(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3626753号
(P3626753)
(45)発行日　平成17年3月9日(2005.3.9)　(24)登録日　平成16年12月10日(2004.12.10)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C12P 21/08	C12P	21/08	ZNA
C07K 16/28	C07K	16/28	
C12N 5/10	C12N	5/00	A
C12N 15/09	C12N	15/00	A

請求項の数 18　(全 28 頁)

(21)出願番号　特願平5-502459
(86)(22)出願日　平成4年7月15日(1992.7.15)
(65)公表番号　特表平6-508996
(43)公表日　平成6年10月13日(1994.10.13)
(86)国際出願番号　PCT/GB1992/001289
(87)国際公開番号　WO1993/002191
(87)国際公開日　平成5年2月4日(1993.2.4)
審査請求日　平成11年7月14日(1999.7.14)
(31)優先権主張番号　9115364.3
(32)優先日　平成3年7月16日(1991.7.16)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(73)特許権者　500514856
ケンブリッジ　ユニバーシティ　テクニカル　サービシズ　リミティド
イギリス国，ケンブリッジ　シービー２　１ティーエス，トリニティー　レーン，ジ　オールド　スクールズ
(74)代理人　100095832
弁理士　細田　芳徳
(72)発明者　ワルドマン、ハーマン
イギリス国、シービー２・１キューピー、ケンブリッジシヤー、ケンブリッジ、テニスコート・ロード（番地なし）、デパートメント・オブ・パソロジー、ザ・ユニバーシティー・オブ・ケンブリッジ内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ１８に対するヒト化抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
軽鎖可変領域と重鎖可変領域とに含んでなるヒト化抗体またはそのフラグメントであって、ヒトCD18抗原に特異性を有し、該軽鎖可変領域の相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）および該重鎖可変領域の相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）が、以下のアミノ酸配列：
軽鎖:CDR1（配列番号４）
CDR2（配列番号６）
CDR3（配列番号８）
重鎖:CDR1（配列番号12）
CDR2（配列番号14）
CDR3（配列番号16）
を有するものである、ヒト化抗体またはそのフラグメント。
【請求項２】
軽鎖の可変ドメインフレームワークがタンパクREIの軽鎖可変ドメインフレームワークであるか、もしくはそれと相同である請求の範囲第１項記載の抗体またはフラグメント。
【請求項３】
重鎖の可変ドメインフレームワークがタンパクNEWMの重鎖可変ドメインフレームワークであるか、もしくはそれと相同である請求の範囲第１項または第２項記載の抗体またはフラグメント。

【請求項４】
請求の範囲第１項ないし第３項のいずれか１項に記載されるヒト化抗体またはフラグメントの調製方法であって、（ｉ）ヒト化抗体またはフラグメントの軽鎖をコードする第１発現ベクターおよびヒト化抗体またはフラグメントの重鎖をコードする第２発現ベクター；または（ii）ヒト化抗体またはフラグメントの軽鎖および重鎖の両方をコードする単一の発現ベクター；のいずれかを用いてホスト細胞を形質転換し、該ホスト細胞を各鎖が発現する条件下に維持し、並びに発現した鎖の集合体により産生されるヒト化抗体またはフラグメントを単離することを具備する方法。
【請求項５】
軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含んでなるヒト化抗体またはそのフラグメントをコードするDNA分子であって、該ヒト化抗体またはそのフラグメントが、ヒトCD18抗原に特異性を有し、該軽鎖可変領域の相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）および該重鎖可変領域の相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）が、以下のアミノ酸配列：
軽鎖:CDR1（配列番号４）
CDR2（配列番号６）
CDR3（配列番号８）
重鎖:CDR1（配列番号12）
CDR2（配列番号14）
CDR3（配列番号16）
を有するものである、DNA分子。
【請求項６】
軽鎖の可変ドメインフレームワークがタンパクREIの軽鎖可変ドメインフレームワークであるか、もしくはそれと相同である請求の範囲第５項記載のDNA分子。
【請求項７】
重鎖の可変ドメインフレームワークがタンパクNEWMの重鎖可変ドメインフレームワークであるか、もしくはそれと相同である請求の範囲第５項または第６項記載のDNA分子。
【請求項８】
発現ベクターの形態にある請求の範囲第５項ないし第７項のいずれか１項に記載のDNA分子。
【請求項９】
請求の範囲第８項記載の発現ベクターで形質転換されたホスト細胞。
【請求項１０】
請求の範囲第１項ないし第３項のいずれか１項に記載の抗体またはフラグメントの軽鎖をコードするDNA分子。
【請求項１１】
軽鎖CDRのヌクレオチド配列が、以下：
CDR1（配列番号３）
CDR2（配列番号５）
CDR3（配列番号７）
である請求の範囲第10項記載のDNA分子。
【請求項１２】
請求の範囲第１項ないし第３項のいずれか１項に記載の抗体またはフラグメントの重鎖をコードするDNA分子。
【請求項１３】
重鎖CDRのヌクレオチド配列が、以下：
CDR1（配列番号11）
CDR2（配列番号13）
CDR3（配列番号15）
である請求の範囲第12項記載のDNA分子。
【請求項１４】

請求の範囲第１項ないし第３項のいずれか１項に記載の抗体またはフラグメントの軽鎖および重鎖をコードする組換え発現系を含んでなるホスト細胞。
【請求項１５】
ヒト化抗体またはそのフラグメントの調製方法であって、請求の範囲第14項に記載のホスト細胞を培養し、前記抗体またはフラグメントを回収することを具備する方法。
【請求項１６】
抗体またはフラグメントを精製することをさらに具備する請求の範囲第15項記載の方法。
【請求項１７】
相補性決定領域（CDR）が、以下のアミノ酸配列：
軽鎖:CDR1（配列番号４）
CDR2（配列番号６）
CDR3（配列番号８）
重鎖:CDR1（配列番号12）
CDR2（配列番号14）
CDR3（配列番号16）
を有するものである、ヒトCD18抗原に特異性を有する、ヒト化抗体またはそのフラグメント。
【請求項１８】
軽鎖の可変ドメインフレームワークがタンパクREIの可変ドメインフレームワーク由来であり、かつ重鎖の可変ドメインフレームワークがタンパクNEWMの可変ドメインフレームワーク由来である請求の範囲第17項記載の抗体またはフラグメント。
【発明の詳細な説明】
この発明は、CD18抗原に結合する抗体、そのような抗体の調製およびこの抗体を含有する医薬組成物に関する。
抗体は、典型的には、ジスルフィド結合および２つの軽鎖で互いに連結した２つの重鎖を有している。各々の重鎖は、多くの定常ドメインが後に続く可変ドメインをその一端に有している。各々の軽鎖は、その一端に可変ドメインを、他端に定常ドメインを有している。軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並んでいる。軽鎖定常ドメインは、重鎖の第１定常ドメインと並んでいる。軽鎖および重鎖中の定常ドメインは、抗体の抗原への結合には直接は関わらない。
軽鎖および重鎖の各対の可変ドメインは、抗原結合部位を形成する。軽鎖および重鎖のドメインは同様の一般構造を有しており、各ドメインは、配列が比較的保全され、３つの相補性決定部位（CDR）によって連結された、４つ領域からなるフレームワークを有している。この４つのフレームワーク領域は、βシート構造を大きく取り入れ、CDRはこのβシート構造に連結し、時にはその一部を形成するループを形成する。CDRは、フレームワーク領域によって非常に接近した状態に保持され、他のドメインからのCDRと共に、抗原結合部位の形成に寄与する。抗体のCDRおよびフレームワーク領域は、Kabatら（「免疫学的に重要なタンパク質の配列（Sequences of proteins of immunological interest）、米国健康社会福祉省、米国政府印刷局、1987）を参照することにより決定することができる。
抗体の可変ドメインのフレームワークよりも、CDRが異なる種から誘導される改変抗体（altered antibody）の調製がEP－A－0239400に開示されている。このCDRは、ラットもしくはマウスモノクローナル抗体から誘導することができる。改変抗体の可変ドメインおよび定常ドメインのフレームワークは、ヒト抗体から誘導することができる。ヒトに投与された場合、そのようなヒト化抗体が引き出す免疫応答は、ヒトによって高められたラットもしくはマウス抗体に対する免疫応答と比較して無視し得るものである。ヒト化CAMPATH－１抗体がEP－A－0328404に開示されている（Campathは、ウェルカム企業グループの登録商標である）。
この発明の一側面によると、抗体がヒトCD18抗原に結合し得るように、下に示す各CDRの十分なアミノ酸配列が提示されているヒト化抗体が提供される。

軽鎖:CDR1（配列番号３および４）
CDR2（配列番号５および６）
CDR3（配列番号７および８）
重鎖:CDR1（配列番号11および12）
CDR2（配列番号13および14）
CDR3（配列番号15および16）
他の側面によると、この発明は、抗体がヒトCD－18抗原に結合し得るように、上に示す各CDRの十分なアミノ酸配列が提示されているヒト化抗体をコードするDNA分子を提供する。この抗体は、好ましくは、天然抗体またはそれらのフラグメントの構造を有している。したがって、この抗体は、完全抗体、$(Fab')_2$フラグメント、Fabフラグメント、軽鎖ダイマーまたは重鎖ダイマーを含んでいてもよい。この抗体は、IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4のようなIgG;またはIgM、IgA、IgEまたはIgDであればよい。この抗体の重鎖の定常ドメインは、それに応じて選択することができる。軽鎖定常ドメインは、κまたはλ定常ドメインであってもよい。
この抗体は、WO86/01533に記述されるタイプのキメラ抗体であってもよい。WO86/01533によるキメラ抗体は、抗原結合部位および非免疫グロブリン部位を含む。抗原結合部位は、抗体軽鎖可変ドメインおよび／または重鎖可変ドメインである。典型的には、このキメラ抗体は、軽鎖および重鎖可変ドメインの両者を含む。非免疫グロブリン部位は、抗原結合部位のＣ末端に融合している。この非免疫グロブリン部位は、典型的には非免疫グロブリンタンパクであり、酵素領域、公知の結合特異性を有するタンパクから誘導された領域、タンパク毒から誘導された領域または、まさに遺伝子によって発現したタンパクから誘導された領域であってもよい。非免疫グロブリン部位は、炭水化物（carbon hydrate）領域であってもよい。このキメラ抗体の２つの部位は、開裂可能なリンカー配列を介して結合していてもよい。
配列番号３ないし８および配列番号11ないし16の軽鎖CDR1ないし３および重鎖CDR1ないし３は、それぞれ、CD18抗体であるYFC51.1.1ラット抗体のCDRである。ヒトCD18抗原に対するヒト化抗体の特異性は、下記の通り、フローサイトメトリー、単球付着および／またはＴ細胞拡散アッセイによって測定することができる。
単球（MNC）付着
MNCを、抗体（20μｌ）の存在下および非存在下において、ホルボールジエステルPDBu（10^{-9}M）で５分間処理する。次いで、これらの細胞をウシ大動脈内皮細胞（BAEC）単層に移し、95%空気、５%CO_2の加湿雰囲気において37℃で30分間インキュベートする。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で３回洗浄することにより、非付着細胞を除去する。次に、付着細胞を、50μｌの0.5%ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを用いてその場で溶解させる。各ウェルに0.4mM過酸化水素を含有するジアニシジン・ジハイドロクロライド（0.63mM）を添加して（250μｌ）さらに10分間インキュベートする。その後、吸光度の増加として記録される単球特異的ミエロペルオキシダーゼの存在を利用して酵素活性を評価する。試料の450nmでの光学密度は、マルチウェルプレートリーダー（Anthosシリーズ、Lab Teck instruments）を用いて記録することができる。その後、処理試料と未処理試料との間で比較を行なうことができる（Bathら,J.Immunol.Meth.,118,59－65,（1989））。
フローサイトメトリー
Gladwinらの方法（Biochem.Biophys.Acta.,1052,166－172,（1990））に従って、抗体を用いたラット、ウサギ、モルモットおよびヒト単球の表面標識を行なう。簡単に述べると、細胞懸濁液（５×10^6）の一部1mlを適切な抗体と共にインキュベートし、単分散させ、溶融氷上で30分間インキュベートする。これらの細胞をPBS中で２回洗浄し、ウサギ抗ラットＦ（ab'）$_2$FITC結合体の1:200希釈液と共に溶融氷上でさらに30分間インキュベートする。最後に、これらの細胞をPBS中で３回洗浄し、0.1%パラホルムアルデヒド中に固定する。表面標識の分析は、標準コンピューター、電子工学および光学を用いるエピクス・エリート（Epics Elite）フローサイトメトリー（Coulter cytometry,Hialhea,FL）を用

いることにより行なうことができる。このエリートは、15mW 488nmアルゴンレーザー（Cyonicsモデル2201、San Jose、CA）で構成されている。単球およびリンパ球群を、前方角ライトスキャター（forward angle light scatter）およびサイドスキャターで分離する。2×10^4単球についての緑色蛍光データをビット－マップ・ゲート制御（bit－map gating）によって集め、３回のログ・スケールについて集める。同様の方法で、2×10^4好中球についての緑色蛍光データを集める。各試料について、一次mAbの存在下における平均蛍光強度を、ウサギ抗ラットＦ（ab′）$_2$FITCフラグメントのみと共にインキュベートした細胞と比較し、細胞標識の割合を決定する。試料は３重に標識することが可能であり、３回の別々の機会に繰り返し実験を行なうことができる。

Ｔ細胞拡散アッセイ

フィコール・パックによる密度勾配分離を用いて脱フィブリン化血液からヒト単核球を調製する。リンパ球（2×10^5細胞）を、平底96ウェルマイクロタイタープレート（Nunclon,Roskild,Denmark）の各ウェル内で、10％自己血清、2mMグルタミンおよび100iUペニシリン/100μｇ・ml^{-1}ストレプトマイシンを補ったRPMI1640において培養する。異なる濃度のモノクローナル抗体の存在もしくは非存在下における、培地単独、または抗原（Tetanus Toxoid、３μｇ・ml^{-1}）もしくはマイトジェン（PHA、１μｇ・ml^{-1}）を伴う３回培養を行なう。細胞を、95％空気、５％CO_2の加湿雰囲気中において、37℃で５日間培養する。次いで、ウェルに１μCi［メチル^{3}H］チミジン（2Ci・mmol^{-1}、Amersham）を規則的に供給し、18時間後に回収してＢカウンター（LKB,Betaplate,Sweden）を用いる液体シンチレーションにより放射活性を計測する。結果は、平均＋／－SEMとして表わされる。

ヒト化抗体のCDRは、上述の軽鎖CDR1ないし３および重鎖CDR1ないし３であることが適当である。しかしながら、これらのCDRのアミノ酸配列は変化してもよい。各CDRのアミノ酸配列は、アミノ酸置換、挿入および／または欠損により40％まで、例えば30％まで、20％まで、あるいは10％まで、変化させることができる。

したがって、各CDRは１もしくは２のアミノ酸置換、挿入および／または欠損を含む。軽鎖CDRにおいては、３つまでのアミノ酸置換、挿入および／または欠損があってもよい。軽鎖CDR1もしくは重鎖CDR3においては、４つまでのアミノ酸置換、挿入および／または欠損が存在してもよい。重鎖CDR2においては、６つまでのアミノ酸置換、挿入および／または欠損が存在してもよい。好ましくは、各CDRのアミノ酸配列は、YFC51.1.1の各CDRのそれと実質的に相同である。

抗体のフレームワークおよび定常ドメインは、ヒトフレームワークおよびヒト定常ドメインである。好ましくは、抗体重鎖の可変部位のフレームワークは、ヒトタンパクNEWMの対応フレームワーク（Saulら,J.Biol.Chem.25,585－597,（1987））と実質的に相同である。フレームワークに係る相同性は、NEWMに関して一般に80％以上、例えば90％以上あるいは95％以上である。多くのアミノ酸置換、挿入および／または欠損が存在し得る。結合を保存するためになされることもあるフレームワーク変化の候補には、アミノ酸残基27、30、48、66、67、71、91、93および94の変化が含まれる。

抗体軽鎖の可変部位のフレームワークは、典型的には、タンパクREIの可変ドメインフレームワーク（Eppら,Eur.J.Biochem.45,513－524,（1974））と実質的に相同である。フレームワークに係る相同性は、REIに関して一般に80％以上、例えば90％以上、あるいは95％以上である。多くのアミノ酸置換、挿入および／または欠損が、例えばKabatらのナンバリングによるアミノ酸残基71に、あってもよい。

この発明に従い、ヒト化抗体の軽鎖をコードする第１の発現ベクターおよび重鎖をコードする第２の発現ベクターで形質転換されたホストを、各鎖が発現するような条件下に維持し、それにより発現した鎖の集合体により産生されるヒト化抗体を単離することを具備する方法によって、ヒト化抗体が調製される。

第１および第２の発現ベクターは、同一のベクターであってもよい。この発明は、さらに、

－ヒト化抗体の軽鎖および重鎖をコードするDNA配列；

－前記DNA配列を組み込む発現ベクアー；および

－前記発現ベクターで形質転換されたホスト
を提供する。
抗体の各鎖は、CDR置換により調製することもできる。ヒト抗体の軽鎖もしくは重鎖の可変部位のCDRは、得られた抗体がCD18抗原と結合し得るに十分な、ラット抗ヒトCD18抗体YFC51.1.1の各CDRのアミノ酸配列によって置換される。ヒト抗体鎖の超可変部位をコードするDNAのCDRコード領域は、所望のCDRをコードするDNAによって置換される。適当であるならば、この改変DNAを、抗体鎖の定常ドメインをコードするDNAに連結させる。このDNAを発現ベクターにクローニングする。この発現ベクターを、抗体鎖が発現するような条件下で培養される適合ホスト細胞に導入する。その後、この方法で共に発現する相補抗体鎖を組み立ててヒト化抗体を形成することもできる。
この発明は、ラット抗体YFC51.1.1から直接もしくは間接的に誘導されるCDRを有するヒト化抗体の生成に言及しつつここに記載される。しかしながら、ここに記載される技術は、他のヒト化抗CD18抗体の誘導に等しく用いることができる。さらなる側面によると、この発明は、ヒト化（CDRグラフト化）抗CD18抗体を提供する。
モノクローナル抗体のヒト化には４つの一般工程がある。すなわち、
（１）開始抗体軽鎖および重鎖可変ドメインのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列の決定；
（２）ヒト化抗体の設計、すなわち、ヒト化プロセスにおいてどの抗体フレームワーク領域を用いるかの決定；
（３）実際のヒト化方法論／技術；および
（４）ヒト化抗体の形質導入および発現
がある。
工程1:抗体軽鎖および重鎖可変ドメインのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列の決定
抗体をヒト化するためには、抗体重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列のみが知られていることが必要である。定常領域の配列は、これらが再造形戦略に寄与しないため、不適当である。抗体可変ドメインアミノ酸配列を決定する最も簡単な方法は、重鎖および軽鎖可変ドメインをコードするクローン化cDNAからのものである。
所定の抗体重鎖および軽鎖可変ドメインcDNAをクローニングする一般的な方法には、（１）通常のcDNAライブラリーによるもの、または（２）ポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）によるもの、の２通りがある。これらの両方法は、広く知られている。cDNAのヌクレオチド配列が与えられると、この情報を抗体可変ドメインの推定アミノ酸配列に翻訳することは簡単なことである。この例において、齧歯類YFC51.1.1の軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列が配列番号１および２並びに配列番号９および10に示されている。
工程2:ヒト化抗体の設計
ヒト化においてどのヒト抗体配列を用いるかを決定するにあたり、幾つかの要素が考慮される。軽鎖および重鎖のヒト化は互いに独立している考えられているが、いずれについても論理は基本的に類似している。
この選択プロセスは、以下の原理に基づいている：所定の抗体の特異性および親和性は、主として、可変部位CDRのアミノ酸配列によって決定される。可変ドメインフレームワーク残基の直接の寄与は、ほとんどないか、もしくは全くない。フレームワーク領域の主な機能は、CDRを、抗原を認識するためのそれらの適切な空間内方位に保持することにある。このため、齧歯類CDRをヒト可変ドメインフレームワークに置換することは、ヒト可変ドメインフレームワークが、それらが起源とする齧歯類可変ドメインと高度に相同である場合には、ほとんど、それらの正しい空間内方位を保有する結果となるであろう。したがって、ヒト可変ドメインは、好ましくは、齧歯類可変ドメイン（複数）と高い相同性を有するべきである。適当なヒト抗体可変ドメイン配列は、以下の通りに選択することができる：
1.コンピュータ・プログラムを用いて、全ての利用可能なタンパク（およびDNA）データベースを、齧歯類抗体可変ドメインに最も相同なヒト抗体可変ドメイン配列について検索

する。適切なプログラムの出力は、齧歯類抗体に最も相同な配列、各配列に対する％相同性、齧歯類配列に対する各配列の位置合わせ（alignment）のリストである。これは、重鎖および軽鎖可変ドメイン配列の両者について別々に行なう。上記分析は、ヒト免疫グロブリン配列のみが含まれるのであれば、より容易に達成される。

2.ヒト抗体可変ドメイン配列を列挙し、相同性を比較する。この比較は、非常に変化しやすいCDR3を除いて、最初にCDRの長さについて行なう。ヒト重鎖およびκおよびλ軽鎖は、サブグループ（重鎖３サブグループ、κ鎖４サブグループ、λ鎖６サブグループ）に分割される。各サブグループ内のCDRサイズは類似しているが、サブグループ間では変化する。通常、齧歯類抗体CDRを、相同性の第１近似としてヒトサブグループの１つと対にすることが可能である。次に、類似する長さのCDRを有する抗体を、アミノ酸配列相同性について比較する。これは、特にCDR内について行なわれるが、周囲のフレームワーク領域においても行なう。最も相同なヒト可変ドメインをヒト化のためのフレームワークとして選択する。

工程3:実際のヒト化方法論／技術

抗体は、EP－Ａ－0239400に従って、ヒトフレームワークに所望のCDRをグラフト化することによりヒト化できる。したがって、所望の再造形抗体をコードするDNA配列は、再造形することを望むCDRを含むヒトDNAから始めて調製することができる。所望のCDRを含む齧歯類可変ドメインアミノ酸配列を、選択したヒト抗体可変ドメイン配列のものと比較する。齧歯類の対応残基に変更してヒト可変部位に齧歯類CDRを組み込むために必要なヒト可変ドメイン中の残基に印をつける。ヒト配列の置換、追加、削除を必要とする残基もまたあり得る。

ヒト可変ドメインフレームワークを所望の残基を有するように変異させるために用いることができるオリゴヌクレオチドを合成する。それらのオリゴヌクレオチドは、都合のよいいかなるサイズであってもよい。実施する人間は、通常、その人が利用可能な特定の合成機の能力によってのみ、長さに制限を受ける。オリゴヌクレオチド指向（oligonucleotide－directed）イン・ビトロ変異の方法は良く知られている。

代わりに、WO92/07075の組換えポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）方法論を用いてヒト化を達成することができる。この方法論を用いて、ヒト抗体のフレームワーク領域間にCDRをスプライスすることができる。

一般に、WO92/07075の技術は、２つのフレームワーク領域、ABおよびCD、並びにそれらの間の、ドナーCDRによって置換されるCDRを含むテンプレートを用いて行なうことができる。プライマーＡおよびＢはフレームワーク領域ABの増幅に用いられ、プライマーＣおよびＤはフレームワーク領域CDの増幅に用いられる。しかしながら、プライマーＢおよびＣは、各々それらの５′末端に、ドナーCDRの全てもしくは少なくとも一部に対応するさらなる配列をも有している。プライマーＢおよびＣは、PCRが実行可能な条件下で、互いにそれらの５′末端のアニーリングを行なうに十分な長さで重複している。これにより、増幅された領域ABおよびCDは、重複伸長による遺伝子スプライシングを受けて、単一反応でヒト化生成物を生成することができる。

工程4:再造形抗体の形質導入および発現

抗体を再造形するための変異反応に続いて、変異DNAを軽鎖および重鎖定常部位をコードする適当なDNAに連結し、発現ベクターにクローニングしてホスト細胞、好ましくは哺乳類細胞に形質導入することができる。これらの工程は、ルーチン様式で行なうことができる。したがって、再造形抗体は、

（ａ）少なくともIg重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするDNA配列に作働し得るように連結された適切なプロモーターを含む、第１の複製可能な発現ベクターであって、前記可変ドメインがヒト抗体からのフレームワーク領域およびこの発明のヒト化抗体に必要なCDRを含む発現ベクターを調製し、

（ｂ）少なくとも相補Ig軽鎖もしくは重鎖の各々の可変ドメインをコードするDNA配列に作働し得るように連結された適切なプロモーターを含む、第２の複製可能な発現ベクターを調製し、

（ｃ）第１のベクター、または調製されたベクターの両者を用いて細胞系を形質転換し、および
（ｄ）前記形質転換細胞系を培養して前記改変抗体を生成させる、
ことを具備する。
好ましくは、工程（ａ）におけるDNA配列は、ヒト抗体鎖の両可変ドメインおよび特定の、もしくは各定常ドメインをコードする。このヒト化抗体は、適切な組換え発現系であればどのようなものを用いても調製することができる。改変抗体を生成させるために形質転換される細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系または、有利にリンパ組織を起源とする、ミエローマ、ハイブリドーマ、トリオーマもしくはクアドローマ細胞系のような不死化哺乳動物細胞系であってもよい。この細胞系には、エプシュタイン・バールウイルス（Epstein－Barr virus）のようなウイルスを用いた形質転換によって不死化される、Ｂ細胞のような正常リンパ球も含まれる。最も好ましくは、不死化細胞系はミエローマ細胞系もしくはそれらの派生体である。
この発明による抗体の発現に用いられるCHO細胞は、ジハイドロフォレートリダクターゼ（dhfr）を欠失し、それ故成長のためにチミジンおよびハイポキサンチンに依存するものであればよい（Urlaubら,proc.Natl.Acac.Sci.U.S.A.,77,4216－4220（1980））。親dhfr CHO細胞系は、抗体および、dhfr陽性フェノタイプのCHO細胞形質転換体の選別を可能にするdhfrをコードするDNAが形質導入されている。選別は、このコロニーをチミジンおよびハイポキサンチンを欠く培地で培養することにより行なう。これらの欠失は、非形質転換細胞の成長を妨げ、形質転換細胞がフォレート経路を再び拾い上げて選別システムを迂回することを妨げる。これらの形質転換体は、通常、形質導入された興味対象のDNAおよびdhfrをコードするDNAを一緒に組み込んだことによる効果により、低レベルの興味対象DNAを発現する。抗体をコードするDNAの発現レベルは、メトトレキセート（MTX）を用いて増幅することにより増加させることができる。この薬剤は酵素dhfrの直接阻害剤であり、これらの条件下で生存するに十分なまでそれらのdhfr遺伝子のコピー数を増幅する耐性コロニーの単離を可能にする。dhfrをコードするDNA配列および抗体をコードするDNA配列は元の形質転換体では密接に連結しているので、通常、共存増幅（concomitant amplification）が起こり、それ故に所望の抗体の発現が増幅する。
CHOもしくはミエローマ細胞と一緒に用いる他の好ましい発現系は、WO87/04462に記載されるグルタミン・シンセターゼ（GS）増幅系である。この系は、酵素GSをコードするDNAおよび所望の抗体をコードするDNAを用いた細胞の形質導入を含む。次いで、グルタミン非含有培地中で成長し、それ故GSをコードするDNAが組み込まれたことが推測できる細胞を選択する。次に、これらの選択されたクローンに対し、メチオニン・スルフォキシミン（Msx）を用いる酵素GSの阻害を行なう。これらの細胞は、生き残るために、抗体をコードするDNAの共存増幅を伴ってGSをコードするDNAを増幅する。
ヒト化抗体を産生するために用いられる細胞系は、好ましくは、哺乳動物細胞系ではあるが、代わりに、細菌細胞系もしくは酵母細胞系のような他の適切な細胞系も用いることができる。特に、E.coli由来細菌株が使用可能であることは考慮される。選られた抗体は、その機能性について照合する。機能性が失われている場合には、工程（２）に戻り、抗体のフレームワークを変える必要がある。
一旦発現した後は、この発明の抗体全体、それらのダイマー、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を取り出し、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む当分野の標準的な手順で精製することができる（一般的には、Scopes,R.,Protein Purification,Springer－Verlag,N.Y.（1982）を参照）。医薬上の使用には、少なくとも約90ないし95％の等質性を有する実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98ないし99％以上の等質性を有していることが最も好ましい。望みのままに、部分的であれ、等質にまでであれ、一旦精製されると、治療に用い、あるいはアッセイ手順の開発及び実施、免疫蛍光染色等に用いることができる（一般的には、Immunological Methods,IおよびII巻,Lefkovits and Pernis編,Academic Press,New York,N.Y.（1979および1981）を参照）。

ヒト化CD18抗体は、例えば、白血球介在状況の治療に用いることができる。ヒト化CD18抗体は、典型的には、敗血症または他の感染性もしくは非感染性外傷における白血球の肺および他の器官への流入の阻止にその用途を見出す。したがって、ヒト化CD18抗体は、内毒性ショックもしくは成人呼吸困難症候群の患者における白血球の肺および他の器官への侵入の阻止に用いることができる。この抗体は、血栓崩壊治療後の喘息もしくは白血球介在レパーフュージョン（reperfusion）損傷の治療、敗血症または他の感染性もしくは非感染性外傷に起因する炎症を有する患者の肺および他の器官における炎症の治療、抗感染症剤を投与されている患者の炎症の除去もしくは軽減、あるいは化学療法における患者への治療薬の投与の補助に用いることができる（EP－Ａ－0346078）。

この発明のヒト化抗体は、他の抗体、特に疾患に応答し得る細胞上の他のマーカーとの反応性を有するヒトモノクローナル抗体と組み合わせて用いることもできる。例えば、適当なＴ細胞マーカーには、第１回国際白血球分化ワークショップ，Leukocyte Typing,Bernardら編,Spr inger－Verlag,N.Y.（1984）によって命名された、いわゆる“分化の集団（Clusters of Differentiation）”にグループ分けされるものが含まれる。

この抗体はまた、化学療法剤もしくは免疫抑制剤と連動して与えられる、分離投与組成物（separatelyadministered composition）として用いることもできる。典型的には、これらの薬剤にはシクロスポリンＡもしくはプリン・アナローグ（例えば、メトトレキセート、６－メルカルプトプリン等）が含まれるが、さらに当業者に公知の多くの薬剤（例えば、シクロホスファミド、プレドニソン等）を利用することもできる。

この発明の抗体は、免疫毒素の一部を形成してもよい。免疫毒素は、２つの成分で特徴付けられ、イン・ビトロもしくはイン・ビボにおいて選ばれた細胞を殺すのに特に有用である。“移送担体（delivery vehicle）”として知られる第２の成分は、毒性作用物質を特定の細胞タイプ、例えばカルシノーマを含む細胞に移送する手段を提供する。２つの成分は、通常、種々の公知化学手段により互いに化学的に結合している。例えば、細胞毒性作用物質がタンパクであり、第２成分が完全免疫グロブリンである場合には、結合はヘテロ二官能性架橋剤、例えば、SPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によるものであればよい。種々の免疫毒性の製造は、当分野では公知であり、例えば“モノクローナル抗体－毒素結合体：魔法の弾丸を目指して",Thorpeら，Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine,Academic Press,pp.168－190（1982）に見出すことができる。

種々の細胞毒性作用物質が免疫毒素中での使用に適している。細胞毒性作用物質には、ヨウ素－131、イットリウム－90、レニウム－188、およびビスマス－212のような放射核；ビンデシン（vindesine）、メトトレキセート、アドリアマイシン、およびシスプラチンのような多数の化学療法剤；およびアメリカヤマゴボウ抗菌タンパク、シュードモナス外毒素Ａ、リシン、ジフテリア毒素、リシンＡ鎖等のリボソーム阻害タンパク、もしくはホスホリパーゼ酵素（例えば、ホスホリパーゼＣ）のように細胞表面で活性な作用物質のような細胞毒性タンパクが含まれうる。一般には、“キメラ毒素",OlsnesおよびPhil,Pharmac.Ther.,25,335－381（1982）、および“癌検出および治療のためのモノクローナル抗体",baldwinおよびByers編,pp.159－179,224－266,Academic Press（1985）参照。

免疫毒素の移送成分は、この発明によるヒト化抗体である。完全免疫グロブリンまたはそれらの結合フラグメント、例えばFabが好ましく用いられる。典型的には、免疫毒素中の抗体は、ヒトIgA,IgMもしくはIgGイソタイプのものであるが、所望により他の哺乳動物定常部位を利用することもできる。

この発明は、さらに、薬剤学上許容し得る担体もしくは希釈剤および、活性成分として、この発明によるヒト化抗体を含有する医薬組成物を提供する。この組成物は、この発明による免疫毒素を含有していてもよい。この発明のヒト化抗体、免疫毒素およびそれらの医薬組成物は、非経口投与、すなわち皮下、筋肉内もしくは静脈内投与に特に有用である。非経口投与用の組成物は、通常、抗体もしくはそれらのカクテルを許容しうる担体、好ましくは水性担体中に溶解した溶液を含む。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン等を用いることができる。これらの溶液は無菌であり、一般に特別な物質は含んでいない。これらの組成物は、通常の公知滅菌技術により滅菌される

。これらの組成物は、生理学的条件を近づけるために、pH調節および緩衝剤、毒性調節剤等の薬剤学的に許容しうる補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を所望により含むことができる。これらの処方における抗体の濃度は大きく変化しうる。例えば、約0.5重量％未満、通常は少なくとも約１重量％から15もしくは20重量％もの間であり、選ばれた特定の投与方式に従い、主に流体容積、粘度等に基づいて選択される。

このため、筋肉内注射用の典型的な医薬組成物は、無菌緩衝水1mlおよび抗体50mgを含むように調製することができる。静脈注射用の典型的な組成物は、無菌リンゲル溶液250mlおよび抗体150mgを含むように調製することができる。非経口投与可能な組成物の実際の調製方法は、当業者には公知もしくは明らかであり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science,15版,Mack Publishing Company,Easton,Pennsylvania（1980）により詳細に記載されている。

この発明の抗体は、保存のために凍結乾燥し、使用の前に適切な担体中でもどすことができる。この技術は、通常の免疫グロブリンで有効であることが示されている。あらゆる適切な凍結乾燥並びに再構成技術を用いることができる。凍結乾燥および再構成が抗体活性損失の程度を変化させ（例えば、通常の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも活性損失が大きい傾向にある）、使用レベルを調節して補償しなければならないことがあり得ることは当業者には認識されるであろう。

このヒト様抗体もしくはそれらのカクテルを含有する組成物は、予防および／または治療処置のために投与することができる。治療目的の適用においては、組成物は、すでに疾患に罹患した患者に、治療に十分であるか、あるいは少なくともその疾患および余病の進行を止め、もしくは緩和させる量が投与される。これを達成するに適した量は、“治療上の有効投与単位量”と定義される。この用途に有効な量は、感染の重篤性および患者自身の免疫系の一般状態に依存するが、一般に、投与単位量当り抗体約１ないし約200mgの範囲をとり、より一般的には患者当り５ないし25mgの投与量が用いられている。この発明の物質は、一般に、疾患が重篤な状態、すなわち生命が脅かされているか、もしくは潜在的に生命が脅かされている状況で用いられることは心に留めておくべきである。そのような場合には、この発明のヒト様抗体によって達成される外部発生物質の最小化および“外来物質”拒絶の恐れをより少なくするという観点から、治療医師によってこの抗体の実質的な過剰量を投与することが可能であり、望ましいものと感じられる。

予防目的の適用においては、この抗体もしくはそれらのカクテルを含有する組成物は、患者の抵抗力を増強させるために、まだ疾患状態にはない患者に投与される。そのような量は、“予防上の有効投与単位量”と定義される。この用途においては、正確な量は同様に患者の健康状態および免疫の一般レベルに依存するが、一般に、単位投与量当り0.1ないし25mgの範囲をとり、特に患者当り0.5ないし2.5mgである。好ましい予防用途は、腎臓移植拒絶の予防に対するものである。

この組成物は、治療医師によって選択された投与量レベルおよびパターンで、単一もしくは複数投与することができる。いずれにしても、この医薬処方は、この発明の抗体を、患者を効果的に治療するに十分な量提供するべきである。

この発明のヒト様抗体は、イン・ビトロにおいて、非常に多様な用途をさらに見出すことができる。例として、例示抗体は、Ｔ細胞タイピング、特異CD18抗原保有細胞もしくは受容体のフラグメントの単離、ワクチン調製等に用いることができる。

診断の目的には、この抗体は標識されていても、されていなくてもよい。未標識抗体は、ヒト化抗体と反応する他の標識抗体（二次抗体）、例えばヒト免疫グロブリン定常部位に特異的な抗体、と組み合わせて用いることができる。代わりに、この抗体を直接標識することができる。非常に多様な標識、例えば、放射核、蛍石、酵素、酵素基質、酵素コファクター、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）等を用いることができる。多くのタイプのイムノアッセイを利用することができ、それらは当業者に公知である。

キットもまた、細胞活性もしくは選択された抗原の存在に対する防御またはその検出に使用するために、この主題の抗体を具備することができる。したがって、この発明のヒト化

抗体は、通常、容器内に凍結乾燥された形で、単独に、もしくは所望の細胞タイプにたいする特異性を有するさらなる抗体と一緒に供給される。標識もしくは毒素と結合していてもいなくてもよいこれらの抗体は、トリス、リン酸塩、炭酸塩のような緩衝剤、安定化剤、殺生物剤、不活性タンパク、例えば血清アルブミン等と共にキットに含まれる。一般に、これらの物質は活性抗体の量に対して約５重量％未満存在し、通常、抗体濃度に対して総量で少なくとも約0.001重量％存在する。しばしば、活性成分を希釈するために、不活性エクステンダー（extender）または賦形剤を含むことが望ましく、賦形剤は組成物全体の約１ないし99重量％存在し得る。アッセイにおいて、キメラ抗体に結合し得る二次抗体が用いられる場合には、これは通常別のバイアル中に収容される。二次抗体は、典型的には標識と結合しており、上述の抗体処方と同様の様式で処方されている。このキットは、一般に、一揃いの使用説明書も含んでいる。

以下の例はこの発明を説明する。

例

YFC51.1.1ラット抗ヒトCD18重鎖および軽鎖のクローニング並びに配列決定

2.5×10^{7}YFC51.1.1発現細胞から、ChomczynskiおよびSacchiの方法（Anal.Biochem.,162,156－159,（1987））に従い、1×10^{7}細胞当り1mlの抽出溶液を用いて、全RNAを単離した。得られたRNAペレットを、分光光度計の測定で４μg/μｌの濃度となるようにジエチルピロカルボネート（DEPC）処理蒸留水50μｌに再溶解する。製造者のプロトコルを用い、75μｇの全量RNAからmRNAを抽出するために、ダイナビーズ・オリゴ（dT）$_{25}$（Dynal）を用いた。cDNA合成用のスーパースクリプト（SUPERSCRIPT）・プラスミド・システムおよびプラスミド・クローニング・キット（BRL）を用い、製造者が推奨する方法に従って、単離したmRNAからcDNAを合成した。得られたcDNA/pSPORT－１ライゲーションを用いて、Escherichia coliマックス・エフィシエンシ（MAX EFFICIENCY）DH5αコンペテント・セルズ（BRL）を形質転換した。Buluwelaらの方法（Nucleic Acids Res.,17,452,（1989））に従い、約5000コロニーをHybond－Ｎナイロンフィルター（Amersham）上にのせて溶菌し、変性させて固定した。このフィルターを、0.2×SSC、0.1％SDS中において、55℃で、プロテイナーゼＫ（50μg/ml）を用いて30分間処理し、過剰の残骸をティッシュで除去した。

（ｉ）重鎖

ラットγ－CH1定常部位（塩基496－515）のタンパクに相補的な、配列番号17に示すオリゴヌクレオチドの末端を標識し、標準プロトコルに従うYFC51.1.1重鎖についてのフィルターのスクリーニングに用いた。約50の潜在的な陽性コロニーが検出され、さらに分析するために20個を選択した。Del Salらの方法（Nucleic Acids Res.,16,9878,（1988））を用いてプラスミドDNAが調製され、20のうちの12が期待通りのサイズを有するラット免疫グロブリン重鎖cDNAのインサートを有していた。クローンp51H.6を選択し、シークエンス・キット（USB）のプロトコルにより、ジデオキシ鎖末端法（Sangerら,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,74,5463－5467,（1977））に従い、プラスミド・プライミングにより可変部位の配列を両方向決定した。可変部位の配列を配列番号９および10に示す。

（ii）軽鎖

非放射性DNA標識および検出キット（Boehringer Mannheim）を用い、製造者のプロトコルに従って、ラットミエローマY3－Ag1.2.3軽鎖のクローン（Croweら,Nucleic Acids Res.,17,7992,（1989））をジゴキシゲニン－11－dUTPで標識し、YFC51.1.1軽鎖についてのフィルターのスクリーニングに用いた。約40の潜在的な陽性コロニーが検出され、さらに分析するために24個を選択した。上述と同様にプラスミドDNAを調製した。Y3－Ag1.2.3およびYFC51.1.1軽鎖の両方が単離された（Y3細胞系はハイブリドーマ融合パターン）が、それらは異なる制限パターンを有することにより分別可能であった。YFC51.1.1軽鎖を有する１つのクローンp51L.4を選択し、重鎖についての記述と同様に配列を決定した。可変部位の配列を配列番号１および２に示す。

ヒト化抗体の設計

上記工程（２）に記述した選別手順を用いて、ヒト化プロセスに用いるNEWM重鎖およびRE

I軽鎖のヒト可変ドメイン・フレームワーク（Kabatら,1987）を選択した。

ヒト化重鎖および軽鎖遺伝子の構築

LewisおよびCroweの方法（Gene,101,297－302（1991））に従い、ヒト化重鎖および軽鎖を構築した。

（ｉ）軽鎖

軽鎖オリゴヌクレオチドプライマー

A_L:配列番号18
B_L:配列番号19
C_L:配列番号20
D_L:配列番号21
E_L:配列番号22
F_L:配列番号23
G_L:配列番号24
H_L:配列番号25

PCR反応（Saikiら,Science$_{239}$,487－491（1988））を、プログラム可能な加熱ブロック（Hybaid）内で、20回の温度サイクル（94℃で１分、50℃で２分および72℃で３分）および続く72℃での最終10分工程を用いて行なった。製造者が推奨する通り、各プライマー１μｇ、特定量のテンプレート、およびTaqポリメラーゼ（Perkin Elmer Cetus）2.5ユニットを反応緩衝液と共に最終容積100μｌで用いた。

PCRの開始テンプレートはCAMPATH－1H軽鎖（RE1フレームワーク上のヒト化CAMPATH－1;PageおよびSydenham,Biotechnology,9,64－68,（1991））である。プライマー対A_LおよびB_L、C_LおよびD_L、E_LおよびF_L、並びにG_LおよびH_Lをそれぞれを用いて、反応当りテンプレート10ngで、４通りの初期PCR反応を行なった。これらのPCR反応の生成物、フラグメントAB_L、CD_L、EF_LおよびGH_Lの各々を、Prep－Ａ－Gene（Bio－Rad）を用いて、製造者が推奨するプロトコルに従って精製した。各精製生成物の1/4を用いて、フラグメントAB_LとCD_L、およびEF_LとGH_Lとを結合させ、プライマーA_LおよびD_L、並びにE_LおよびH_Lをそれぞれ用いる組換えPCR反応を行なった。これらの反応の生成物、フラグメントAD_LおよびEH_Lを上述の通りに精製し、各々の1/4をプライマーA_LおよびH_Lを用いる組換えPCR反応において結合した。最終ヒト化軽鎖組換えPCR生成物AH_Lを、プライマーA_LおよびH_LのHind III部位を利用し、Croweら,Nucleic Acids Res.,19,184,（1991）の方法に従って、pUC－18（BRL）のHind III部位にクローニングした。ジデオキシ鎖末端法によりプラスミド単離体の配列を決定し、正しい配列のクローンを選択した。

（ii）重鎖

重鎖オリゴヌクレオチドプライマー：

A_H:配列番号26
B_H:配列番号27
C_H:配列番号28
D_H:配列番号29
E_H:配列番号30
F_H:配列番号31
G_H:配列番号32
H_H:配列番号33

PCRの開始テンプレートはCAMPATH－1H重鎖である。上述と同様ではあるが、オリゴヌクレオチドプライマーA_HないしH_Hを用いて、組換えPCR法により齧歯類CDRをテンプレートにグラフト化した。最終PCR、すなわち、フラグメントAD_HおよびEH_HとプライマーA_HおよびH_Hは、生成物の収率は高くはない。そこで、（フラグメントAD_HおよびEF_Hから）フラグメントAF_Hを生成し、フラグメントEH_Hと共にプライマーA_HおよびH_Hを用いるPCRに用いた。オリゴヌクレオチドA_HおよびH_Hは、ヒト化可変部位の初期クローニングを可能ならしめるために、それぞれHind IIIおよびEcoR I部位を有するように設計し、それに続く、選択された適切な定常部位を用いる可変部位のクローニングを容易にするために、オリゴヌクレオ

チドG_HのNEWMフレームワーク４（FR4）領域にSpe I部位を導入した。Spe I部位は、ヒト化重鎖テンプレートの109位（Kabatら,1987によるナンバリング）のロイシン残基を変えることがないように選択した。６つのヒト重鎖Ｊ－ミニ遺伝子のうちの４つは、この位置にロイシンを有している（Kabatら,1987）。このため、一般に、操作したSpe I部位の使用は適当である。

ヒト化重鎖可変部位組換えPCR生成物をHind III/EcoR I切断pUC－18（BRL）にクローニングし、正しい配列を有するプラスミド単離体を選択した。CAMPATH－1H重鎖のFR4およびγ１定常部位を、オリゴヌクレオチドプライマーX_H（配列番号34）およびY_H（配列番号35）を用いてpUC－18（BRL）にPCRクローニングした。プライマーX_HはSpe IおよびHind III部位を有し、Y_HはEcoR I部位を有する。Hind IIIおよびEcoR I部位をPCR生成物のpUC－18へのクローニングに用い、正しい配列を有するプラスミド単離体を選択した。続いて、操作したFR4Spe I部位を用いて、ヒト化可変部位およびγ１定常部位から完全重鎖を再構成した。

COS細胞における一過性発現

ヒト化重鎖および軽鎖をコードするDNAをベクターpEE6.hCMVおよびpEE12にそれぞれクローニングした。Stephens & Cockett,Nucleic Acids Res.,17,7110（1989）;Bebbingtonら,Biotechnology,10,169（1992）；およびBebbingtonおよびHentschel,Glover編DNAクローニング第III巻,Academic Press（1987）を参照。ベクターpEE12は、pBR322をベースとし、ｈ－CMV－MEIプロモーターおよびSV40早期（early）領域プロモーターの制御の下のハムスター・グルタミン・シンセターゼ（GS）cDNAを有するベクターである。ベクターpEE12は、SV40プロモーター転写によりｈ－CMV－MEIプロモーターと同じ方向に誘導されたGScDNA発現カセットを有するpEE6（EP－Ａ－0338841参照）に対応する。ベクターpEE6、hCMVおよびpEE12を形質導入した細胞は、GScDNAの存在により、グルタミン非含有培地において成長可能である。選択はpEE12プラスミドに対してのみ行なわれるが、効果的な発現は、両プラスミドの共組込み（co－integration）に依存する。

トランスフェクタム試薬（Transfectam reagent）（Promega,Southampton,U.K.）を用い、製造者が推奨する条件下で、組換えプラスミド（各５μｇ）を5×10^5COS－１細胞に形質導入した。ストックCOS－１細胞（source ECACC,Porton Down,U.K.）は、10%仔ウシ血清（APP,Dudley,U.K.）を補ったDMEM培地（Flow,Irvine,U.K.）中に維持した。COS細胞形質導入は、DMEM培地（Flow,Irvine,U.K.）中で行なった。形質導入の４日後のCOS－１細胞からの成長培地のアッセイを、捕獲抗体としてポリクローナル抗ヒトIgG（Sigma,Poole,U.K.）を固相した可撓性マイクロタイタープレート（Falcon,Becton－Dickinson,Plymouth,U.K.）を用いるサンドイッチELISAアッセイにより行なった。アッセイ試料を加え、抗ヒトIgG　γ鎖－特異的パーオキシダーゼ結合体（Seralab,Crawley Down,U.K.）および基質としてのオルソフェニレンジミン－HCl（Sigma,Poole U.K.）を用いて検出を行なった。

Gladwinら,Biochem.Biophs.Acta.,1052,166－172（1990）の方法に従い、消耗したCOS細胞上清をFACS分析のためのMF－14（Ｔ細胞クローン）の表面標識に用いることにより、COS細胞においてヒト化抗体が一時的に発現したことが示された。簡潔に述べると、細胞懸濁液（10^5）の一部100μｌを、適当な抗体（消耗したCOS細胞上清）と共に、溶融氷上で30分間インキュベートした。これらの細胞をPBSで２回洗浄し、適当な二次抗体と共にさらに30分間インキュベートした（下記参照）。細胞を再び洗浄し、溶融氷上で、抗ラットIg－FITCもしくは抗ヒトIg－FITC結合体を添加した。最後に、細胞をPBSで３回洗浄し、0.1%パラホルムアルデヒドで固定した。表面標識の分析は、標準コンピュータ、電子工学および光学を用いるBecton－Dickenson FACScanを用いて行なった。

COS細胞上清中のヒト化抗体は、ラットYFC51.1.1の結合の阻害の他に、MF－14細胞と結合することが示された。このヒト化抗体が、ラットモノクローナル抗体の結合をブロックすることによりCD18に対する結合性を保持することが示されたので、安定なNSO形質導入体を作製した。

NSO細胞における安定発現

NSO細胞における安定な形質導入を生じさせるシングル発現ベクターは、pEE12－軽鎖プラスミドのBamH Iの中のpEE6から完全重鎖発現カセットをクローニングして生成させた。すなわち、配列をコードする重鎖及び軽鎖の両方は、同じベクターから同じ方向に転写された。形質導入のためのプラスミド40μｇを、細菌性プラスミド配列の中に認識配列を有するSal I制限酵素による消化によって直線化した。直線化されたDNAをエタノールを用いて溶液から沈殿させ、70%エタノール中で洗浄し、乾燥して滅菌水に再び懸濁させた。

NSO細胞（ヒト骨髄腫（mycloma）細胞系;Jarvis,Methods in Enzymology,73B,3（1981）;source ECACC,Porton Down,U.K.参照）の指数関数的な増殖は、非選択的DMEM培地（すなわち、グルタミン及び硝酸鉄がなく、ピルビン酸ナトリウム110mg/l（GIBCO/BRL,Paisley,U.K.）を用い、１×非必須アミノ酸（Flow,Irvine,U.K.）2mMグルタミン（GIBCO）および10%子ウシ胎児血清（APP,Dudley,U.K.）が補填されている）中で続けられた。NSO細胞を遠心分離し、洗浄し、且つ、DNAを添加した後に、細胞が10^7細胞/mlの濃度になるように冷PBS中に再懸濁した。直線化されたプラスミドDNA（40μｇ）を、エレクトロポーレーションキュベット中の10^7細胞に氷上で添加した。細胞およびDNAを泡立たないように穏やかに混合し、混合物を氷上に５分間放置した。キュベットの外側を拭いて乾燥し、1500V,3mFの二連続パルスを、Gene Pulser（BIO－Rad）を用いて加えた。このキュベットを、５分間、氷に戻した。

形質移入した細胞を、非選択的培地50μｌ中に３×10^5、7.5×10^4および1.5×10^4細胞/mlの濃度で、96ウエルプレートに移し、37℃で24時間インキュベートした。次に、選択的培地（すなわち、グルタミン及び硝酸鉄がなく、ピルビン酸ナトリウム100mg/l（GIBCO/BRL,Paisley,U.K.）を用い、グルタミン酸（60mg/l）、アスパラギン（60mg/ml;Sigma,Poole,U.K.）、１×非必須アミノ酸、アデノシン，シチジン，グアノシンおよびウリジン各7mg/ml、チミジン2.4mg/l（Sigma,Poole,U.K.）並びに10%未溶解子ウシ血清（APP,Dudley,U.K.）が補填されている）100μｌを、結合および形質導入されたプラスミドを有する、選択されたクローンに添加した。このプレートを培養器に戻し、実質のある細胞の死が起こり、分離している生き残ったコロニーが現れるまで放置した。一旦、グルタミン依存性形質導入体が認められたら、単一のコロニーを有するウエルを選択し、使用した組織培養懸濁液を集めて、ヒトIgG分泌をアッセイした。

次に、IgG分泌について陽性である単一のコロニーを有するウエルを、選択的培地を使用した培養に発展させた。細胞を、96ウエルプレートの中に、培地100μｌ中10^4細胞／ウェルで分布させ、一晩インキュベートした。Ｌ－メチオニンスルホキシイミン（MSX）の濃縮物を含有する選択的培地100μｌを添加した。MSXは、ベクターの分泌を増幅させる毒性グルタミン類似物である。各々の96－ウエルプレートは、200μＭ～12.5μＭの範囲内で異なるMSXの最終濃度を有する。個々のコロニーを、MSX耐性を起こしたMSX最高濃度で、各々の依存性形質導入体から分離した。コロニーを発展させ、抗体分泌速度（μg/10^6細胞／日）を、増幅されていない場合の速度と比較した。１～３μg/10^6細胞／日でヒト化抗体を発現するクローンを得た。

ヒト化抗体を、使用した組織細胞懸濁液から、スーパーロース　プロテイン－Ｇ　カラム（ファルマシア）上のアフィニティークロマトグラフィーで精製し、Ｔ細胞増殖アッセイおよびClq結合研究に使用した。

Ｔ細胞増殖

末梢性ヒト単核細胞を、リンホプレプ（Lymphoprep）（Nycomed,Oslo,Norway）を用いて脱線維素ヒト全身血液から分離し、製造業者のプロトコールを続けた。３倍培養液を、中間クローン（10%自己血清、2mMグルタミンおよび100IU/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシンを補充したRPMI 1640）、または、培地および抗原（Tetanustoxoid,5μg/ml）若しくは培地およびマイトジェン（PHA,5μg/ml）と共に、YFC51.1.1またはヒト化抗体の存在下或いは存在なしで、96ウエル平底マイクロタイタープレート（Nunclon,Roskild,Denmark）の中に供給した。細胞を、37℃、95%空気、５%CO_2の加湿雰囲気で５日間培養した。次に、ウエルを、１μCi［メチル^{3}H］チミジン（2Ci/mmol,Amersham）でパルスを送り、４時間後集め、βカウンター（LKB,Betaplate,Sweden）を使用した液体シンチレ

ーションにより、放射能計数をした。
ラットYFC51.1.1モノクローナル抗体およびヒト化抗体の両方は、抗原特異的Ｔ細胞反応を強く阻害したが、増殖を誘発したPHAについて僅かな効果を有した。しかしながら、抗体（50μg/ml）の高いレベルおよびPHA（2.5μg/ml）の低いレベルでは、80％阻害まで得られた。
補体結合
ヒト単核細胞（上記調製）を、PHA5μg/mlを用いて刺激し、37℃で３日間インキュベートした。細胞をPBSで細胞を洗浄し、PHAを除去した。次に、細胞を、テスト抗体10μg/mlと共に氷上で20分間インキュベートし、氷冷PBSで細胞を洗浄し、氷冷ヒト血清と共に20分間インキュベートした。氷冷PBSで洗浄し、ヒト血清を分離した。次いで、細胞を、フルオロセイン化（fluoreceinated）ポリクローナルヒツジ抗ヒトClqと共に、20分間インキュベートした。結合していない抗－Clqを、PBSで細胞を洗浄して除去し、細胞を、Becton－Dickenson FACScanで分析した。YFC51.1.1は、ヒトClqと弱く結合していることが認められ、ヒト化抗体との結合は検出されなかった。抗－CD18抗体の可能性のある治療的使用は、CD18陽性細胞の枯渇よりも、白血球のCD18－仲介粘着の一過性阻害に頼っている。従って、ヒト抗体がCD18陽性細胞の上へヒト補体を固定できないことは、インビボで、抗体が補体を使用し尽くさないがブロッキング抗体として機能し得るので、好都合である。
FACS分析
CD18陽性Ｔ細胞クローン（MF14）を、ラット抗体と比較したヒト化抗体の結合の測定に使用した。細胞をラットまたはヒト化抗体を氷上で30分間インキュベートした。結合していない抗体を洗浄して除去し、２番目の抗体を添加（すなわち、ラット抗体をヒト化抗体と共に予備インキュベートした細胞に添加した。逆もまた同様である。）し、氷上で30分間インキュベートした。細胞を洗浄して結合していない抗体を除去し、FITC－標識抗ヒト抗体または抗ラット抗体を添加した。結合していない標識を洗浄により除去し、細胞をBecton－Dickenson FACScanで分析した。YFC51.1.1 10μg/mlを用いたMF14細胞の予備インキュベーションは、ヒト化抗体0.1μg/mlの結合を完全にブロックした。相反する実験では、ヒト化抗体10μg/mlを用いた予備インキュベーションは、YFC51.1.1 0.1μg/mlの結合を完全にブロックした。第１の抗体1.0および0.1μg/mlを使用した場合の両方とも、ブロッキングの滴定に至った。
（１）配列番号:1の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:375塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：二本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA
（vi）起源：
（Ａ）生物名:Rattus rattus
（ix）配列の特徴
（Ａ）名称／記号:CDS
（Ｂ）存在位置:1..375
（Ｄ）他の情報:/生成物＝”可変部領域軽鎖"/標準名＝"YFC51.1.1"
（ix）配列の特徴
（Ａ）名称／記号:misc_signal
（Ｂ）存在位置:1..60
（Ｄ）他の情報:/機能＝”シグナル配列”
（ix）配列の特徴
（Ａ）名称／記号:misc_feature
（Ｂ）存在位置:130..162
（Ｄ）他の情報:/機能＝"CDR　1"

(ix) 配列の特徴
(A) 名称／記号:misc_feature
(B) 存在位置:208..228
(D) 他の情報:/機能＝"CDR 2"
(ix) 配列の特徴
(A) 名称／記号:misc_feature
(B) 存在位置:325..351
(D) 他の情報:/機能＝"CDR 3"
(xi) 配列：配列番号:1:

```
ATG AGG GTC CAG GTT CAG TTT CTG GGG CTC CTT CTG CTC TGG ACA TCA      48
Met Arg Val Gln Val Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Thr Ser
 1               5                  10                  15

GGT GCC CAG TGT GAT GTC CAG ATG ACC CAG TCT CCG TCT TAT CTT GCT      96
Gly Ala Gln Cys Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala
            20                  25                  30

GCG TCT CCT GGA GAA AGT GTT TCC ATC AGT TGC AAG GCA AGT AAG AGC     144
Ala Ser Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Lys Ser
        35                  40                  45

ATT AGC AAT TAT TTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCT GGG GAA GCA AAT     192
Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Asn
    50                  55                  60

AAA CTT CTT GTC TAT TAT GGG TCA ACT TTG CGA TCT GGA ATT CCA TCG     240
Lys Leu Leu Val Tyr Tyr Gly Ser Thr Leu Arg Ser Gly Ile Pro Ser
65                  70                  75                  80

AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGT ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGA     288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg
                85                  90                  95

AAC CTG GAG CCT GCA GAT TTT GCA GTC TAC TAC TGT CAA CAG TAT TAT     336
Asn Leu Glu Pro Ala Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
            100                 105                 110

GAA AGA CCG CTC ACG TTC GGT TCT GGG ACC AAG CTG GAG                 375
Glu Arg Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125
```

(2) 配列番号:2の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:125アミノ酸
(B) 配列の型：アミノ酸
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号:2:

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

Gly Ala Gln Cys Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala
20 25 30

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

Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Asn
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Ala Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110

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

（３）配列番号:3の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:33塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：二本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:cDNA
(vi) 起源：
（Ａ）生物名:Rattus rattus
(ix) 配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:misc_feature
（Ｂ）存在位置:1..33
（Ｄ）他の情報:/機能＝"CDR 1"
(ix) 配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:CDS
（Ｂ）存在位置:1..33
(xi) 配列：配列番号:3:

AAG GCA AGT AAG AGC ATT AGC AAT TAT TTA GCC 33
Lys Ala Ser Lys Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

（４）配列番号:4の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:11アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号:4;

Lys Ala Ser Lys Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

(５) 配列番号:5の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:21塩基対
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：二本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:cDNA
(vi) 起源：
(Ａ) 生物名:Rattus rattus
(ix) 配列の特徴
(Ａ) 名称／記号:misc_feature
(Ｂ) 存在位置:1..21
(Ｄ) 他の特徴:/機能＝"CDR 2"
(ix) 配列の特徴：
(Ａ) 名称／記号:CDS
(Ｂ) 存在位置:1..21
(xi) 配列：配列番号:5:

TAT GGG TCA ACT TTG CGA TCT 21
Tyr Gly Ser Thr Leu Arg Ser
1 5

(６) 配列番号:6の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:7アミノ酸
(Ｂ) 配列の型：アミノ酸
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号:6:

Tyr Gly Ser Thr Leu Arg Ser
1 5

(７) 配列番号:7の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:27塩基対
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：二本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:cDNA
(vi) 起源：
(Ａ) 生物名:Rattus rattus
(ix) 配列の特徴
(Ａ) 名称／記号:misc_feature
(Ｂ) 存在位置:1..27
(Ｄ) 他の特徴:/機能＝"CDR 3"
(ix) 配列の特徴：
(Ａ) 名称／記号:CDS
(Ｂ) 存在位置:1..27
(xi) 配列：配列番号:7:

CAA CAG TAT TAT GAA AGA CCG CTC ACG
Gln Gln Tyr Tyr Glu Arg Pro Leu Thr
1 5 27

（８）配列番号:8の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:9アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：タンパク質
（xi）配列：配列番号:8:

Gln Gln Tyr Tyr Glu Arg Pro Leu Thr
1 5

（９）配列番号:9の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:417塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：二本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA
（vi）起源：
（Ａ）生物名:Rattus rattus
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:CDS
（Ｂ）存在位置:1..417
（Ｄ）他の情報:/生成物＝”シグナル配列を有するＨ鎖可変部領域":/標準名＝"YFC51.1.1"
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:misc_signal
（Ｂ）存在位置:1..57
（Ｄ）他の情報:/機能＝”シグナル配列”
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:misc_feature
（Ｂ）存在位置:148..162
（Ｄ）他の情報:/機能＝"CDR 1"
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:misc_feature
（Ｂ）存在位置:205..255
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:misc_feature
（Ｂ）存在位置:352..384
（xi）配列：配列番号:9:

```
ATG AAA TGC AGC TGG ATC AAC CTC TTC TTG ATG GCA CTA GCT TCA GGG      48
Met Lys Cys Ser Trp Ile Asn Leu Phe Leu Met Ala Leu Ala Ser Gly
 1               5                  10                  15

GTC TAC GCA GAA GTG CAG CTG CAA CAG TCT GGG CCC GAG CTT CGG AGA      96
Val Tyr Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Arg
            20                  25                  30

CCT GGG TCC TCA GTC AAG TTG TCT TGT AAG ACT TCT GGC TAC AGC ATT     144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Ile
        35                  40                  45

AAA GAT TAC CTT CTG CAC TGG GTA AAA CAT AGG CCA GAA TAC GGC CTG     192
Lys Asp Tyr Leu Leu His Trp Val Lys His Arg Pro Glu Tyr Gly Leu
    50                  55                  60

GAA TGG ATA GGA TGG ATT GAT CCT GAG GAT GGT GAA ACA AAG TAT GGT     240
Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Gly
65                  70                  75                  80

CAG AAG TTT CAA AGC AGG GCC ACA CTC ACT GCA GAT ACA TCC TCC AAC     288
Gln Lys Phe Gln Ser Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
                85                  90                  95

ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACG TCT GAC GAC ACA GCA ACC     336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Thr
            100                 105                 110

TAT TTT TGT ACT AGA GGC GAA TAT AGA TAC AAC TCG TGG TTT GAT TAC     384
Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Glu Tyr Arg Tyr Asn Ser Trp Phe Asp Tyr
        115                 120                 125

TGG GGC CAA GGC ACT CTG GTC ACT GTC TCT TCA                         417
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

(10) 配列番号:10の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:139アミノ酸
(B) 配列の型：アミノ酸
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号:10:

Met Lys Cys Ser Trp Ile Asn Leu Phe Leu Met Ala Leu Ala Ser Gly
1 5 10 15

Val Tyr Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Arg
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Ile
35 40 45

Lys Asp Tyr Leu Leu His Trp Val Lys His Arg Pro Glu Tyr Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Ser Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Thr Arg Gly Glu Tyr Arg Tyr Asn Ser Trp Phe Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

(11) 配列番号:11の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:15塩基対
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：二本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:cDNA
(vi) 起源：
(Ａ) 生物名:Rattus rattus
(ix) 配列の特徴：
(Ａ) 名称／記号:misc_feature
(Ｂ) 存在位置:1..15
(Ｄ) 他の情報:/機能＝"CDR 1"
(ix) 配列の特徴：
(Ａ) 名称／記号:CDS
(Ｂ) 存在位置:1..15
(xi) 配列：配列番号:11:

GAT TAC CTT CTG CAC
Asp Tyr Leu Leu His
1 5

(12) 配列番号:12の情報
(ｉ) 配列の特徴：

（Ａ）配列の長さ:5アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：タンパク質
（xi）配列：配列番号:12:

```
Asp Tyr Leu Leu His
 1               5
```

（13）配列番号:13の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:51塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：二本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA
（vi）起源：
（Ａ）生物名:Rattus rattus
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:misc_feature
（Ｂ）存在位置:1..51
（Ｄ）他の情報:/機能＝"CDR 2"
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称／記号:CDS
（Ｂ）存在位置:1..51
（xi）配列：配列番号:13:

```
TGG ATT GAT CCT GAG GAT GGT GAA ACA AAG TAT GGT CAG AAG TTT CAA    48
Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Gly Gln Lys Phe Gln
 1               5                  10                  15

AGC                                                                51
Ser
```

（14）配列番号:14の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:17アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：タンパク質
（xi）配列：配列番号:14:

```
Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Tyr Gly Gln Lys Phe Gln
 1               5                  10                  15

Ser
```

（15）配列番号:15の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:33塩基対
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：二本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:cDNA
（vi）起源：
（Ａ）生物名:Rattus rattus

(ix) 配列の特徴：
(A) 名称／記号:misc_feature
(B) 存在位置:1..33
(D) 他の情報:/機能＝"CDR 3"
(ix) 配列の特徴：
(A) 名称／記号:CDS
(B) 存在位置:1..33
(xi) 配列：配列番号:15:

```
GGC GAA TAT AGA TAC AAC TCG TGG TTT GAT TAC                    33
Gly Glu Tyr Arg Tyr Asn Ser Trp Phe Asp Tyr
 1               5                  10
```

(16) 配列番号:16の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:11アミノ酸
(B) 配列の型：アミノ酸
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号:16:

```
Gly Glu Tyr Arg Tyr Asn Ser Trp Phe Asp Tyr
 1               5                  10
```

(17) 配列番号:17の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:20塩基
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:cDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:N O
(vi) 起源：
(A) 生物名:Rattus rattus
(xi) 配列：配列番号:17:

```
AGTGGATAGA CAGATGGGGC                                         20
```

(18) 配列番号:18の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:30塩基
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:N O
(xi) 配列：配列番号:18:

```
GATCAAGCTT CTCTACAGTT ACTGAGCACA                              30
```

(19) 配列番号:19の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:43塩基

（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:ssDNA
（iii）ハイポテティカル:N　O
（iv）アンチセンス:YES
（xi）配列：配列番号:19:
GCTAAATAAT TGCTAATGCT CTTACTTGCT TTACAGGTGA TGG　43

（20）配列番号:20の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:43塩基
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:ssDNA
（iii）ハイポテティカル:N　O
（iv）アンチセンス:N　O
（xi）配列：配列番号:20:
AGAGCATTAG CAATTATTTA GCCTGGTACC AGCAGAAGCC AGG　43

（21）配列番号:21の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:41塩基
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:ssDNA
（iii）ハイポテティカル:N　O
（iv）アンチセンス:YES
（xi）配列：配列番号:21:
AGATCGCAAA GTTGACCCAT AGTAGATCAG CAGCTTTGGA G　41

（22）配列番号:22の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:41塩基
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類:ssDNA
（iii）ハイポテティカル:N　O
（iv）アンチセンス:N　O
（xi）配列：配列番号:22:
TATGGGTCAA CTTTGCGATC TGGTGTGCCA AGCAGATTCA G　41

（23）配列番号:23の情報
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）配列の長さ:47塩基
（Ｂ）配列の型：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:YES
(xi) 配列：配列番号:23:
CGTGAGCGGT CTTTCATAAT ACTGTTGGCA GTAGTAGGTG GCGATGT 47

(24) 配列番号:24の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:47塩基
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:N O
(xi) 配列：配列番号:24:
CAACAGTATT ATGAAAGACC GCTCACGTTC GGCCAAGGGA CCAAGGT 47

(25) 配列番号:25の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:30塩基
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:YES
(xi) 配列：配列番号:25:
GATCAAGCTT CTAACACTCT CCCCTGTTGA 30

(26) 配列番号:26の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:31塩基
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:N O
(xi) 配列：配列番号:26:
TGGGATCGAT CAAGCTTTAC AGTTACTGAG C 31

(27) 配列番号:27の情報
(i) 配列の特徴：
(A) 配列の長さ:36塩基
(B) 配列の型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:YES

(xi) 配列：配列番号:27:
GTGCAGAAGG TAATCGGTGA AGGTGAAGCC AGACAC 36

(28) 配列番号:28の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:36塩基
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：一本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N　O
(iv) アンチセンス:N　O
(xi) 配列：配列番号:28:
GATTACCTTC TGCACTGGGT GAGACAGCCA CCTGGA 36

(29) 配列番号:29の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:54塩基
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：一本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N　O
(iv) アンチセンス:YES
(xi) 配列：配列番号:29:
ATACTTTGTT TCACCATCCT CAGGATCAAT CCATCCAATC CACTCAAGAC CTCG 54

(30) 配列番号:30の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:54塩基
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：一本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N　O
(iv) アンチセンス:N　O
(xi) 配列：配列番号:30:
GGTGAAACAA AGTATGGTCA GAAGTTTCAA AGCAGAGTGA CAATGCTGGT AGAC 54

(31) 配列番号:31の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:45塩基
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：一本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N　O
(iv) アンチセンス:YES
(xi) 配列：配列番号:31:

CCACGAGTTG TATCTATATT CGCCTCTTGC ACAATAATAG ACCGC 45

(32) 配列番号:32の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:54塩基
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：一本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:N O
(xi) 配列：配列番号:32:
AGATACAACT CGTGGTTTGA TTACTGGGGT CAAGGCTCAC TAGTCACAGT CTCC 54

(33) 配列番号:33の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:36塩基
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：一本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:YES
(xi) 配列：配列番号:33:
TAGAGTCCTG AGGGAATTCG GACAGCCGGG AAGGTG 36

(34) 配列番号:34の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:48塩基
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：一本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:N O
(xi) 配列：配列番号:34:
GCTGCTCCTT TTAAGCTTTG GGGTCAAGGC TCACTAGTCA CAGTCTCC 48

(35) 配列番号:35の情報
(ｉ) 配列の特徴：
(Ａ) 配列の長さ:33塩基
(Ｂ) 配列の型：核酸
(Ｃ) 鎖の数：一本鎖
(Ｄ) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類:ssDNA
(iii) ハイポテティカル:N O
(iv) アンチセンス:YES
(xi) 配列：配列番号:35:
AAGCTTCCGT CGAATTCATT TACCCGGAGA CAG 33

フロントページの続き

(72)発明者　シムス、マーチン
イギリス国、ビーアール３・３ビーエス、ケント、ベッケンハム、ラングレイ・コート（番地なし）、ザ・ウエルカム・ファウンデーション・リミテッド内
(72)発明者　クロー、スコット
イギリス国、ビーアール３・３ビーエス、ケント、ベッケンハム、ラングレイ・コート（番地なし）、ザ・ウエルカム・ファウンデーション・リミテッド内

審査官　佐久　敬

(56)参考文献　特表平０６－５０１６１４（ＪＰ，Ａ）
Nucleic Acid Rsearch,1991年 5月11日,Vol.19,No.9,pages 2471-2476
Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1991,Vol.88,pages 4181-4185
Gene,1991年 5月30日,Vol.101,No.2,pages 297-302

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}，ＤＢ名)
C12P 21/08
C07K 1/00 - 19/00
C12N 15/00 - 15/90
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)