

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-519580

(P2005-519580A)

(43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 11/00</b>	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 5
<b>A 6 1 P 31/04</b>	A 6 1 P 11/00	4 H O 4 5
<b>C O 7 K 16/12</b>	A 6 1 P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-588936 (P2002-588936)	(71) 出願人	500379417
(86) (22) 出願日	平成14年5月16日 (2002.5.16)		アルバート アインシュタイン カレッジ
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月17日 (2003.11.17)		オブ メディシン オブ イエシバ ユ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/018363		ニバーシティ
(87) 国際公開番号	W02002/092017		アメリカ合衆国 1 0 4 6 1 ニューヨー
(87) 国際公開日	平成14年11月21日 (2002.11.21)		ク州、ブロンクス、モリス パーク アベ
(31) 優先権主張番号	60/291,492		ニュー 1 3 0 0
(32) 優先日	平成13年5月16日 (2001.5.16)	(71) 出願人	598015316
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アブジェニックス インコーポレイテッド
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレ
			モント ダムバートン サークル 7 6 0
			1
		(74) 代理人	100107489
			弁理士 大塩 竹志
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 非ヒト動物由来のヒト抗肺炎球菌抗体

## (57) 【要約】

本明細書中に提供される発明は、*Streptococcus pneumoniae* 荚膜多糖 ( P P S - 3 ) に特異的に結合する、非ヒト動物中で産生されたヒト抗体を提供する。本発明はさらに、非ヒト動物中で抗体を作製するための方法、ならびにハイブリドーマおよび組換え宿主細胞系を含む細胞中で抗体を発現するための方法を提供する。この抗体を含む、キットおよび薬学的組成物もまた、本明細書中に記載される薬学的組成物を患者に投与することによって、*S. pneumoniae* 感染またはこのような感染によって引き起こされる状態もしくは障害を処置、阻害または予防する方法に加えて提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

*Streptococcus pneumoniae* 血清型 3 (*S. pneumoniae* PPS-3) の莢膜多糖を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体またはフラグメントは、以下：

(a) 配列番号 1 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 1 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 31 ~ 104 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 1 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖アミノ酸配列を含む、抗体または抗原結合フラグメント。

10

## 【請求項 2】

*Streptococcus pneumoniae* 血清型 3 (*S. pneumoniae* PPS-3) の莢膜多糖を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体またはフラグメントは、以下：

(a) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖アミノ酸配列を含む、抗体または抗原結合フラグメント。

20

## 【請求項 3】

軽鎖アミノ酸配列をさらに含み、該軽鎖アミノ酸配列が、以下：

(a) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

30

## 【請求項 4】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 1 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 1 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 31 ~ 104 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 1 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子

40

## 【請求項 5】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 1 に示される DNA 配列；

(b) 配列番号 1 のうちの CDR 1 ~ CDR 3 をコードする DNA 配列；ならびに

(c) 配列番号 1 のうちの CDR 1、CDR 2 および CDR 3 をコードする DNA 配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

## 【請求項 6】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

50

(b) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列 ; ならびに

(c) 配列番号 2 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列  
からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 7】

核酸分子であって、以下 :

(a) 配列番号 2 に示される DNA 配列 ;

(b) 配列番号 2 のうちの CDR 1 ~ CDR 3 をコードする DNA 配列 ; ならびに

(c) 配列番号 2 のうちの CDR 1、CDR 2 および CDR 3 をコードする DNA 配列  
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

10

【請求項 8】

*Streptococcus pneumoniae* 血清型 3 (*S. pneumoniae* PPS-3) の莢膜多糖を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体またはフラグメントは、以下 :

(a) 配列番号 3 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列 ;

(b) 配列番号 3 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 31 ~ 108 のアミノ酸配列 ; ならびに

(c) 配列番号 3 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖アミノ酸配列を含む、抗体または抗原結合フラグメント。

20

【請求項 9】

*Streptococcus pneumoniae* 血清型 3 (*S. pneumoniae* PPS-3) の莢膜多糖を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体またはフラグメントは、以下 :

(a) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列 ;

(b) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列 ; ならびに

(c) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖アミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 10】

軽鎖アミノ酸配列をさらに含み、該軽鎖アミノ酸配列が、以下 :

(a) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列 ;

(b) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列 ; ならびに

(c) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

40

【請求項 11】

核酸分子であって、以下 :

(a) 配列番号 3 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列 ;

(b) 配列番号 3 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 31 ~ 108 のアミノ酸配列 ; ならびに

(c) 配列番号 3 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

50

からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 12】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 3 に示される DNA 配列；

(b) 配列番号 3 のうちの C D R 1 ~ C D R 3 をコードする DNA 配列；ならびに

(c) 配列番号 3 のうちの C D R 1、C D R 2 および C D R 3 をコードする DNA 配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 13】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 4 に示される DNA 配列によってコードされる C D R 1、C D R 2 および C D R 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 14】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 4 に示される DNA 配列；

(b) 配列番号 4 のうちの C D R 1 ~ C D R 3 をコードする DNA 配列；ならびに

(c) 配列番号 4 のうちの C D R 1、C D R 2 および C D R 3 をコードする DNA 配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 15】

*Streptococcus pneumoniae* 血清型 3 (*S. pneumoniae* PPS-3) の莢膜多糖を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体またはフラグメントは、以下：

(a) 配列番号 5 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 5 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 31 ~ 104 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 5 に示される DNA 配列によってコードされる、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖アミノ酸配列を含む、抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 16】

*Streptococcus pneumoniae* 血清型 3 (*S. pneumoniae* PPS-3) の莢膜多糖を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体またはフラグメントは、以下：

(a) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされる、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖アミノ酸配列を含む、抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 17】

軽鎖アミノ酸配列をさらに含み、該軽鎖アミノ酸配列が、以下：

(a) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

10

20

30

40

50

(c) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列  
 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 18】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 5 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 5 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 31 ~ 104 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 5 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 19】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 5 に示される DNA 配列；

(b) 配列番号 5 のうちの CDR 1 ~ CDR 3 をコードする DNA 配列；ならびに

(c) 配列番号 5 のうちの、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 をコードする DNA 配列

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 20】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 6 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 21】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 6 に示される DNA 配列；

(b) 配列番号 6 のうちの CDR 1 ~ CDR 3 をコードする DNA 配列；ならびに

(c) 配列番号 6 のうちの、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 をコードする DNA 配列

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 22】

*Streptococcus pneumoniae* 血清型 3 (*S. pneumoniae* PPS-3) の莢膜多糖を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体またはフラグメントは、以下：

(a) 配列番号 7 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 7 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 31 ~ 105 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 7 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖アミノ酸配列を含む、抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 23】

*Streptococcus pneumoniae* 血清型 3 (*S. pneumoniae* PPS-3) の莢膜多糖を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメント

10

20

30

40

50

であって、ここで、該抗体またはフラグメントは、以下：

(a) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖アミノ酸配列を含む、抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 24】

軽鎖アミノ酸配列をさらに含み、該軽鎖アミノ酸配列が、以下：

10

(a) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 25】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 7 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

20

(b) 配列番号 7 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 31 ~ 105 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 7 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 26】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 7 に示される DNA 配列；

(b) 配列番号 7 のうちの CDR 1 ~ CDR 3 をコードする DNA 配列；ならびに

30

(c) 配列番号 7 のうちの、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 をコードする DNA 配列

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 27】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされるアミノ酸配列の残基 24 ~ 97 のアミノ酸配列；ならびに

(c) 配列番号 8 に示される DNA 配列によってコードされる、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 のアミノ酸配列

40

からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 28】

核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 8 に示される DNA 配列；

(b) 配列番号 8 のうちの CDR 1 ~ CDR 3 をコードする DNA 配列；ならびに

(c) 配列番号 8 のうちの、CDR 1、CDR 2 および CDR 3 をコードする DNA 配列

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 29】

50

発現制御配列に作動可能に連結された、請求項 4 ~ 7、11 ~ 14、18 ~ 21 または 25 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の核酸分子で形質転換された、宿主細胞。

【請求項 31】

*S. pneumoniae* PPS-3 を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントを産生するための方法であって、請求項 30 に記載の宿主細胞を培養する工程を包含する、方法。

【請求項 32】

請求項 4 ~ 7、11 ~ 14、18 ~ 21 または 25 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の核酸分子で形質転換された、宿主細胞。 10

【請求項 33】

*S. pneumoniae* PPS-3 を特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメントを産生するための方法であって、請求項 32 に記載の宿主細胞を培養する工程を包含する、方法。

【請求項 34】

組成物であって、請求項 1 ~ 3、8 ~ 10、15 ~ 17 または 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。

【請求項 35】

以下：

20

(a) 診断剤；および

(b) 治療剤

からなる群より選択される成分をさらに含む、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

1 以上のさらなる抗体またはその抗原結合フラグメントをさらに含み、ここで該さらなる抗体が、血清型 3 以外の *S. pneumoniae* 血清型を特異的に結合する、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 37】

キットであって、請求項 1 ~ 3、8 ~ 10、15 ~ 17 または 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、キット。 30

【請求項 38】

被験体における、*S. pneumoniae* 血清型 3 感染によって引き起こされる状態もしくは障害を予防するかまたは該状態もしくは障害の重篤度を低減するための方法であって、請求項 1 ~ 3、8 ~ 10、15 ~ 17 もしくは 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは請求項 34 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の組成物の有効量を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 39】

前記被験体が、免疫無防備状態にある、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

40

前記被験体が、HIV-1 に感染している、請求項 38 または 39 に記載の方法。

【請求項 41】

*S. pneumoniae* 血清型 3 による感染またはこのような感染によって引き起こされる状態もしくは障害に対する被験体の耐性を増大させるための方法であって、請求項 1 ~ 3、8 ~ 10、15 ~ 17 もしくは 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはそのフラグメントまたは請求項 34 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 42】

被験体における *S. pneumoniae* 血清型 3 細胞に対する補体の沈着を増強するための方法であって、請求項 1 ~ 3、8 ~ 10、15 ~ 17 もしくは 22 ~ 24 のいずれか 50

1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたは請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 4 3】

被験体における *S. pneumoniae* 血清型 3 の貪食作用を増大させるための方法であって、請求項 1 ~ 3、8 ~ 10、15 ~ 17 もしくは 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはそのフラグメントまたは請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 4 4】

前記抗 *S. pneumoniae* PPS - 3 抗体またはその抗原結合フラグメントが、別の治療剤の投与とともに投与される、請求項 3 8 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 4 5】

*S. pneumoniae* 血清型 3 感染を検出するための方法であって、感染した疑いのある被験体由来のサンプルを、請求項 1 ~ 3、8 ~ 10、15 ~ 17 または 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程、および *S. pneumoniae* 血清型 3 に対する該抗体またはフラグメントの結合を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 4 6】

*S. pneumoniae* に感染した被験体における *S. pneumoniae* 血清型を決定するための方法であって、該被験体から単離された *S. pneumoniae* を、請求項 1 ~ 3、8 ~ 10、15 ~ 17 または 22 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分と接触させる工程、および結合の存在または不存在を検出する工程を包含する、方法。

20

【請求項 4 7】

*S. pneumoniae* 血清型 3 (PPS - 3) を莢膜多糖を特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合フラグメントであって、ここで、該抗体または抗原結合フラグメントは、請求項 3、10、17 または 24 のいずれか 1 項に記載の抗体と同じ PPS - 3 エピトープを結合する、抗体または抗原結合フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

(発明の技術分野)

本発明は、*Streptococcus pneumoniae* 感染およびこのような感染によって引き起こされる状態を処置または予防するための組成物および方法に関する。特に、本発明は、*S. pneumoniae* 莢膜多糖 (PPS - 3) に特異的に結合するヒト抗体およびこの抗体をコードする核酸分子に関する。本発明はまた、*S. pneumoniae* PPS - 3 に対するヒト抗体の、単離された重鎖免疫グロブリン分子および単離された軽鎖免疫グロブリン分子に関する。本発明はさらに、このような重鎖免疫グロブリン分子および軽鎖免疫グロブリン分子をコードする核酸分子に関する。本発明はさらに、キメラ抗体、二重特異性抗体、誘導体化抗体、単鎖抗体または融合タンパク質の一部である、*S. pneumoniae* PPS - 3 に対するヒト抗体を含む。本発明はまた、*S. pneumoniae* 感染を検出またはモニタリングする方法に関する。本発明はさらに、非ヒト動物中でこの抗体を作製するための方法、ならびにハイブリドーマおよび組換え宿主細胞系を含む細胞株中でこの抗体を発現するための方法に関する。本発明はまた、この抗体を含む、キットおよび薬学的組成物に関する。本発明はさらに、本明細書中に記載の組成物のいずれかを患者に投与することによって、*S. pneumoniae* 感染およびこのような感染によって引き起こされる状態を処置または予防する方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

50



*Streptococcus pneumoniae* は、重要なヒト病原体であり、そしてヒトにおける罹病率および死亡率の主な原因である。入手可能な肺炎球菌ワクチンは、大人および小児に疾患を引き起こす、*S. pneumoniae* の最も一般的な血清型の精製された PPS からなる。肺炎球菌ワクチン接種の基礎的な理論は、肺炎球菌莢膜多糖 (PPS) に対する型特異的抗体が防御のために必要とされるということである。

【0003】

しかし、PPS は、侵襲性の肺炎球菌疾患を発症する危険性が最も高い多くの個体（例えば、幼い小児および免疫無防備状態の個体）において免疫原性に乏しい。乳児および幼い小児において PPS の免疫原性が乏しいことは、PPS - タンパク質結合体ワクチンによって部分的に克服されているが、結合体化肺炎球菌ワクチンおよび非結合体化肺炎球菌ワクチンは両方とも、多くの成人において免疫原性に乏しい。肺炎球菌ワクチンの応答が乏しいことは、抗体の欠損または不全を有する個体において最も一般的であるが、この現象を担う機構は、未知である。従って、このような個体の受動免疫のためのヒト抗体についての差し迫った必要性が存在する。

10

【0004】

現在、限定された数の PPS 血清型に対する限定された数のヒトモノクローナル抗体が、ワクチン接種したレシピエント由来のリンパ球のエプスタイン - バーウイルス形質転換によって作製されている。エプスタイン - バーウイルス形質転換は困難であり、予測不可能である。

【0005】

本発明者らは、*S. pneumoniae* PPS - 3 に特異的なヒト抗体を提供する。特に、本発明者らは、*S. pneumoniae* PPS - 3 を認識するモノクローナル抗体 1F10 / 7C5、3H1、1A2 および A7 を提供する。モノクローナル抗体 1F10 / 7C5、1A2 および A7 は、受動免疫において、*S. pneumoniae* チャレンジを有効に防御する。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

（発明の簡単な要旨）

本発明は、*S. pneumoniae* 莢膜多糖 (PPS - 3) に特異的に結合する単離されたヒト抗体を提供する。本発明はさらに、非ヒト動物中でこの抗体を作製するための方法、ならびにハイブリドーマおよび組換え宿主細胞系を含む細胞系におけるこの抗体の発現によってこの抗体を作製するための方法を提供する。本発明はまた、この抗体を含む、キットおよび薬学的組成物を提供する。さらに、本発明は、本明細書中に記載される薬学的組成物を患者に投与することによって、*S. pneumoniae* 感染およびこのような感染によって引き起こされる状態を処置または予防する方法を提供する。

30

【0007】

（発明の詳細な説明）

本発明は、*S. pneumoniae* PPS - 3 に特異的に結合する完全ヒト抗体またはその抗原結合部分を提供する。好ましい実施形態において、完全ヒト抗体は、モノクローナルである。他の好ましい実施形態としては、この抗体の重鎖および軽鎖の可変領域の全てまたは一部をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、ならびに抗体の重鎖および軽鎖のこれらの領域を含むアミノ酸配列、そして特に、相補性決定領域 (CDR) を含む重鎖および軽鎖配列に対応する配列が挙げられる。本明細書中に開示される抗体と同様の結合特性を有する抗体および同様の機能性を有する抗体（または他のアンタゴニスト）もまた提供される。このような免疫グロブリン分子およびモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマもまた提供される。

40

【0008】

本明細書中で他に規定されない限り、本発明に関して使用される科学用語および技術用語は、当業者に一般的に理解されている意味を有する。さらに、文脈からそうでないこと

50

が必要とされない限り、単数形の用語は複数を含み、そして複数形の用語は、単数の用語を含む。一般的に、本明細書中に記載される細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションに関連して使用される専門用語およびそれらの技術は、当該分野で周知でありかつ通常使用されているものである。本発明の方法および技術は、一般的に、そうでないことが示されない限り、当該分野で周知の従来法に従って、そして本明細書を通して列挙および議論される種々の全体的な参考文献およびより詳細な参考文献に記載されるように実施される。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y. (1989)、ならびに Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates (1992)、ならびに Harlow および Lane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (1990) を参照のこと（これらは、本明細書中で参考として援用される）。酵素反応および精製技術は、当該分野で一般的に達成されるかまたは本明細書中に記載されるように、製造者の指示書に従って実施される。本明細書中に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医化学および薬化学に関連して使用される専門用語、それらの研究手順、およびそれらの技術は、当該分野で周知であり一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、薬学的調製物、処方物、および送達、ならびに患者の処置についての標準的な技術が使用される。

#### 【0009】

以下の用語は、本明細書中で使用されている以下の一般的な意味を有することが意図される。

#### 【0010】

「Bリンパ球細胞またはその子孫」は、Bリンパ球系統に由来するかまたはそれらになることが運命づけられた任意の細胞をいう。例としては、最初期Bリンパ球幹細胞から始まってメモリーB細胞、プラズマ細胞、およびインビトロで生成される任意のハイブリドーマを通るB細胞発達経路における全てのBリンパ球が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0011】

「二特異性抗体」は、2つの別々の抗原に対する親和性を有する単一の抗体である。例えば、二特異性抗体は、重鎖および軽鎖の1つの組み合わせを用いて、S. pneumoniae PPS-3を認識し得、そして第1の組み合わせに結合された重鎖および軽鎖の第2の組み合わせを用いて白血球細胞表面マーカーを認識し得る。例えば、McCormickら、J. Immunol. 158: 3474-82 (1997) を参照のこと。

#### 【0012】

「キメラ抗体」は、別のタンパク質由来のアミノ酸配列を含むようそれらの当初の形態から変更された抗体である。キメラ抗体は、当初の抗体アミノ酸配列の少なくとも一部（代表的に、抗原結合領域（Fab）を含む部分）を保持する。キメラ抗体の例としては、二特異性抗体および他の非免疫グロブリンタンパク質配列との融合体が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0013】

「サイトカイン」は、一般的に、免疫系のシグナル伝達分子をいう。サイトカインとしては、インターロイキン（IL）、トランスフォーミング増殖因子（TGF）、腫瘍壊死因子（TNF）、リンホトキシン（LT）、インターフェロン、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージCSF、顆粒球CSF、および遊走阻害因子が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0014】

「誘導体化する」は、非免疫グロブリン剤に免疫グロブリン分子を結合するプロセスをいう。誘導体化剤の例としては、毒素、補体、抗体、ペプチド、多糖、脂質、有機ポリマー、放射標識、および無機化合物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0015】

「発現制御配列」は、特定の条件下または特定の細胞における遺伝子配列の誘導性発現または構成性発現を可能にする配列をいう。発現制御配列の調節する細胞プロセスの例としては、遺伝子の転写、タンパク質の翻訳、メッセンジャーRNAのスプライシング、免疫グロブリンアイソタイプのスイッチング、タンパク質のグリコシル化、タンパク質の切断、タンパク質の分泌、細胞内タンパク質局在化、および細胞外タンパク質ホーミングが挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0016】

「融合タンパク質」は、2つ以上の異なるタンパク質のアミノ酸配列を含むキメラタンパク質をいう。代表的に、融合タンパク質は、当該分野で周知のインビトロ組換え技術により生じる。しかし、融合タンパク質は、インビボのクロスオーバー現象または他の組換え現象から生じ得る。

【0017】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチドフラグメント」は、アミノ末端欠失および/またはカルボキシ末端欠失を有するが、残りのアミノ酸配列は、天然に存在する配列における対応する位置と同一であるポリペプチドをいう。フラグメントは、代表的に、少なくとも5、6、8、または10アミノ酸長、好ましくは、少なくとも14アミノ酸長、より好ましくは、少なくとも20アミノ酸長、通常は、少なくとも50アミノ酸長、そしてさらに好ましくは、少なくとも70アミノ酸長である。

20

【0018】

抗体または免疫グロブリン分子のフラグメントまたはアナログは、本明細書の教示に従って、当業者により容易に調製され得る。フラグメントまたはアナログの好ましいアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界付近に生じる。構造的ドメインおよび機能的ドメインは、公開されている配列データベースかまたは独自の配列データベースとのヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列のデータ比較により同定され得る。好ましくは、コンピューターによる比較方法が、公知の構造および/または機能の他のタンパク質において生じる配列モチーフまたは推定タンパク質コンホメーションドメインを同定するために使用される。公知の三次元構造にフォールディングされるタンパク質配列を同定するための方法は、公知である(Bowieら、Science 253:164(1991))。

30

【0019】

好ましいアミノ酸置換は、(1)タンパク質分解に対する感受性を減少する置換、(2)酸化に対する感受性を減少する置換、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変更する置換、および(4)このようなアナログの他の生理化学的特性または機能的特性を与えるかまたは改変する置換である。アナログとしては、天然に存在するペプチド配列以外の配列の種々のムテインが挙げられ得る。例えば、単一または複数のアミノ酸置換(好ましくは、保存的アミノ酸置換)が、天然に存在する配列(好ましくは、分子内接触を形成するドメインの外側のポリペプチドの一部)になされ得る。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造的特徴を実質的に変更するべきではない(例えば、置換アミノ酸は、親配列において生じるヘリックスを破壊するか、または親配列を特徴付ける他の型の二次構造を破壊する傾向を有するべきではない)。当該分野で認識されているポリペプチドの二次構造および三次構造の例は、Proteins, Structure and Molecular Principles(Creighton編、W.H. Freeman and Company、New York(1984)); Introduction to Protein Structure(C. Branden and J. Tooze編、Garland Publishing、New York、N.Y.(1991)); ならびにThorntonら、Nature 354:105(1991)。

40

50

1) に記載される (これらは各々、本明細書中に参考として援用される)。

【0020】

本明細書中で使用される場合、20個の慣用アミノ酸およびそれらの略号は、従来の使用法に従う。例えば、Immunology - A Synthesis (第2版、E. S. GolubおよびD. R. Gren編、Sinauer Associates、Sunderland、Mass. (1991))を参照のこと (これは、本明細書中で参考として援用される)。20個の慣用アミノ酸、非天然アミノ酸 (例えば、 $\alpha$ -、 $\beta$ -二置換アミノ酸)、N-アルキルアミノ酸、乳酸、および他の慣用とは異なるアミノ酸の立体異性体 (例えば、D-アミノ酸) もまた、本発明のポリペプチドに適切な成分であり得る。従来とは異なるアミノ酸の例としては：4-ヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタメート、 $\epsilon$ -N,N,N-トリメチルリジン、 $\epsilon$ -N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、s-N-メチルアルギニン、ならびに他の同様のアミノ酸およびイミノ酸 (例えば、4-ヒドロキシプロリン) が挙げられる。標準的な用法および慣習に従って、本明細書中で使用されるポリペプチド表記において、左手方向がアミノ末端方向であり、そして右手方向がカルボキシ末端方向である。

【0021】

「ヒト免疫グロブリン分子」は、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列によりコードされる免疫グロブリンタンパク質をいう。

【0022】

「ヒトモノクローナル抗体」は、同一の特異性を有するヒト抗体の集団のメンバーである抗体をいう。ヒト抗体の集団は、ハイブリドーマまたは他の不死化細胞株において、ならびに外因性ヒト抗体遺伝子配列を発現する組換え細胞株において産生され得る。

【0023】

「免疫無防備状態の患者」は、外来抗原または因子に対するその免疫応答が、例えば、疾患 (例えば、AIDS) によって、侵襲性の外科手術によって、または他の状態の処置と組み合わせた薬物治療によって損傷している患者をいう (例えば、器官移植患者)。

【0024】

「標識」は、上記免疫グロブリンに結合された、免疫グロブリンとは通常関係しない機能的特徴を融合させた任意の分子をいう。標識は、免疫グロブリンの化学的改変、二特異性免疫グロブリンの2つのFab領域のうちの1つによる標識の認識、第3の薬剤に対する親和性 (例えば、アビジン/ビオチン相互作用)、放射標識を介して、または組換え発現される融合タンパク質として結合され得る。標識は、臨床目的または研究目的のための分子または放射性タグとして、あるいはS. pneumoniae感染と戦う薬剤 (例えば、毒素または補体タンパク質) として機能し得る。標識の他の例としては、酵素、蛍光分子、磁気標識、エピトープタグ (例えば、H. influenzaヘマグルチニン)、抗体、補体タンパク質、およびサイトカインが挙げられ得る。

【0025】

「外科手術患者」は、代表的に真皮の穿刺または切開を伴う侵襲性の外科手術手順に供される任意の患者をいう。

【0026】

「毒素」は、抗体が結合する細胞を死滅させる目的で、抗体に結合され得るタンパク質または非タンパク質化合物をいう。毒素の例としては、補体、抗体、ペプチド、多糖、脂質、有機ポリマー、放射標識、および無機化合物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0027】

「ベクター」は、目的の核酸配列を、それらのネイティブ細胞の外側でクローニング、増殖、変異、または発現することを可能にする核酸分子をいう。しばしば、ベクターは、特定の条件下または特定の細胞において、遺伝子配列の発現を制御することを可能にする配列を有する。

【0028】

10

20

30

40

50

本発明の抗体または抗体部分を発現するために、上記で記載されるようにして獲得される、部分長または全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAは、その遺伝子が、転写制御配列および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように発現ベクターに挿入される。発現ベクターとしては、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、YAC、EBV由来エピソームなどが挙げられる。抗体遺伝子は、ベクター中の転写制御配列および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節する、それらの意図する機能を提供するように、ベクター中に連結される。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するよう選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別個のベクターに挿入され得る。好ましい実施形態において、両方の遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法（例えば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的制限部位の連結、または制限部位が存在しない場合は、平滑末端連結）によって発現ベクターに挿入される。

10

#### 【0029】

便利なベクターは、機能的に完全なヒト $C_H$ または $C_L$ 免疫グロブリン配列をコードし、適切な制限部位が、任意の $V_H$ 配列または $V_L$ 配列が上記のように容易に挿入および発現され得るように操作されたベクターである。このようなベクターにおいて、スプライシングは、通常、挿入されたJ領域におけるスプライスドナー部位とヒトCドメインの前に存在するスプライスアクセプター部位との間、およびヒト $C_H$ エキソン中に生じるスプライス領域にも生じる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域の下流のネイティブの染色体部位で生じる。組換え発現ベクターはまた、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を容易にするシグナルペプチドをコードし得る。抗体鎖の遺伝子は、ベクター中にクローニングされ、その結果、シグナルペプチドは、免疫グロブリン鎖のアミノ末端にインフレームで連結され得る。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。

20

#### 【0030】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。発現ベクターの設計（調節配列の選択を含む）は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現レベルなどのような因子に依存し得ることが、当業者により理解される。哺乳動物宿主細胞発現に好ましい調節配列としては、哺乳動物細胞において高レベルのタンパク質発現を指向するウイルスエレメント（例えば、レトロウイルスLTR由来のプロモーターおよび/またはエンハンサー、サイトメガロウイルス（CMV）由来のプロモーターおよび/またはエンハンサー（例えば、CMVプロモーター/エンハンサー）、シミアンウイルス40（SV40）由来のプロモーターおよび/またはエンハンサー（例えば、SV40プロモーター/エンハンサー）、アデノウイルス由来のプロモーターおよび/またはエンハンサー（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP））、ポリオーマ由来のプロモーターおよび/またはエンハンサー、ならびにネイティブ免疫グロブリンおよびアクチンプロモーターのような強力な哺乳動物プロモーターが挙げられる。ウイルス調節エレメントおよびその配列のさらなる詳細については、例えば、Stinsonによる米国特許第5,168,062号、Bellらによる米国特許第4,510,245号、およびSchaffnerらによる米国特許第4,968,615号を参照のこと。

30

40

#### 【0031】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、さらなる配列（例えば、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）および選択マーカー遺伝子）を有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが組み込まれた宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号、および同第5,179,017号、全てAxelを参照のこと）。例えば、代表的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターが組み込まれた宿主細胞における薬物（例えば、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキセート）に対する耐性を与える。

50

好ましい選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子 (メトトレキセート選択 / 増幅を有する dhfr - 宿主細胞における使用のため)、neo 遺伝子 (G418 選択のため)、およびグルタメートシンセターゼ遺伝子が挙げられる。

#### 【0032】

抗 PPS-3 抗体をコードする核酸分子およびこれらの核酸分子を含むベクターは、適切な哺乳動物宿主細胞のトランスフェクションのために使用され得る。形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の公知の手段により得る。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は、当該分野で周知であり、これらとしては、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリボソーム中へのカプセル化、および核への DNA の直接マイクロ注入が挙げられる。さらに、核酸分子は、ウイルスベクターによって哺乳動物細胞に導入され得る。細胞を形質転換する方法は、当該分野で周知である。例えば、米国特許第 4,399,216 号、同第 4,912,040 号、同第 4,740,461 号、および同第 4,959,455 号を参照のこと (これらの特許は、本明細書中に参考として援用される)。

10

#### 【0033】

発現のために宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該分野で周知であり、これらとしては、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞株が挙げられる。これらとしては、特に、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NSO、SP2 細胞、HeLa 細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、サル腎臓細胞 (COS)、ヒト肝細胞癌細胞 (例えば、Hep G2)、A549 細胞、および多くの他の細胞株が挙げられる。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有するかの決定を通して選択される。使用され得る他の細胞株は、昆虫細胞株 (例えば、Sf9 細胞) である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞中に導入される場合、抗体は、宿主細胞中での抗体の発現を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによるか、または、より好ましくは、宿主細胞が培養される培養培地への抗体の分泌により産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培養培地から回収され得る。

20

#### 【0034】

さらに、産生細胞株からの本発明の抗体 (またはそれ由来の部分) の発現は、多くの公知の技術を用いて増強され得る。例えば、グルタミンシンセターゼ遺伝子発現系 (GS 系) は、特定の条件下で発現を増強するための一般的なアプローチである。GS 系は、全体または一部が、欧州特許第 0216846 号、同第 0256055 号、および同第 0323997 号、ならびに欧州特許出願第 89303964.4 号と組み合わせて、議論される。

30

#### 【0035】

「作動可能に連結された」配列としては、目的の遺伝子を制御するために、目的の遺伝子と連続する発現制御配列およびイントランまたは離れて作用する発現制御配列の両方を含む。本明細書中で使用される場合、用語「発現制御配列」は、それらが連結されたコード配列の発現およびプロセッシングをもたらすのに必要とされるポリヌクレオチド配列をいう。発現制御配列としては、適切な転写開始配列、終止配列、プロモーター配列、およびエンハンサー配列；効果的な RNA プロセッシングシグナル (例えば、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル)；細胞質 mRNA を安定化する配列；翻訳効率を増強する配列 (すなわち、Kozak コンセンサス配列)；タンパク質の安定性を増強する配列；および所望の場合、タンパク質の分泌を増強する配列が挙げられる。このような制御配列の性質は、宿主生物に依存して変化し；原核生物において、このような制御配列としては、一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終止配列が挙げられ；真核生物においては、一般的に、このような制御配列としては、プロモーターおよび転写終止配列が挙げられる。用語「制御配列」は、最小限で、その存在が発現およびプロセッシングのために必須である全ての成分を含むことが意図され、そしてまた、その存在が有利とな

40

50

る付加的成分（例えば、リーダー配列および融合パートナー配列）が挙げられ得る。

#### 【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）は、組換え発現ベクターが導入された細胞をいうことが意図される。このような用語は、特定の対象の細胞だけでなく、このような細胞の子孫もいうことが意図されることが理解されるべきである。特定の改変が、変異または環境的影響のいずれかに起因して、その後の世代において生じ得るので、このような子孫は、実際は、親細胞と同一でないかもしれないが、本明細書中で使用される場合、なおも、用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

#### 【0037】

「Xenomouse<sup>TM</sup>」は、相同的に標的化された内因性免疫グロブリン遺伝子座を有し、内因性マウス免疫グロブリンを発現しないようにされているが、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の実質的に一部分を保有するマウスをいう。Xenomouse<sup>TM</sup>系統のマウスは、ヒト免疫グロブリン遺伝子の体細胞再構成、ヒト免疫グロブリン可変領域の超変異、および免疫グロブリンアイソタイプのスイッチングが可能である。従って、Xenomouse<sup>TM</sup>系統のマウスは、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を用いた抗原性チャレンジに対する有効な液性応答をマウントし得る。得られる抗体は、完全ヒト抗体であり、そしてそれら動物自体から、この動物から抽出された培養細胞から、またはXenomouse<sup>TM</sup> Bリンパ球株またはその子孫から作製されたハイブリドーマから単離され得る。さらに、特異的な抗原性チャレンジに対して惹起された免疫グロブリンをコードする、再配置されたヒト遺伝子配列は、当該分野で公知の組換え手段により単離され得る。

#### 【0038】

##### （抗体構造）

基本的な抗体構造単位は、テトラマーを構成する。各テトラマーは、ポリペプチド鎖の2つの対で構成され、各々の対は、1つの「軽鎖」（約25 kDa）および1つの「重鎖」（約50～70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約100～110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、軽鎖および軽鎖として分類される。重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、または $\alpha$ として分類され、そしてそれぞれ、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のアイソタイプを規定する。軽鎖および重鎖において、可変領域および定常領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域により連結され、重鎖はまた、約10以上のアミノ酸の「D」領域を含む。一般的には、Immunology、Ch. 4 (Roitt, Iら編、第6版、Harcourt Publishers Ltd.、London (2001))を参照のこと（全ての目的のために、その全体が参考として援用される）。各軽鎖/重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。従って、インタクトなIgG抗体は、2つの結合部位を有する。二機能性抗体または二特異性抗体における場合を除いて、2つの結合部位は、同一である。

#### 【0039】

全ての鎖は、3つの超可変領域によって連結された、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の同一の一般的な構造（CDRとも呼ばれる）を示す。各々の対の2つの鎖由来のCDRは、フレームワーク領域により整列され、特異的なエピトープへの結合が可能になる。N末端からC末端に向かって、軽鎖および重鎖の両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interestの定義に従う（Johnson & Wu、Nucl. Acids Res. 29: 205-06 (2001)；またはChothia & Lesk、J. Mol. Biol. 196: 901-17 (1987)；Chothiaら、Nature 342: 878-83 (1989)）。

#### 【0040】

二特異性抗体または二機能性抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖対および2つの異なる結

合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二特異性抗体は、ハイブリドーマの融合または Fab' フラグメントの連結を含む種々の方法によって生成され得る。例えば、Song & Lachmann、Clin. Exp. Immunol. 79: 315-21 (1990); Kostelnyら、J. Immunol. 148: 1547-53 (1992) を参照のこと。さらに、二特異性抗体は、「ダイアボディ (Diabody)」(Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-48 (1993)); または「Janusins」(Traunckerら、EMBO J. 10: 3655-59 (1991) および Traunckerら、Int'l. J. Cancer 補遺 7: 51-52 (1992)) として形成され得る。二特異性抗体の生成は、従来の抗体の生成と比較して、比較的労力の要するプロセスであり得、そして収率および純度は、一般的に、二特異性抗体についてより低い。二特異性抗体は、単一の結合部位を有するフラグメントの形態 (例えば、Fab、Fab'、Fv) では存在し得ないを含み得る。

10

20

30

40

50

#### 【0041】

(非ヒト動物由来のヒト抗体)

マウスまたはラットの可変領域および/または定常領域を有する抗体は、特定の治療要  
とについてヒト抗体よりも有用性が低い。このようなマウスまたはラット由来タンパク質  
の存在は、抗体の迅速なクリアランスを誘導し得るか、または患者による抗体に対する免  
疫応答の生成を誘導し得る。マウスまたはラット由来抗体によるこれらの問題を回避す  
るために、例えば、げっ歯類へのヒト抗体機能の導入を通してヒト化抗体が開発され得るか  
、または完全ヒト抗体が生成され得、その結果、そのげっ歯類は、完全ヒト抗体を生成し  
得る。

#### 【0042】

YAC 中にメガ塩基サイズのヒト遺伝子座をクローニングおよび再構成する能力、なら  
びにそれらをマウス生殖細胞に導入する能力は、非常に大きなまたは大ざっぱにマップさ  
れた遺伝子座の機能的成分を解明するため、およびヒト疾患の有用なモデルを生成するた  
めの強力なアプローチを提供する。さらに、マウス遺伝子座の、それらのヒト等価物によ  
る置換のためのこのような技術の利用は、発達中のヒト遺伝子産物の発現および調節、他  
の系とのそれらのコミュニケーション、ならびに疾患の誘導および進行におけるそれらの  
関連への特有の洞察を提供し得る。

#### 【0043】

このような戦略の重要な実際の適用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」であ  
る。内因性 Ig 遺伝子が不活性化されたマウスへのヒト免疫グロブリン (Ig) 遺伝子座  
の導入は、プログラムされた抗体の発現および集合ならびに B 細胞発達における、それら  
の役割の根底にある機構を研究する機会を提供する。さらに、このような戦略は  
、ヒト疾患における抗体治療の見込みを完全に満たすための重要なマイルストーンである  
完全ヒトモノクローナル抗体 (Mab) の生成のための理想的な供給源を提供し得る。完  
全ヒト抗体は、マウス Mab またはマウス由来 Mab に特有の免疫原性応答およびアレルギー  
性応答を最小限に抑え、従って、投与された抗体の効果および安全性を増大させると  
考えられる。従って、完全ヒト抗体の使用は、潜在的に、反復的な抗体投与が必要とされ  
る、慢性ヒト疾患または再発性ヒト疾患 (例えば、炎症、自己免疫、癌、および細菌感染  
) の処置における、実質的な利点を提供すると考えられる。

#### 【0044】

この目的に対する 1 つのアプローチは、マウス系統を、ヒト Ig 遺伝子座の大きなフラ  
グメントを用いるマウス抗体産生において欠損性となるよう操作することであり、それ  
によって、このようなマウスは、マウス抗体の非存在下でヒト抗体の大きなレパートリー  
を生成する。大きなヒト Ig フラグメントは、大きな可変性の遺伝子多様化ならびに抗体  
産生および発現の適切な調節を保存している。抗体の多様化および選択についてのマウス  
機構、ならびにヒトタンパク質に対する免疫学的寛容の欠如についてのマウス機構を研究  
することにより、これらのマウス系統において再生成されたヒト抗体レパートリーは、目的



の任意の抗原（ヒト抗原を含む）に対する高親和性抗体を生じるはずである。ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する抗原特異的ヒトM a bは、容易に生成および選択され得る。

【0045】

この一般的なストラテジーを、最初のX e n o M o u s e <sup>T M</sup> 系統の生成と関連して実証した。Greenら、Nature Genet. 7: 13 - 21 (1994)を参照のこと。X e n o M o u s e <sup>T M</sup> 系統を、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の、それぞれ、245 kbおよび190 kbの大きさの生殖系列構成フラグメントを含む酵母人工染色体(YAC)で操作した。これらは、コア可変領域配列および定常領域配列を含んだ。同書。ヒトIgを含むYACは、抗体の再構成および発現の両方のためのマウス系と適合性であり、そして不活性化マウスIg遺伝子に置換し得た。このことを、B細胞発達を誘導する能力、完全ヒト抗体の成体様ヒトレポートリーを産生する能力、および抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成する能力により実証した。これらの結果はまた、多数のV遺伝子、付加的な調節エレメント、およびヒトIg定常領域を含むヒトIg遺伝子座のより大きな部分の導入が、感染および免疫に対するヒト体液性応答を特徴とする実質的に完全なレポートリーを再利用し得ることを示唆した。

10

【0046】

Greenらの研究は、最近、新規のX e n o M o u s e <sup>T M</sup> を作製するために、それぞれ、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座のメガ塩基サイズの生殖系列構成YACフラグメントを通じたヒト抗体レポートリーの約80%より多くの誘導に拡大された。M e n d e z ら、Nature Genet. 15: 146 - 56 (1997)およびGreen & Jakobovits、J. Exp. Med. 188: 483 - 95 (1998)を参照のこと（これらの開示は、本明細書中で参考として援用される）。

20

【0047】

このようなアプローチはさらに、米国特許第5,916,771号、同第5,939,598号、同第5,985,615号、同第5,998,209号、同第6,075,181号、同第6,091,001号、同第6,114,598号および同第6,130,364号において議論および記載されている。1991年7月25日に公開されたWO91/10741、1994年2月3日に公開されたWO94/02602、共に1996年10月31日に公開されたWO96/34096およびWO96/33735、1998年4月23日に公開されたWO98/16654、1998年6月11日に公開されたWO98/24893、1998年11月12日に公開されたWO98/50433、1999年9月10日に公開されたWO99/45031、1999年10月21日に公開されたWO99/53049、2000年2月24日に公開されたWO00/09560、および2000年6月29日に公開されたWO00/037504もまた参照のこと。上記特許、出願、および参考文献の各々の開示は、それらの全体において本明細書中で参考として援用される。

30

【0048】

本発明に従う抗体は、好ましくは、挿入されたヒト抗体産生ゲノムの実質的な部分を有するが、内因性のマウス抗体の産生における欠失されているトランスジェニックマウスの利用を通じて調製される。次いで、このようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産生し得、そしてマウス免疫グロブリン分子および抗体の産生が欠失している。同じことを達成するために使用される技術は、上記特許、出願、および参考文献に開示されている。

40

【0049】

このような技術の使用を通して、S . p n e u m o n i a e P P S - 3に対する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を調製した。本質的に、本発明者らは、S . p n e u m o n i a e P P S - 3によってマウスのX e n o M o u s e <sup>T M</sup> 系統を免疫し、S . p n e u m o n i a e P P S - 3抗体を発現するマウス由来の脾臓細胞およびリンパ節細胞（例えば、B細胞）を回収し、このように回収した細胞を、非分泌性骨

50

髄腫細胞と融合して不死化ハイブリドーマ細胞株を調製し、そしてハイブリドーマ細胞株をスクリーニングして *S. pneumoniae* PPS-3 に特異的な抗体を産生する細胞を同定した。

#### 【0050】

本発明に従う抗体はまた、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株において発現され得る。特定の抗体をコードする配列は、適切な宿主細胞の形質転換のために使用され得る。形質転換は、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための任意の公知の方法（例えば、ポリヌクレオチドのウイルス中での（またはウイルスベクター中への）パッケージングおよびウイルス（またはベクター）を用いた宿主細胞の形質導入）により得るか、または米国特許第4,399,216号、同第4,912,040号、同第4,740,461号、および同第4,959,455号（これらの特許は、本明細書中に参考として援用される）に例示されるような、当該分野で公知のトランスフェクション手順により得る。所定の例において使用される形質転換手順は、形質転換される宿主に依存する。例えば、哺乳動物細胞に異種ポリヌクレオチドを導入するための方法は、当該分野で周知であり、これらとしては、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリボソーム中でのカプセル化、および核へのDNAの直接注入が挙げられる。

10

#### 【0051】

発現のために宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該分野で周知であり、これらとしては、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞株が挙げられる。これらとしては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NS/O、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、サル腎臓細胞 (COS)、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、および多くの他の細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有し、そして所望の *S. pneumoniae* PPS-3 結合特性を有する抗体を産生するかの決定を通して選択される。

20

#### 【0052】

さらに、産生細胞株由来の本発明の抗体（またはその抗体由来の他の部分）の発現は、多数の公知の技術を用いて増強され得る。例えば、増強された発現が、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) またはグルタミンシンターゼ遺伝子発現系 (GS系) を利用する同時増幅 (coamplification) 発現系により実現され得る。例えば、KaufmanおよびSharp、J. Mol. Biol. 159:601-21 (1982)；欧州特許番号第0 216 846号、同第0 256 055号、および同第0 323 997号；および欧州特許出願番号第89303964.4号を参照のこと。

30

#### 【0053】

本発明の抗体はまた、目的の免疫グロブリンの重鎖配列および軽鎖配列についてのトランスジェニックである動物または植物の作製ならびにそこから回収可能な形態での抗体の産生を通して産生され得る。動物におけるトランスジェニック産生に関連して、例えば、抗体は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物からの乳汁中に産生され得、そしてそこから回収され得る。例えば、米国特許第5,827,690号、同第5,756,687号、同第5,750,172号、および同第5,741,957号を参照のこと。

40

#### 【0054】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体は、モノクローナル抗体である。

#### 【0055】

本発明は、さらに、補体の活性化を媒介する単離されたヒト抗体を企図する。1つの実施形態において、単離されたヒト抗体は、古典経路による補体の活性化を媒介する。別の実施形態において、単離されたヒト抗体は、第二経路による補体活性化を媒介する。

#### 【0056】

50

本発明はまた、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分が、被験体の *S. pneumoniae* に対する耐性を増強することを企図する。

【0057】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図し、ここでこの抗体またはその抗原結合部分は、*S. pneumoniae* 感染により引き起こされる状態もしくは障害を予防するかまたはそれらの状態もしくは障害の重篤度を軽減させる。

【0058】

本発明の *S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分は、免疫グロブリン G (IgG)、IgM、IgE、IgA または IgD であり得る。いくつかの実施形態において、IgA は、IgA1 サブタイプまたは IgA2 サブタイプであり得、そして IgG は、IgG1 サブタイプ、IgG2 サブタイプ、IgG3 サブタイプまたは IgG4 サブタイプであり得る。

【0059】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合しかつ標識されている、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。好ましい実施形態において、標識は、放射標識、酵素標識、蛍光標識、毒素、磁性因子 (magnetic agent)、第二の抗体、親和性標識、エピトープタグ、抗生物質、補体タンパク質またはサイトカインである。

【0060】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合しかつ軽鎖を含む単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。好ましい実施形態において、軽鎖の可変 (V) 領域は、ヒト V<sub>H</sub> 15 / A19 遺伝子、ヒト V<sub>H</sub> 19 / A1 遺伝子、ヒト V<sub>H</sub> 26 / A26 遺伝子またはヒト V<sub>H</sub> 5 / L5 遺伝子によりコードされる。別の好ましい実施形態において、軽鎖の連結 (J) 領域は、ヒト J<sub>H</sub> 1 遺伝子によりコードされる。

【0061】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合し、そして表 2 に示される CDR3 アミノ酸配列 (配列番号 13 ; 配列番号 14 ; 配列番号 15 ; 配列番号 16) を含む軽鎖を含む、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。本発明はまた、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合し、表 2 に Mab 3 H1 について示される CDR2 アミノ酸配列および CDR3 アミノ酸配列 (各々、配列番号 17 ; 配列番号 16) を含む軽鎖を含む、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部位を企図する。本発明はさらに、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合し、そして図 6a ~ c に示される核酸配列 (配列番号 2 ; 配列番号 4 ; 配列番号 6 ; または配列番号 8) によりコードされるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。シグナル配列は、本発明の抗体のいずれかに存在しても存在しなくてもよい。本発明はまた、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合しかつ軽鎖を含む、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。

【0062】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3 に特異的に結合し、可変 (V) 領域、多様性 (V) 領域、および連結 (J) 領域から構成される重鎖を含む、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。好ましい実施形態において、重鎖の可変領域は、ヒト V<sub>H</sub> 3 遺伝子により一部コードされる。好ましい実施形態において、重鎖の可変領域は、DP-38 / V3-15、DP-50 / V3-33 および DP-47 / V3-23 からなる群より選択されるヒト V<sub>H</sub> 3 遺伝子によりコードされる。別の好ましい実施形態において、重鎖の分散性領域は、D1-26、D6-13 および D7-27 からなる群より選択されるヒト D 遺伝子によりコードされる。別の好ましい実施形態において、重鎖の連結領域は、JH1、JH4b および JH6b からなる群より選択されるヒト J 遺伝子に

10

20

30

40

50

よりコードされる。

【0063】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3に特異的に結合し、そして表2に示されるような重鎖由来のCDR3領域（配列番号9；配列番号10；配列番号11；配列番号12）を含む、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。本発明はさらに、*S. pneumoniae* PPS-3に特異的に結合し、図6a～cに示される核酸配列（配列番号1；配列番号3；配列番号5；配列番号7）によりコードされるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。

【0064】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3に特異的に結合し、そしてFabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントおよびFvフラグメントからなるリストより選択される抗原結合ドメインを含む、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。

【0065】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分であって、そしてその抗体が単鎖抗体である、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。

【0066】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合部分であって、そしてその抗体がキメラ抗体である、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図する。好ましい実施形態において、キメラ抗体は、異なるヒト抗体由来のフレームワーク領域およびCDR領域を含む。より好ましい実施形態において、このキメラ抗体は、二重特異的(bispecific)である。より好ましい実施形態において、このキメラ抗体は、*S. pneumoniae* PPS-3と、放射標識した分子、酵素標識、蛍光標識、毒素、磁性因子、第二の抗体、親和性標識、エピトープタグ、抗生物質、補体タンパク質およびサイトカインからなるリストより選択される標識とについて二重特異的である。

【0067】

本発明は、*S. pneumoniae* PPS-3に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を企図し、ここでこの抗体またはその部分は、誘導体化されている。好ましい実施形態において、抗体またはその部分は、ポリエチレングリコール、少なくとも1つのメチル基もしくはエチル基または少なくとも1つの糖鎖部分を用いて誘導体化されている。

【0068】

本発明の核酸分子を使用し、当業者に公知の技術および方法を用いて抗体誘導体を作製し得る。

【0069】

別の実施形態において、核酸分子、ベクター、および宿主細胞が、変異した抗PPS-3抗体を作製するために用いられ得る。これらの抗体は、重鎖および/または軽鎖の種々の可変ドメインにおいて変異されて、この抗体の結合特性が変化し得る。例えば、変異は、1つ以上のCDR領域においてなされて、PPS-3について抗体のK<sub>d</sub>を増大もしくは減少させ得るか、K<sub>off</sub>を増加もしくは減少させ得るか、またはこの抗体の結合特異性を変化させ得る。部位特異的変異誘発における技術は、当該分野において周知である。例えば、Sambrookら、およびAusubelら、前出を参照のこと。好ましい実施形態において、変異は、生殖系列と比較して、抗PPS-3抗体の可変領域において変化することが知られているアミノ酸残基でなされる。より好ましい実施形態において、1つ以上の変異が、生殖系列と比較して、本発明の抗PPS-3抗体の1つの可変領域において変化することが知られているアミノ酸残基でなされる。別の実施形態において、核酸分子が、1つ以上のフレームワーク領域において変異され得る。変異は、抗PPS-3抗体の半減期を増大させるようにフレームワーク領域または定常ドメインにおいてなされ得

10

20

30

40

50

る。フレームワーク領域または定常ドメインにおける変異はまた、抗体の免疫原性を変化させるためにか、別の分子に対する共有結合もしくは非共有結合のための部位を提供するためにか、または補体結合のような特性を変化させるためになされ得る。変異は、1つの変異抗体において、フレームワーク領域、定常ドメイン、および可変領域の各々においてなされ得る。あるいは、変異は、1つの変異抗体において、フレームワーク領域、可変領域、または定常ドメインのうち1つにおいてのみなされ得る。

#### 【0070】

別の実施形態において、別のポリペプチドに連結された抗PPS-3抗体の全てまたは一部を含む融合抗体または免疫付着因子が作製され得る。好ましい実施形態において、抗PPS-3抗体の可変領域のみが、このポリペプチドに連結されている。別の好ましい実施形態において、抗PPS-3抗体のV<sub>H</sub>ドメインは、第1のポリペプチドに連結されており、一方で抗PPS-3抗体のV<sub>L</sub>ドメインは、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとが互いに相互作用して抗体結合部位を形成し得るような様式で第1のポリペプチドと会合する第2のポリペプチドに連結されている。別の好ましい実施形態において、このV<sub>H</sub>ドメインは、これらのV<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとが互いに相互作用し得るようにリンカーによりV<sub>L</sub>ドメインと隔てられている（単鎖抗体も参照のこと）。次いで、V<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>L</sub>抗体は、目的のポリペプチドに連結される。この融合抗体は、PPS-3を検出するのに有用である。さらに、2つ（またはそれより多く）の単鎖抗体が互いに連結されている融合抗体が、作製され得る。これは、1つのポリペプチド鎖上に二価抗体もしくは多価抗体を作製することを望む場合、または二重特異的抗体を作製することを望む場合に有用である。1つの実施形態において、この融合抗体または免疫付着因子は、抗PPS-3抗体由来の1つ以上のCDR領域を用いて調製される。

10

20

#### 【0071】

本発明は、S. pneumoniae PPS-3に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物を企図する。本発明は、さらに、この抗体またはその抗原結合部分、その薬学的に受容可能なキャリア、および容器を備えるキットを企図する。好ましい実施形態において、このキットは、使用のための指示書をさらに備える。

#### 【0072】

本発明は、S. pneumoniae感染を処置もしくは予防もしくは阻害するか、またはそのような感染により引き起こされる状態もしくは障害の重篤度を軽減するための方法を企図し、この方法は、S. pneumoniaeに感染する危険があるか、またはこれに現在感染している患者に、本発明の抗体を含む薬学的組成物を投与する工程を包含する。

30

#### 【0073】

好ましい実施形態において、ヒト抗体は、非ヒト動物から得られる。より好ましい実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。別の好ましい実施形態において、薬学的組成物は、注射、経粘膜の、経口の、吸入の、眼の、直腸の、長期作用する（long acting）移植物、リポソーム、エマルジョン、クリーム、局所、または持続放出手段を介して投与される。別の好ましい実施形態において、抗体は、第二のタンパク質との融合物である。より好ましい実施形態において、この第二のタンパク質は、毒性ペプチド部分、補体タンパク質、放射標識タンパク質、サイトカインまたは抗生物質タンパク質からなるリストより選択される。別の好ましい実施形態において、この抗体は、放射標識、毒素、補体タンパク質、サイトカインまたは抗生物質で標識されている。別の好ましい実施形態において、患者は、免疫無防備状態の患者である。別の好ましい実施形態において、薬学的組成物は、毒素、補体タンパク質、放射標識タンパク質、サイトカイン、抗生物質、またはこれらの任意の組み合わせをさらに含む。

40

#### 【0074】

本発明は、S. pneumoniae PPS-3に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を産生する単離された細胞を企図する。好ましい実施形態に

50

において、細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、両生類細胞、哺乳動物細胞からなるリストより選択される。より好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は、ヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、イヌ細胞、サル細胞、ヤギ細胞、ブタ細胞、ウシ細胞、およびハムスター細胞からなるリストより選択される。より好ましい実施形態において、哺乳動物細胞は、HeLa細胞、NIH 3T3細胞、CHO細胞、BHK細胞、VERO細胞、CV-1細胞、NS/O細胞、およびCOS細胞からなるリストより選択される。より好ましい実施形態において、細胞株は、ハイブリドーマである。

#### 【0075】

本発明は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合するヒト抗体またはその抗原結合部分を産生する方法を企図し、この方法は、a) この抗体を産生し得る非ヒト細胞をこの抗体が産生される条件下で培養する工程；b) 細胞培養物からこの抗体を単離する工程、を包含する。

10

#### 【0076】

好ましい実施形態において、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を産生する方法は、ハイブリドーマを利用する。

#### 【0077】

本発明は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合するさらなるヒト抗体またはその抗原結合部分の産生を企図し、この産生は：a) S.pneumoniae 抗原組成物を用いて、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒト動物を免疫する工程；b) 非ヒト動物に、この抗原組成物に対する体液性応答を開始することを可能にする工程；およびc) 非ヒト動物からヒト抗体を単離する工程を包含する。

20

#### 【0078】

本発明は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合するヒト抗体重鎖またはその部分をコードするヌクレオチド配列を含む、非ヒト動物から単離された核酸分子を企図する。好ましい実施形態において、核酸分子は、ヒト抗体を産生するハイブリドーマから単離される。

#### 【0079】

本発明は、図6a～cに示されるようなヌクレオチド配列（配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7）を含み、ヒト抗体の重鎖またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子、またはそのフラグメントを企図し、ここでヒト抗体は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する。好ましい実施形態において、単離された核酸分子は、ヒト抗体のうちの1～3つの間のCDR領域をコードする配列を含む。本発明は、表2に示されるようなCDR3アミノ酸配列（配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12）を含むヒト抗体重鎖またはその抗原結合部分をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子またはそのフラグメントをさらに企図し、ここでヒト抗体は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する。

30

#### 【0080】

本発明は、ヒト抗体重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子またはそのフラグメントを含むベクターを企図し、ここでこの抗体は、S.pneumoniaeに特異的に結合する。好ましい実施形態において、ベクターは、この核酸に作動可能に連結された発現制御配列をさらに含む。

40

#### 【0081】

本発明は、図6a～cに示す通りのヌクレオチド配列（配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8）を含む、ヒト抗体軽鎖またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子（またはそのフラグメント）を意図し、ここで、この抗体は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する。好ましい実施形態では、単離された核酸分子は、ヒト抗体のうちの1～3の間のCDR領域をコードする配列を含む。本発明はさらに、表2に示す通りのCDR3アミノ酸配列（配列番号13、配列番号14、配列番号

50

15、配列番号16)を含むヒト抗体軽鎖またはその抗原結合部分をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子(またはそのフラグメント)を意図し、ここで、このヒト抗体は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する。本発明は、Mab 3H1について表2に示す通りのCDR2およびCDR3のアミノ酸配列(配列番号17;配列番号16)を含むヒト抗体軽鎖またはその抗原結合部分をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子(またはそのフラグメント)を意図し、ここで、このヒト抗体は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する。

【0082】

本発明は、S.pneumoniaeに特異的に結合する、ヒト抗体軽鎖またはその抗原結合部分をコードする、核酸分子(またはそのフラグメント)を含むベクターを意図する。好ましい実施形態では、このベクターは、この核酸に作動可能に連結された発現制御配列をさらに含む。

10

【0083】

本発明は、以下を含む単離された宿主細胞を意図する：a)非ヒト動物から単離され、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する、ヒト抗体の軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする、核酸分子；またはb)この核酸分子を含むベクター。

【0084】

本発明は、以下を含む単離された宿主細胞を意図する：a)非ヒト動物から単離され、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する、ヒト抗体の重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする、核酸分子；またはb)この核酸分子を含むベクター。

20

【0085】

本発明は、以下を含む単離された宿主細胞を意図する：a)非ヒト動物から単離され、重鎖もしくはその抗原結合部分をコードする核酸分子、およびS.pneumoniae PPS-3に特異的に結合するヒト抗体の軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードする、単離された核酸分子；またはb)これらの核酸分子を含むベクター。

【0086】

本発明は、非ヒト動物から同定され、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合するヒト抗体の、重鎖もしくはその抗原結合部分、軽鎖もしくはその抗原結合部分、または軽鎖および重鎖の両方もしくはそれらの抗原結合部分を組換え產生する方法を意図し、この方法は、上記の宿主細胞を、この核酸分子が発現される条件下で培養する工程を包含する。

30

【0087】

本発明は、上記の重鎖をコードする核酸分子のうちのいずれかによってコードされるか、または上記の宿主細胞のうちのいずれかから単離された、単離されたヒト抗体重鎖またはその抗原結合部分を意図し、ここで、この抗体は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する。

【0088】

本発明は、上記の重鎖をコードする核酸分子のいずれかによってコードされるか、または上記の宿主細胞のうちのいずれかから単離された、単離されたヒト抗体軽鎖またはその抗原結合部分を意図し、ここで、この抗体は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合する。

40

【0089】

本発明は、上記の核酸分子のうちのいずれかを含む非ヒトトランスジェニック動物を意図する。好ましい実施形態では、この非ヒトトランスジェニック動物は、この核酸分子またはこれらの核酸分子を発現する。より好ましい実施形態では、この非ヒトトランスジェニック動物は、S.pneumoniae PPS-3に特異的に結合するヒト抗体の、重鎖またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子および軽鎖またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子を含み、そしてこの非ヒト動物は、両方の核酸分子を発現する。より好ましい実施形態では、非ヒト動物は、マウス、ラット、ハムスター、ウシ、ヒツジ、霊長類、ウマおよびブタからなるリストより選択される。より好まし

50

い実施形態では、単離された核酸分子またはその部分の発現から生じるヒト抗体は、動物のBリンパ球またはその子孫から誘導された細胞の表面に発現される。別の好ましい実施形態では、単離された核酸分子またはその部分の発現から生じるヒト抗体は、その動物のリンパ、血液、乳汁、唾液または腹水中に分泌される。

【0090】

本発明は、S . p n e u m o n i a e P P S - 3 に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分および第二のポリペプチド配列を含む、融合タンパク質を意図する。好ましい実施形態では、第二のポリペプチド配列は、エピトープタグ、アフィニティタグ、毒性ポリペプチド、抗生物質、酵素、第二の抗体配列、補体タンパク質、およびサイトカインからなるリストより選択される。

10

【0091】

本発明は、S . p n e u m o n i a e P P S - 3 に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を意図し、この抗体の重鎖アイソタイプは、 $\mu$ 、 、 、または である。

【0092】

本発明は、S . p n e u m o n i a e P P S - 3 に特異的に結合する単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を意図し、ここで、この抗体またはその抗原結合部分は、以下の工程を包含するプロセスによって産生される：a) ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒト動物を、S . p n e u m o n i a e P P S - 3 調製物、ビルレントS . p n e u m o n i a e 細胞抽出物、弱毒化S . p n e u m o n i a e 細胞調製物、および殺傷S . p n e u m o n i a e 細胞調製物からなる群より選択される抗原で免疫する工程；b) この非ヒト動物に、この抗原に対する免疫応答を開始させる工程；ならびにc) この抗体をこの非ヒト動物から単離する工程。

20

【0093】

本発明は、夾雑ヒト生物物質を含まない動物または細胞から単離された、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分を意図する。好ましい実施形態では、生物物質は、ウイルス、酵素、ホルモン、サイトカイン、レセプター、レセプターリガンド、免疫グロブリン、補体、核タンパク質、および細胞質シグナル伝達タンパク質である。より好ましい実施形態では、ウイルスは、エプスタイン - バーウイルスまたはレトロウイルスである。

【0094】

薬学的組成物は、従来の混合プロセス、溶解プロセス、造粒プロセス、糖衣丸作製プロセス、溶離プロセス、乳化プロセス、カプセル化プロセス、捕捉プロセスまたは凍結乾燥プロセスによって製造され得る。

30

【0095】

従って、本発明に従って使用するための薬学的組成物は、活性な化合物を、薬学的に使用され得る調製物へと加工するのを容易にする、1以上の生理学的に受容可能なキャリア（賦形剤および補助剤を含む）を用いて、従来の様式で処方され得る。適切な処方は、選択される投与経路に依存する。

【0096】

注射のために、本発明の薬剤は、水溶液中に、好ましくは、生理学的に適合性の緩衝液（例えば、H a n k s 溶液、R i n g e r 溶液、または生理学的食塩水緩衝液）中に処方され得る。経粘膜投与のために、透過すべき障壁に適切な浸透剤が、処方物中で用いられる。このような浸透剤は一般に、当該分野で公知である。眼での投与のために、適切な生理学的食塩水溶液中での懸濁物が、当該分野で周知であるように用いられる。

40

【0097】

経口投与のために、化合物は、活性な化合物を、当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせることによって容易に処方され得る。このようなキャリアは、本発明の化合物が、処置されるべき患者による経口摂取のための錠剤、丸剤、糖衣丸、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして処方されるのを可能にする。経口用途のための薬学的調製物は、所望の場合、適切な補助剤を添加した後、得ら

50



れる混合物を必要に応じて粉碎し、そして顆粒の混合物を処理して、錠剤または糖衣丸の核を得ることによって、固体賦形剤として入手され得る。適切な賦形剤としては、以下が挙げられる：フィラー（例えば、糖（ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む）；セルロース調製物（例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、イネデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および／またはポリビニルピロリドン（PVP））。所望の場合、崩壊剤（例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、もしくはアルギン酸またはそれらの塩（例えば、アルギン酸ナトリウム））が添加され得る。

#### 【0098】

10

糖衣丸核には、適切なコーティングが提供される。この目的のために、濃縮した糖溶液が用いられ得る。この糖溶液は、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール（carbopol）ゲル、ポリエチレングリコール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液および適切な有機溶媒もしくは溶媒混合物を必要に応じて含み得る。染料または色素は、活性化合物の用量の種々の組合せの同定のため、またはこれを特徴付けるために、錠剤または糖衣丸コーティングに添加され得る。

#### 【0099】

経口的に使用され得る薬学的調製物としては、ゼラチンから作製された押し込みばめカプセル剤、ならびにゼラチンおよび可塑剤（例えば、グリセロールまたはソルビトール）から作製された、軟質のシールされたカプセル剤が挙げられる。押し込みばめカプセル剤は、活性成分をフィラー（例えば、ラクトース）、バインダー（例えば、デンプン）および／または滑沢剤（例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウム）および必要に応じて安定剤と混合して含み得る。軟カプセル剤では、活性な化合物は、適切な液体（例えば、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコール）中に溶解または懸濁され得る。さらに、安定剤が添加され得る。経口投与のための全ての処方物は、このような投与に適切な投薬量であるべきである。

20

#### 【0100】

経投与のために、組成物は、重要な様式で処方された錠剤または菓子錠剤の形態を採り得る。

#### 【0101】

30

吸入による投与のために、本発明に従って使用するための化合物は、適切なプロペラント（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、二酸化炭素または他の適切なガス）を使用して、加圧パックまたはネブライザーからのエアゾールスプレー提示の形態で便利に送達される。加圧エアゾールの使用の場合、投薬量単位は、決まった（metered）量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。化合物の粉末混合物および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプン）を含む、吸入器または注入器における使用のための（例えば、ゼラチンの）カプセル剤またはカートリッジが処方され得る。

#### 【0102】

これらの化合物は、注射による（例えば、ボラス注射または連続注入による）非経口投与のために処方され得る。注射のために処方物は、添加された保存剤を伴って、単位投薬量形態で（例えば、アンプルまたは複数用量容器中で）提示され得る。組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクル中での懸濁剤、液剤または乳剤のような形態を採り得、そして懸濁化剤、安定剤および／または分散剤のような処方剤を含み得る。

40

#### 【0103】

非経口投与のための薬学的処方物は、水溶性形態の活性な化合物の水溶液を含む。さらに、活性な化合物の懸濁物は、適切な油性注射懸濁物として調製され得る。適切な親油性溶媒またはビヒクルとしては、脂肪油（例えば、ゴマ油）または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド）またはリポソームが挙げられる。水性注射懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナト

50

リウム、ソルビトールまたはデキストラン)を含み得る。必要に応じて、懸濁物はまた、適切な安定剤または非常に濃縮された溶液の調製を可能にする化合物の溶解度を増大させる薬剤を含み得る。

【0104】

あるいは、活性成分は、使用前に適切なビヒクル(例えば、無菌の発熱物質を含まない水を用いて再構成するための粉末形態であり得る。

【0105】

これらの化合物はまた、例えば、従来の坐剤基剤(例えば、カカオ脂または他のグリセリド)を含む、直腸組成物(例えば、坐剤または保持浣腸)に処方され得る。

【0106】

先に記載された処方物に加えて、これらの化合物はまた、蓄積調製物として処方され得る。このような長期作用性処方物は、(例えば、皮下または筋肉内に)移植によって、または筋内注射によって投与され得る。従って、例えば、これらの化合物は、適切なポリマー材料または疎水性材料を用いて(例えば、受容可能な油中の乳剤として)もしくはイオン交換樹脂を用いて、または溶解性の不足した誘導体として(例えば、溶解性の不足した塩として)、処方され得る。

【0107】

本発明の疎水性化合物についての薬学的キャリアは、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機ポリマー、および水相を含む、共溶媒系である。共溶媒系は、V P D共溶媒系であり得る。V P Dは、無水エタノールで容量になるようにした、3% w / vベンジルアルコール、8% w / v非極性界面活性剤ポリソルベート80、および65% w / vポリエチレングリコール300の溶液である。V P D共溶媒系(V P D:5 W)は、水溶液中の5%デキストロースで1:1希釈したV P Dからなる。この共溶媒系は、疎水性化合物をよく溶解し、そしてそれ自体、全身投与の際に低い毒性を生じる。当然、共溶媒系の比率は、その溶解性および毒性の特徴が破壊されることなく、大きく変動し得る。さらに、共溶媒成分の正体は、変動し得る:例えば、他の低毒性非極性界面活性剤を、ポリソルベート80の代わりに用い得る;ポリエチレングリコールの画分は変動し得る;他の生体適合性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン)は、ポリエチレングリコールの代わりとなり得る;そして他の糖または多糖は、デキストロースの代わりになり得る。

【0108】

あるいは、疎水性薬学的化合物のための他の送達システムが使用され得る。リポソームおよびエマルジョンは、疎水性薬物のための送達ビヒクルまたは送達キャリアの周知な例である。通常はより大きな毒性を有するが、ジメチルスルホキシドのような特定の有機溶媒もまた、使用され得る。

【0109】

さらに、化合物は、持続性放出系(例えば、治療剤を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクス)を使用して送達され得る。種々の持続性放出物質が確立されており、そして当業者に周知である。持続性放出カプセルは、それらの化学的性質に依存して、数週間から100日以上までにわたって、化合物を放出する。

【0110】

治療的試薬の化学的性質および生化学的安定性に依存して、タンパク質安定化のためのさらなる戦略が使用され得る。

【0111】

薬学的組成物もまた、適切な固相またはゲル相のキャリアまたは賦形剤を含み得る。そのようなキャリアまたは賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールのようなポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0112】

本発明のS . p n e u m o n i a e P P S - 3に特異的に結合する、単離されたヒト

10

20

30

40

50

抗体またはその抗原結合部分は、薬学的に適合性の対イオンとの塩として提供され得る。薬学的に適合性の塩は、多くの酸（塩酸、硫酸、酢酸、酪酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸などが挙げられるがこれらに限定されない）と共に形成され得る。塩は、対応する塩基を含まない形態である水性溶媒中または他のプロトン性溶媒中でより可溶性である傾向がある。

#### 【0113】

本発明のキットは、*S. pneumoniae*の感染の阻害、予防もしくは処置、または*S. pneumoniae*の感染により引き起こされる状態もしくは障害のために本発明の組成物を利用するための、手引書を含む。キットについて印刷された手引書により、当業者は本発明の方法を実施するためにキットを利用し得る。

10

#### 【0114】

以下の例は例示的のみの目的によって提供される。これらは本明細書において開示された本発明の範囲を限定するよう意図されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0115】

（実施例1 - *Streptococcus pneumoniae*の莢膜多糖（PPS-3）に対するモノクローナル抗体の作製）

本発明者らはヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニックマウス（Xenomouse<sup>TM</sup>；Mendezら、Nat. Genet. 15、146～56頁（1997））を、精製PPS-3（10813株、ATCC）から作製された*S. pneumoniae* PPS-3結合体を用いてワクチン接種した。例えば、Russellら、Infection Immunity 68：1820-26（2000）を参照のこと。この実験において、本発明者らはPPS-3-破傷風トキソイド結合体（PPS-3-TT）を使用し、そしてコントロールとして、本発明者らはXenomouse<sup>TM</sup>マウスに市販のTTをワクチン接種した。本発明者らは総用量2.5 μgのPPS-3-TTまたはTTを用いて、尾底部に皮下でワクチン接種した。本発明者らは、ワクチン接種の7～14日後にワクチン接種したXenomouse<sup>TM</sup>マウスから脾臓を摘出し、そして脾細胞のマウス骨髓腫細胞株NSOとの融合によってハイブリドーマを作出し、そして製造業者の手引書に従いClonaCell<sup>TM</sup>-HY（Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Canada）を使用して細胞を増殖させた。

20

30

#### 【0116】

次いで本発明者らは、以下のようにPPS-3と反応するMabの分泌について、約100個のハイブリドーマ細胞株を試験した。最初に、精製したpneumocaccal細胞壁多糖（CWPS；Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark）を用いて、ハイブリドーマ細胞株からの上清を吸収させた。次いで、10 μg/mlのPPS-3（ATCC 6303）でコーティングされたポリスチレンELISAプレート（Corning Glass Works, Corning, NY）において、この上清の系列希釈をインキュベートし、そして37℃で1時間インキュベートした。このプレートを洗浄し、そして、IgG、IgM、IgAおよび軽鎖に対するアルカリホスファターゼ（AP）結合体化ヤギ抗ヒト試薬、ならびに軽鎖に特異的なヤギ抗マウス試薬（Fisher Biotech, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA）と一緒に37℃で1時間インキュベートした。次いで、p-ニトロフェニルホスフェート基質（Sigma, St. Louis, MO）を用いてプレートを8色させ、そしてMRX Microplate Reader（Dynatech Laboratories, Chantilly, VA）を用いて、405 nmで光学密度を測定することによって、抗体の結合を検出した。この実験においてコントロールとして、PPSワクチンを接種した個体由来のヒト血清標準（ポジティブコントロール；Abadiら、J. Infect. Dis. 178：707-16（1998））およびIgM骨髓腫抗体（ネガティブコントロール；Calbiochem, San

40

50

Francisco, CA)を使用した。また、Russellら、Priofskiら、Infect. Immun. 63:3005-14 (1995)およびInfect. Immun. 68:1820-26 (2000)に記載されるような、当該分野の標準的な技術を使用して、ブドウ球菌タンパク質A (SPA; Sigma)、TT、BSA、CWPSおよび二本鎖DNA (dsDNA)への結合について、ハイブリドーマ上清をスクリーニングした。

#### 【0117】

(実施例2 - S. pneumoniae PPS-3に対するMabの特徴付け)

本発明者らは、これらのハイブリドーマ由来の4つのヒトMabを、1F10/7C5、3H11、1A2およびA7と名付けた。各々のこれらMabはIgMであり、そしてPPS-3およびSPAと反応するが、TTにも、BSAにも、CWPSにもdsDNAにも有意な結合を示さなかった。

10

#### 【0118】

本発明者らは、これらの抗体がPPS-3に特異的であるかどうかを決定した。10  $\mu$ g/mlのPPS-3でプレートをコーティングし、5  $\mu$ g/mlのMab 1F10/7C5、3H11、1A2およびA7を添加し、そして可溶性PPS-3の漸増する濃度(0.1~100  $\mu$ g/ml)が抗体結合を阻害する能力をモニターすることによりELISAを実施した。また、一定量のビオチン化Mabに、無標識Mabの連続希釈を添加して、PPS-3でコーティングしたプレート中でインキュベートするリバーサアッセイを実施した。両方の場合において、また、ポジティブコントロールとしてインヒビターを含まないプレートをインキュベートした。HRP標識ストレプトアビジンを添加し、そしてペルオキシダーゼ基質を用いて発色させることによってビオチン化Mabの結合を検出した(Kirkegaard & Perry Laboratories)。MRX Microplate Readerを用いて、450nmで光学密度を測定した。

20

#### 【0119】

本発明者らは、Mab A7、1F10/7C5および1A2は可溶性PPS-3によって阻害されるが、3H11は阻害されないことを観察した(図1を参照のこと)。Mab A7、1A2、3H11および1F10/7C5による、固相PPS-3への50%結合を付与する可溶性PPS-3の濃度は、それぞれ、0.077 fmol、0.231 fmol、2.577 fmolおよび0.103 fmolだった。これらのデータから、相対的な見かけの親和性定数( $aK_a$ )を計算し、これは最大の結合の50%で、可溶性PPS-3抗原濃度の逆数である。Mab A7、1A2および1F10/7C5の $aK_a$ 値は、それぞれ、 $1.72 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $2.58 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $1.55 \times 10^7 M^{-1}$ である。PPS-3はMab 3H11の結合を阻害しないので、Mab 3H11の $aK_a$ を決定できなかった。

30

#### 【0120】

(実施例3 - エピトープの特異性)

本発明者らは、競合結合アッセイを実施し、Mabのエピトープ特異性を比較する。Mabのモル濃度を測定し、そしてN,N-ジメチルホルムアミド(DMF; Aldrich, Milwaukee, WI)を用いてEZ-link sulfo-NHS-LCビオチン(Pierce, Rockford, IL)の0.1M溶液を調製することによって、1つの試験Mabをビオチン化する。次いで、溶液を同時にボルテックスしながら、1mgのビオチンを徐々に添加する。この反応物を、室温で1時間インキュベートし、次いでこのビオチン化MabをPBS中で一晩透析する。PPS-3でコーティングされたプレート上の各MabのELISA結合曲線を作成し、50%飽和を生じるビオチン化Mabの濃度を決定し、そしてビオチン化Mabが非標識Mabと同様にPPS-3に結合することを確認する。

40

#### 【0121】

競合実験のために、ビオチン化試験Mabの等容量の希釈液に、50%飽和を生じる濃度で他のMabの各々を添加し、そしてPPS-3でコーティングされたELISAプレ

50

ートを用いてインキュベートする。また、一定量のビオチン化 M a b を非標識 M a b の連続希釈物に添加し、そして P P S - 3 でコーティングされた E L I S A プレートを用いてインキュベートすることにより、リバースアッセイを実施する。また、両方のアッセイにおいて、この M a b が P P S - 3 でコーティングされたプレートに結合することの確認するために、インヒビターを使用せずにプレートをインキュベートした。H R P - 標識ストレプトアビジンを使用してビオチン化 M a b の結合を検出し、次いでこの標識をペルオキシダーゼ基質を用いて発色させる ( K i r k e g a a r d & P e r r y L a b o r a t o r i e s ) 。 M R X M i c r o p l a t e R e a d e r を用いて、405nmで光学密度を測定する。

#### 【0122】

本発明者らは、試験 M a b としてビオチン化 M a b A 7 を使用して、これらの実験を実施し、そして A 7 が、1 A 2、3 H 1 および 1 F 1 0 / 7 C 5 とは異なるエピトープ特異性を有することを実証した ( 図 2 ) 。他の M a b の濃度を増加させずに、ビオチン化 M a b A 7 の濃度を増加させることが、結果として P P S - 3 結合の増加を生じることを観察し、このことは、他の M a b が M a b A 7 の結合を変更しないことを確認した。同様に、一定濃度のビオチン化 M a b A 7 を使用し、そして他の M a b の濃度を増加させた場合、結合の変化は全く観察されなかった。これらの実験は、A 7 によって認識されるエピトープが他の M a b によって認識されるエピトープとは異なることを示唆した。しかし、非常に高濃度の M a b 7 C 5 ( > 25  $\mu$ g / ml ) または M a b 3 H 1 ( > 12.5  $\mu$ g / ml ) では、ビオチン化 M a b A 7 による結合のいくつかの阻害を観察し、このことはこれらの M a b が、M a b A 7 によって認識されるエピトープと物理的に近いまたは重複するエピトープを認識し得ることを示唆する。他の M a b のエピトープ特異性を比較するために、他の M a b の各々を用いてこれらの実験を行う。

#### 【0123】

( 実施例 4 - S . P n e u m o n i a e P P S - 3 に対する M a b の配列分析 )

M a b 1 F 1 0 / 7 C 5、3 H 1 1、1 A 2 および A 7 を産生するハイブリドーマ由来の P C R 増幅された重鎖 ( V<sub>H</sub> ) c D N A および軽鎖 ( V<sub>L</sub> ) c D N A を使用する配列決定のために、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードする核酸分子を獲得した。V<sub>H</sub> 定常領域プライマーおよび V<sub>L</sub> 定常領域を使用する R N A の逆転写によって、V<sub>H</sub> c D N A および V<sub>L</sub> c D N A を生成した。次いで、以下のような V<sub>H</sub> 特異的および V<sub>L</sub> 特異的なプライマーを使用する P C R によって、V<sub>H</sub> 領域および V<sub>L</sub> 領域を増幅した：V<sub>H</sub> センス、5' - G A G T T T G G G C T G A G C T G G - 3' ( 配列番号 18 ) ; V<sub>H</sub> アンチセンス、5' - G G A A T T C T C A C A G G A G A C G A G - 3' ( 配列番号 19 )、V<sub>L</sub> センス、5' - G A H A T Y G A G C T C A C B C A G T C T C C A - 3' ( 配列番号 20 ; H は A、C または T を表し ; Y は C または T を表し ; B は C、G または T を表す ) ; V<sub>L</sub> アンチセンス、5' - C C T G T T G A A G C T C T T T G T G A C - 3' ( 配列番号 21 ) 。V<sub>H</sub> P C R 産物および V<sub>L</sub> P C R 産物をゲル精製し、そしてこれらを製造業者の指示書に従って、T A クローニングシステム ( I n v i t r o g e n<sup>TM</sup>, S a n D i e g o, C A ) の p C R 1000 プラスミドにクローニングした。M a x i プラスミドプロトコル ( Q i a g e n, I n c., C h a t s w o r t h, C A ) を使用して、プラスミド D N A を単離し、ジデオキシ鎖終結によって配列決定した。D N A P L O T ( V B a s e I n d e x ; M R C C e n t e r f o r P r o t e i n E n g i n e e r i n g, C a m b r i d g e, U n i t e d K i n g d o m ; M u k h e r j e e ら、J . E x p . M e d . 177 : 1105 - 16 ( 1993 ) ) を使用して、ヒト免疫グロブリン配列のデータベースと、可変領域の配列を比較した。2つの独立した実験からクローニングした P C R 産物の核酸配列を決定し、そしてこれらは同一であった。これらの抗体の V<sub>H</sub> 領域および V<sub>L</sub> 領域の配列を、図 6 a ~ c に示す。

#### 【0124】

これらの核酸配列を分析して、そして表 1 および表 7 において示すように、本発明の M a b において、どの遺伝子セグメントが使用されるかを決定した。4つ全ての M a b は、

ヒトの重 ( $V_H$ ) 鎖可変領域遺伝子転写物および軽 ( $V_L$ ) 鎖可変領域遺伝子転写物の両方を表す。M a b の全ては  $V_H$  3 遺伝子エレメントを使用する：M a b A 7 および 1 A 2 は D P - 3 8 / V 3 - 1 5 遺伝子を使用し、1 F 1 0 / 7 C 5 は D P - 4 7 / V 3 - 2 3 遺伝子を使用し、そして 3 H 1 は D P - 5 0 / V 3 - 3 3 を使用するが、これらの  $D_H$  遺伝子セグメントおよび  $J_H$  遺伝子セグメントの使用が異なっている。M a b A 7 および 1 A 2 は同一の  $V_H$  を表すが、異なる C D R 3 領域を有する。M a b 3 H 1 は 1 4 アミノ酸長の C D R 3 領域を有し、一方で他の M a b A 7、7 C 5 および 1 A 2 の C D R 3 は 1 0 または 1 1 のアミノ酸のみである。これらの M a b の C D R 3 領域は全て、それらの最も近縁の生殖細胞系列の遺伝子配列と比較して、1 つまたは 2 つの体細胞変異を明らかにする (表 2)。M a b 1 F 1 0 / 7 C 5、A 7 および 3 H 1 は全て、9 4 位に正電荷残基を有するが、M a b 1 A 2 はそうではない。M a b A 7 については、C から A への塩基の変更が存在し、9 4 位においてスレオニン (T) からリジン (K) への変更を生じた。4 つ全ての M a b は、 $J_k$  1 軽鎖遺伝子エレメントを使用し (A 7 は D P K 1 5 を使用し、1 A 2 は D P K 2 6 を使用し、1 F 1 0 / 7 C 5 は D P K 1 9 を使用し、そして 3 H 1 は D P K 5 を使用する)、そして最も近縁の生殖細胞系列の配列におけるトリプトファン (W) と比較して、 $J_k$  1 軽鎖における 9 6 位にアルギニン (R) を有する。M a b 3 H 1 は、最も近縁の生殖細胞系列の遺伝子と比較して、 $V_k$  1 C D R 2 領域 2 つの置換変異を有する (表 2)。

10

(実施例 5 - M a b は補体活性化を媒介する)

補体は、S . p n e u m o n i a e 感染に対する抗体媒介性保護のために非常に重要である。本発明者らは、E L I S A を実施して、これらの M a b がヒトの補体経路を活性化し得、そして P P S - 3 に対して C 3 を堆積 (d e p o s i t) させ得るかどうかを決定した。1 0  $\mu$  g / m l の M a b または骨髄腫 I g M (ネガティブコントロール) および C 2 欠損のヒト血清、B 因子欠損のヒト血清、または正常なヒト血清 (C a l b i o c h e m , S a n D i e g o , C A) から選択した、4 % の補体供給源からなる溶液を含む、1 0  $\mu$  g / m l の P P S - 3 を用いて、E I S A プレートにコーティングした。次いで、これらのプレートを 3 7 °C で 1 時間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗ヒト C 3 (S i g m a) と共に、3 7 °C で 1 時間インキュベートし、そして再度洗浄した。これらのプレートを、p - ニトロフェニルホスフェート基質 (S i g m a) と共にインキュベートすることによって、抗体の C 3 への結合を検出した。M R X M i c r o p l a t e R e a d e r を用いて、4 0 5 n m で光学密度を測定した。

20

30

【0 1 2 5】

また、F A C S によって C 3 堆積物をモニターした。加熱殺傷した S . p n e u m o n i a e を、上記の補体供給源の各々 1 % と共に、8 m g / m l の M a b または I g M コントロールと共に 3 7 °C で 3 0 分間インキュベートした。次いで、H B S S でサンプルを洗浄し、そして F I T C 標識したヤギ抗ヒト C 3 (C a p p e l , D u r h a m , N C) と共に室温で 1 時間インキュベートした。P B S で洗浄して、そして冷 N a C l - E G T A 中に再懸濁した。F A C S にて C 3 堆積を分析し、そしてフローサイトメトリ分析を F A C S c a n にて実施した (B e c t o n D i c k i n s o n I m m u n o l o g i c a l S y s t e m s , S a n J o s e , C A)。

40

【0 1 2 6】

古典的補体経路の影響を、B 因子欠損血清を使用する結果から決定し得、そして代替補体経路の影響を、C 2 欠損血清を使用する結果から決定し得る。任意の補体供給源を使用した場合、M a b が固相 P P S - 3 への C 3 の堆積を促進することを観察した (図 4)。これらのデータは、4 つ全ての M a b が、P P S - 3 への補体の結合を促進し得ることを示す。B 因子欠損血清または C 2 欠損血清のどちらかを使用する場合、M a b A 7 および 1 F 1 0 / 7 C 5 が、M a b 1 A 2 または 3 H 1 よりも、より大いに C 3 堆積を媒介することを示した。これらの結果をインビボで確認した (データは示さず)。

【0 1 2 7】

(実施例 6 - マウス保護実験)

50

本発明者らは、本発明のモノクローナル抗体の保護効果を評価した。Mabまたはコントロールを、滅菌したPBS中に、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ または $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のどちらかの濃度に希釈した。1mlの希釈したMab、またはコントロールとして、ヒト骨髄腫IgM (Calbiochem) もしくは滅菌生理食塩水のみを、マウスのいくつかの系統に腹腔内注射した。National Cancer Institute (Bethesda, MD) より、6~8週齢のメスBalb/cマウスを入手した。側方尾静脈に、Mab注射の1時間後に、Streptococcus pneumoniaeの50コロニー形成単位を含有する、0.2mlのトリプシン大豆ブロス注射することによって、マウスをチャレンジした。細菌の無毒性をプレートすることによって確認した。この接種用量を、注射後の48時間までに50%のマウスを殺す用量(48時間のLD<sub>50</sub>)よりも10倍多い。あるいは、S. pneumoniaeで、マウスに腹腔内接種した。次いで、マウスを日毎に観察し、そして生存をモニターする。Kaplan-Meier対数ランクの生存テストを使用して、各々の群における生存マウスの数を比較する。

10

20

30

40

#### 【0128】

マウスの群に、S. pneumoniaeの5CFU、50CFUまたは500CFUで腹腔内接種し、そして2日毎にそれらの生存をモニターした。いずれかのネガティブコントロール(骨髄腫IgMまたはPBS; 図5)で注射したマウスにおいて、全てのマウスの系統へのS. pneumoniaeの接種が、48時間以内の致死の感染を生じることを観察した。S. pneumoniaeでの接種についてのLD<sub>50</sub>が、5CFUであることを決定した。さらに、これらのマウスは全て、感染の24時間以内に明らかに病

#### 【0129】

本発明のMabの、S. pneumoniaeから野生型マウスを保護する能力を決定した。Mab A7および1F10/7C5の受動性投与が、 $1\mu\text{g}$ 用量(50%生存)および $10\mu\text{g}$ 用量(80~90%生存)の抗体の両方で、S. pneumoniaeに感染したBalb/cマウスの生存を延ばすことを観察した(図5)。同様に、Mab 1A2の受動性投与が、S. pneumoniaeに感染したBalb/cマウスの生存を有意に延ばすことを観察した(ただし、 $10\mu\text{g}$ 用量のみ)(生存率80~90%; 図5)。対照的に、Mab 3H1の $1\mu\text{g}$ または $10\mu\text{g}$ のどちらかを受動性投与した場合、生存の延長を観察しなかった(図5)。

#### 【0130】

全ての実験において、コロニー形成単位(CFU)を計測することによって、無害性の生細菌数を確認した。これらの実験は、ヒト生殖細胞系列の遺伝子が、S. pneumoniae PPS-3に対して、保護的で血清型特異的なヒト抗体を産生するために使用され得ることを実証した。

#### 【0131】

本明細書および特許請求の範囲の全体にわたって、単語「含む(comprise)」、または「含む(comprises)」もしくは「含んでいる(comprising)」のような変型は、ある定まった整数の包含、または整数群の包含を意味するが、任意の他の整数または整数群の除外を意味するものではないことが理解される。

#### 【0132】

本明細書において記載された全ての刊行物および特許出願は、本明細書において、各々の刊行物または特許出願が特定かつ個々に参考として援用されることが示されるように、参考として援用される。前述の発明は、明解な理解の目的のために、例示および実施例の方法によっていくらか詳細に記載されているが、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなしに特定の変更および改変がこれらになされ得ることが、本発明の教示を見ると当業者に直ちに明かである。

#### 【0133】

表 1. PPS 3に対するIgM Mabにより使用される、ヒトV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>の遺伝子セグメント

V <sub>H</sub> ( GenBank 識別番号 )	V <sub>H</sub> 3	D <sub>H</sub>	J <sub>H</sub>	CDR3 ( アミノ酸長 )
7C5 (AF431049)	DP-47/V3-23	D7-27	JH4b	10
A7 (AF431055)	DP-38/V3-15	D1-26	JH1	11
1A2 (AF431053)	DP-38/V3-15	D6-13	JH4b	10
3H1 (AF431051)	DP-50/V3-33	対応物なし	JH6b	14
V <sub>L</sub> ( GenBank 識別番号 )	V <sub>K</sub> 1		J <sub>K</sub>	CDR3 ( アミノ酸長 )
7C5 (AF431050)	DPK19/A1		JK1	9
A7 (AF431056)	DPK15/A19		JK1	9
1A2 (AF431054)	DPK26/A26		JK1	9
3H1 (AF431052)	DPK5/L5		JK1	9



【表 2】

(A)	CDR1	CDR2	CDR3	
H 鎖 AA コー ド 1-----31 ~ 35-----50 51 52 ~ 63 64 65-----94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108				(配列番号 9)
7C5				
D7-27				
J <sub>H</sub> 4b				
A7				(配列番号 10)
V3-15				
D1-26				
J <sub>H</sub> 1				
1A2				(配列番号 11)
D6-13				
J <sub>H</sub> 4b				
3H1				(配列番号 12)
D-対応物なし				
J <sub>H</sub> 6b				
(B)	CDR1	CDR2	CDR3	
L 鎖 AA コー ド 1-----24 ~ 35-----50 51 52 53 54 55 56-----89 90 91 92 93 94 95 96 97				(配列番号 13)
7C5				
DPK19				
J <sub>K</sub> 1				
A7				(配列番号 14)
DPK15				
J <sub>K</sub> 1				
1A2				(配列番号 15)
DPK26				
J <sub>K</sub> 1				
3H1				(配列番号 16)
DPK5				
J <sub>K</sub> 1				

表 2: PPS 3 に対する IgM Mab の CDR 配列

## 【図面の簡単な説明】

## 【0135】

【図 1】図 1 は、Mab が、S . pneumoniae PPS - 3 に特異的であることを実証する。y 軸は、x 軸に示される可溶性 S . pneumoniae PPS - 3 の濃度の存在下での Mab の OD を表す。

【図 2】図 2 は、Mab A7 が、Mab 1A2、3H1、および 1F10 / 7C5 と異なるエピトープを認識することを実証する。四角は、固定された濃度の非標識 Mab 1A2 (A)、3H1 (B)、または 1F10 / 7C5 (C) およびビオチン化 Mab A7 の連続希釈物に起因するシグナルを表す。丸は、固定された濃度のビオチン化 Mab A7 および非標識 Mab 1A2 (A)、3H1 (B)、または 1F10 / 7C5 (C)

10

20

30

40

50

の連続希釈物に起因するシグナルを表す。

【図 3】図 3 は、相補性供給源として C 2 枯渴ヒト血清 ( A ) および B 因子枯渴ヒト血清 ( B ) を用いた、M a b により媒介される C 3 の堆積の F A C S 分析を示す。パネル ( A ) において、ヒストグラムにおける中間チャンネル蛍光強度の幾何学的平均値は、上から下に向かって、4 . 1、1 1 . 9 2、1 0 . 5 5、6 . 6、および 6 . 3 4 であり；パネル ( B ) において、ヒストグラムにおける中間チャンネル蛍光強度の幾何学的平均値は、上から下に向かって、2 . 5 3、9 . 4 8、1 0 . 3 4、4 . 4 6、および 4 . 5 8 であった。

【図 4】図 4 は、M a b により媒介される C 3 の堆積の E L I S A 決定を示す。薄い灰色のバーは、C 2 欠失ヒト血清を用いた結果を表し、そして濃い灰色のバーは、因子 B 欠失ヒト血清を用いた結果を表す。y 軸は、x 軸に示される M a b を使用した場合に得られる O D を表す。

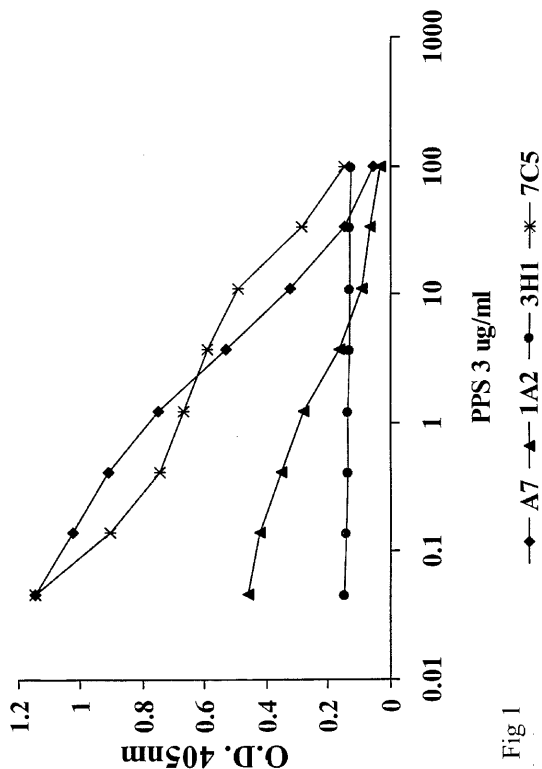
【図 5】図 5 は、S . p n e u m o n i a e 血清型 3 による感染後の B a l b / c マウスの生存性を示す。左のグラフは、マウスに、示される M a b を 1 0  $\mu$  g 注射した場合の結果を示す。y 軸は、x 軸に示される感染後日数時に生存しているマウスの数を示す。右グラフは、マウスに、示される M a b を 1  $\mu$  g 注射した場合の結果を示す。

【図 6 A】図 6 A は、1 F 1 0 / 7 C 5 重鎖および軽鎖 (それぞれ、配列番号 1 および配列番号 2 ) ならびに 3 H 1 重鎖 (配列番号 3 ) の核酸配列を示す。

【図 6 B】図 6 B は、3 H 1 軽鎖 (配列番号 4 ) ならびに 1 A 2 重鎖および軽鎖 (それぞれ、配列番号 5 および配列番号 6 ) の核酸配列を示す。

【図 6 C】図 6 C は、A 7 重鎖および軽鎖 (それぞれ、配列番号 7 および配列番号 8 ) の核酸配列を示す。

【図 1】



【図 2】

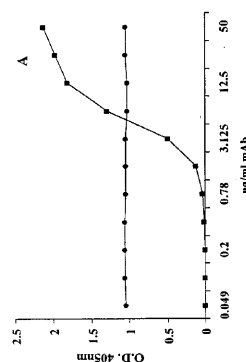
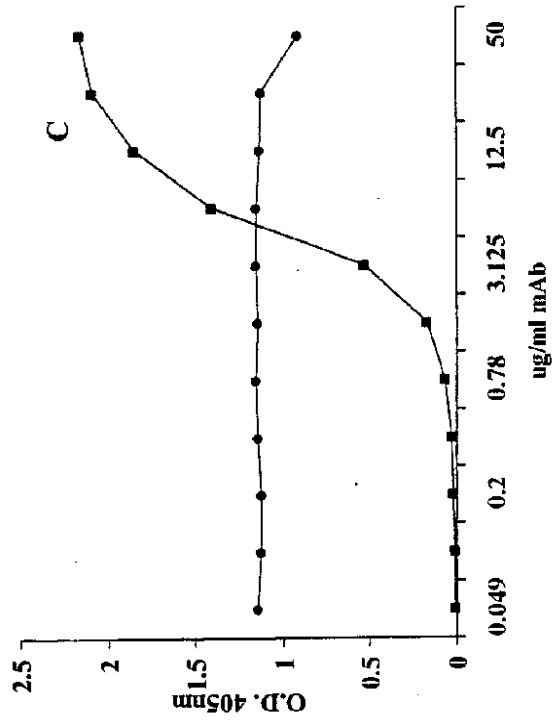
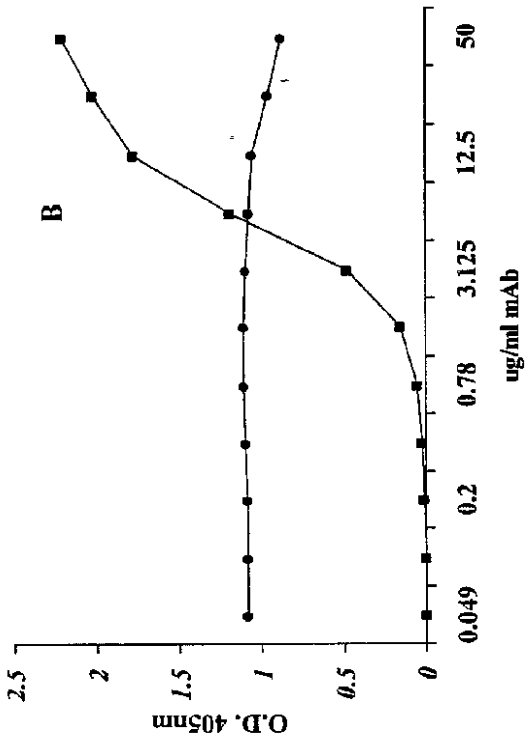


Fig 2



【 図 3 】

【 図 4 】

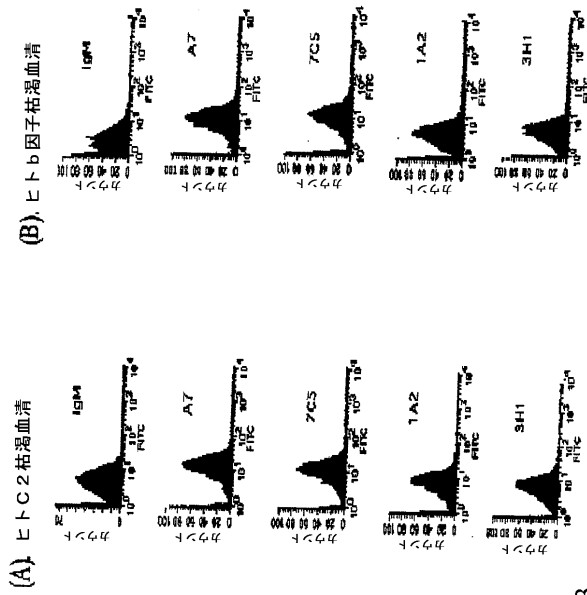


Fig 3

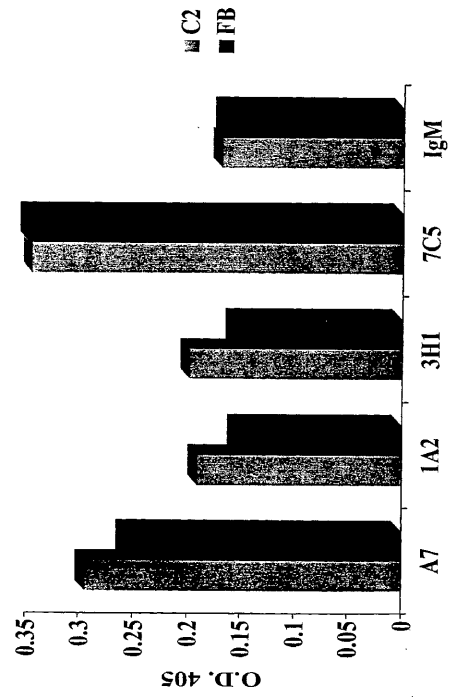


Fig 4

【図 5】

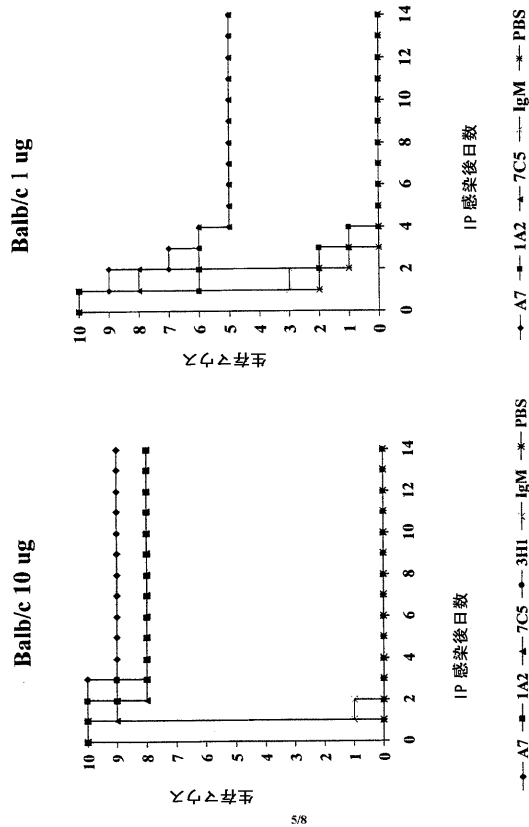


Fig 5

【図 6 A】

7C5  
1F10 重鎖 (配列番号 1)  
5'GAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAGGTTGCCAG  
TGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGGT  
CCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATG  
AGCTGGTCCGCGAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATT  
GTGGTGTGGTGTAGCACATACTACGACAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAC  
CATCTCCAGAGACAATTCAGAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTG  
AGAGCCGAGGACAGGCGGTATATTCTGTGCAAGCCCTCTAAGCTGGG  
GATCGTTTACTACTGGGCGAGGGAACCTGGTACCGCTCTCTCAGGAG  
TGCATCCGCCCAACCTTTTCCCTCTGCTCTCTGTGAGAAATTC3'

1F10 軽鎖 (配列番号 2)  
5'GATATTGAGCTCAGCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGCTACCCCTGGACA  
GCCGGCTCTCATCTCTGAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGTGTGGA  
AACACCTACTTGAATTGGTTTCAGCAGAGGCGAGGCCAATCTCAAAGCGCC  
TAATTTATAAGGTTTCTAACTGGGACTCTGGGTCAGAGACTTACGGCG  
AGTGGTCAAGGCACTGATTTCACACTGAAATCAGCAGGCTGGAGCTGAGG  
ATGTTGGGTTTATTACTGCAATGCAAGGTACACACTGGCTGGAGCTTCGCG  
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCACTGTGGCTGCCACCTCTCTTCA  
TCTCCGCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTCGCTCTGTGTGTC  
CTGCTGAATACTCTTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATA  
ACGCTCTCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA  
AGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGAGCTGAGCAAGCAGACT  
ACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGCGCTGAGCTC  
GCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG3'

3H1 軽鎖 (配列番号 3)  
5'GAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTCTCTGCTCTTTTAAAGGTTGCCAG  
TGTGAGGTGCACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCTGGGAGGT  
CCCTGAGACTCTCTGTGCAGCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATGGCATG  
CACTGGTCCGCGAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAT  
GGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGACACTCCGTGAAGGGCCGATTAC  
CATCTCCAGAGACAATTCAGAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTG  
AGAGCCGAGGACAGGCTGTGTTATTCTGTGCGAGAGTCCGGAGTGGCTGA  
GGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACACCGTCAACCT  
CTCTCAGGAGTGCATCCGCCCAACCTTTTCCCTCTGCTCTCTGTGAG  
AATTC3'

FIG. 6A

【図 6 B】

3H1 重鎖 (配列番号 4)  
5'GACATTGAGCTACGCACTCTCCATCTCCGTGTCTGATCTGTAGGAGAC  
AGAGTCACTACCTTGTGGGCGAGTCAAGGTATTAGCAGCTGGTATGCTT  
GGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTCTGATCTATGTTGCATC  
CCGTTTCAAGATGGGTCCTATCAAGGTTACGCGCAGTGGATCTGGGACA  
GATTTCACTCTACCATCAGCAGCTGAGCTGAAAGATTTCGAATTTACTA  
TTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCTCGGACGTTCCGCCAAGGACCAAGGTG  
GAAATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGCTTCTATCTTCCGCCATCTGA  
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTGCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCT  
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG  
GTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA  
GCCTCAGCAGCACCTGAGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG  
TCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGCGCTGAGCTGCCCGTCACAAAGAG  
CTTCAACAGG3'

1A2 重鎖 (配列番号 5)  
5'GAAATTGGGCTGAGCTGGATTTCCTTGTCTGCTATTTTAAAGGTTGCCAG  
TGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGT  
CCCTTAGACTCTCTGTGCAGCTCTGGAATTCATTTCAAGTAAAGCCTGGATG  
AGCTGGTCCGCGAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCGGTATTA  
AAAGCAAAACTGATGGTGGGACACAGACTACGCTGCACCCGTGAAGGCA  
GATTCACCATCTCAAGAGATGATTTCAAAAAACAGCTGTATCTGCAATGAA  
CAGCTGAAACCGAGGACACAGCGGTGTTATTCTGTACCAACAGCTGGAAC  
TACAGGTACTACTTACTCTGGGCGAGGGAACCTGGTACCGTCTCTCTC  
AGGAGTGCATCCGCCCAACCTTTTCCCTCTGCTCTCTGTGAGAAATTC  
3'

1A2 軽鎖 (配列番号 6)  
5'GACATTGAGCTCAGCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGA  
GAAAGTCACTACCTGCGGGGCAAGTCAAGCATTGGTAGCTTACAC  
TGGTACCAGCAGAAACAGATCAGTCTCCAAAGCTCTCATCAAGTATGCTT  
CCGAGTCTCTCAGGGGTCCCTCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGAC  
AGATTTCAACCTCACCATAATAGCCTGGAAGCTGAAGATGCTGCAACGTAT  
TACTGTATCAGAGTGTAGTATTACCTGGAGCTTCCGCCAAGGACCAAGG  
TGGAAATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGCTTCTATCTTCCGCCATCT  
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTGCTGTGTGCTGCTGAATAACTT  
CTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG  
GGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC  
AGCCTCAGCAGCACCTGAGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAA  
GTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGCGCTGAGCTGCCCGTCACAAAGA  
GCTTCAACAGG3'

FIG. 6B

【図 6 C】

A7 重鎖 (配列番号 7)  
5'GAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTCTCTGCTCTTTTAAAGGTTGCCAG  
TGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGT  
CCCTTAGACTCTCTGTGCAGCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATGGCATG  
AGCTGGTCCGCGAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCGGTATTA  
AAAGCAAAACTGATGGTGGGACACAGACTACGCTGCACCCGTGAAGGCA  
GATTCACCATCTCAAGAGATGATTTCAAAAAACAGCTGTATCTGCAATGAA  
CAGCTGAAACCGAGGACACAGCGGTGTTATTCTGTACCAACAGCTGGAAG  
AGCTACTACGATACTTCCAGCAGTGGGGCCAGGCGCCCTGGTCAACCTCT  
CTCAGGAGTGCATCCGCCCAACCTTTTCCCTCTGCTCTCTGTGAGAA  
TTTC3'

7 軽鎖 (配列番号 8)  
5'GATATTGAGCTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGCTACCCCTGGAGA  
GCCGGCTCTCATCTCTGAGGTCTAGTCAAGCCTCTGCAATGATAGTGGAT  
ACAACTATTGGATTGGTATCTGCAAGGCAAGGCAAGTCTCCAGCTCTCT  
GATCTATTGGTTCTAATCGGCGCTCCGGGTCCTGACAGGTTCAAGTGGCA  
GTGGATCAGGACAGATTTTCACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA  
TGTGGGTTTATTACTGCAATGCAAGCTTCAAACTCTCGGACGTTCCGCC  
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCACTGTGGCTGCACCATCTGCTTCTAT  
CTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTGCTGTGTGTGCT  
TGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATA  
CGCCCTCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGCAGCAAGCA  
AGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGAGCTGAGCAAGCAGACTAC  
GAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGCGCTGAGCTGCG  
CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG3'

FIG. 6C

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/12	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	C
	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ピロフスキー, リーゼ - アン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 1 2 8 , ニューヨーク, イースト エンド アベニュー  
1 8 0 , アpartment 1 2 エイ

(72)発明者 ゾン, ザオジン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 4 6 1 , ブロンクス, セミノール アベニュー 1 5 1  
6

(72)発明者 チャング, クィン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 4 6 1 , ブロンクス, イーストチェスター ロード 1  
9 2 5 , アpartment 1 6 エイ

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA50 CA04 CA05 CA11 DA02 GA03  
4B065 AA91Y AB01 CA24 CA44 CA46  
4C085 AA14 BA14 CC02 CC07 CC22 CC23 EE01  
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA29 EA52 FA74