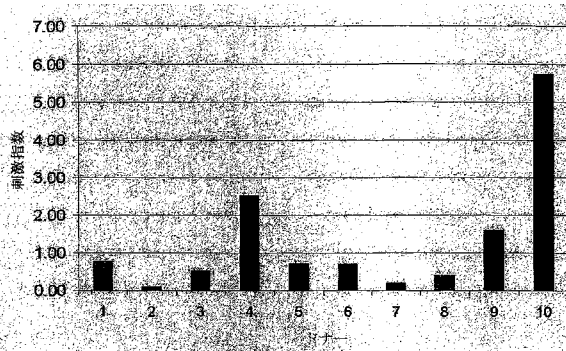
【 14 - 10】



【 16】



【 15】



【配列表】

0004804357000001.app

フロントページの続き

| | | | |
|---------------|-----------|---------------|-------|
| (51)Int.Cl. | | F I | |
| A 6 1 P 29/00 | (2006.01) | A 6 1 P 29/00 | 1 0 1 |
| A 6 1 P 19/02 | (2006.01) | A 6 1 P 19/02 | |
| A 6 1 P 27/02 | (2006.01) | A 6 1 P 27/02 | |
| A 6 1 P 9/00 | (2006.01) | A 6 1 P 9/00 | |
| A 6 1 P 17/00 | (2006.01) | A 6 1 P 17/00 | |
| A 6 1 P 1/04 | (2006.01) | A 6 1 P 1/04 | |
| A 6 1 P 37/06 | (2006.01) | A 6 1 P 37/06 | |

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 カール フランシス ジェイ .

英国 アバセンシャ バルメディー ザ ホールディングス パーチラー

(72)発明者 ハミルトン アニータ エイ .

英国 アバディーン キングス ゲイト 1 3 0

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 米国特許第 0 6 5 6 9 4 3 0 (U S , B 1)

国際公開第 2 0 0 3 / 0 4 2 2 4 7 (W O , A 1)

国際公開第 9 9 / 0 5 3 0 3 8 (W O , A 1)

欧州特許出願公開第 0 0 6 9 9 7 5 5 (E P , A 1)

国際公開第 9 8 / 0 5 2 9 7 6 (W O , A 1)

国際公開第 0 0 / 0 3 4 3 1 7 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 14/00-19/00

C12N 15/00-15/90

PubMed

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq