

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4171071号  
(P4171071)

(45) 発行日 平成20年10月22日(2008.10.22)

(24) 登録日 平成20年8月15日(2008.8.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 P 21/08	(2006.01) C 12 P 21/08
A 61 K 39/395	(2006.01) A 61 K 39/395 Y
A 61 P 1/00	(2006.01) A 61 P 1/00
C 12 N 5/10	(2006.01) C 12 N 5/00 A

請求項の数 15 (全 80 頁)

(21) 出願番号	特願平10-509853
(86) (22) 出願日	平成9年8月6日(1997.8.6)
(65) 公表番号	特表2001-507210(P2001-507210A)
(43) 公表日	平成13年6月5日(2001.6.5)
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/013884
(87) 国際公開番号	W01998/006248
(87) 国際公開日	平成10年2月19日(1998.2.19)
審査請求日	平成16年8月3日(2004.8.3)
(31) 優先権主張番号	08/700,737
(32) 優先日	平成8年8月15日(1996.8.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	500287639 ミレニアム・ファーマシューティカルズ・ インコーポレイテッド MILLENNIUM PHARMACE UTICALS, INC. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 139, ケンブリッジ, ランズタウン ストリート 40
(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(72) 発明者	ボナス, ポール, ディー. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 118 ボストン, ナンバー 3, アパート ン 45

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\alpha 4 \beta 7$  インテグリンと反応するヒト化免疫グロブリン

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非ヒト起源の軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)の少なくとも1つおよびヒト起源の軽鎖可変領域に由来する枠組み領域ならびに非ヒト起源の重鎖可変領域の3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)の少なくとも1つおよびヒト起源の重鎖可変領域に由来する枠組み領域を含有する抗原結合領域を含有してなり、該相補性決定領域が以下：

軽鎖：CDR1 配列番号：12のアミノ酸44-59

CDR2 配列番号：12のアミノ酸75-81

CDR3 配列番号：12のアミノ酸114-122

10

重鎖：CDR1 配列番号：15のアミノ酸50-54

CDR2 配列番号：15のアミノ酸69-85

CDR3 配列番号：15のアミノ酸118-129

に示されるアミノ酸配列を有し、軽鎖が配列番号：21の可変領域を含有し、重鎖が配列番号：19の可変領域を含有してなる、4-7インテグリンを選択的に結合するヒト化免疫グロブリンまたは抗原結合断片。

## 【請求項 2】

ヒト化免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合断片がネズミA<sub>c</sub>t-1モノクローナル抗体の軽鎖の3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)の少なくとも1つおよびヒト起源の軽鎖の可変領域に由来する枠組み領域を含有し、該相補性決定領域が

20

該ヒト化免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合断片を含む抗体が選択的に 4 7 インテグリンを結合するように、以下：

軽鎖： C D R 1 配列番号： 1 2 のアミノ酸 4 4 - 5 9

C D R 2 配列番号： 1 2 のアミノ酸 7 5 - 8 1

C D R 3 配列番号： 1 2 のアミノ酸 1 1 4 - 1 2 2

に示されるアミノ酸配列を含有し、ヒト化免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合断片が配列番号： 2 1 の可変領域を含有してなる、ヒト化免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

請求項 2 記載のヒト化免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含有してなる単離された核酸であって、前記ヌクレオチド配列が配列番号： 2 0 の可変領域コーディング配列を含有してなる単離された核酸。

【請求項 4】

請求項 2 記載のヒト化免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含有してなる発現ベクターであって、前記ヌクレオチド配列が配列番号： 2 0 の可変領域コーディング配列を含有してなる発現ベクター。

【請求項 5】

ヒト化免疫グロブリン重鎖またはその抗原結合断片がネズミ A c t - 1 モノクローナル抗体の重鎖の 3 つの相補性決定領域 ( C D R 1 、 C D R 2 および C D R 3 ) の少なくとも 1 つおよびヒト起源の重鎖の可変領域に由来する枠組み領域を含有し、該相補性決定領域が該ヒト化免疫グロブリン重鎖またはその抗原結合断片を含む抗体が 4 7 インテグリンを選択的に結合するように、以下：

重鎖： C D R 1 配列番号： 1 5 のアミノ酸 5 0 - 5 4

C D R 2 配列番号： 1 5 のアミノ酸 6 9 - 8 5

C D R 3 配列番号： 1 5 のアミノ酸 1 1 8 - 1 2 9

に示されるアミノ酸配列を含有してなり、ヒト化免疫グロブリン重鎖またはその抗原結合断片が配列番号： 1 9 の可変領域を含有してなる、ヒト化免疫グロブリン重鎖またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

請求項 5 記載のヒト化免疫グロブリン重鎖またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含有してなる単離された核酸であって、前記ヌクレオチド配列が配列番号： 1 8 の可変領域コーディング配列を含有してなる単離された核酸。

【請求項 7】

請求項 5 記載のヒト化免疫グロブリン重鎖またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含有してなる発現ベクターであって、前記ヌクレオチド配列が配列番号： 1 8 の可変領域コーディング配列を含有してなる発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 4 又は 7 記載の発現ベクターを含有してなる宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 8 記載の宿主細胞をヒト化免疫グロブリン軽鎖または重鎖の発現に適した条件下で維持し、それによりヒト化免疫グロブリン軽鎖、ヒト化免疫グロブリン軽鎖抗原結合断片、ヒト化免疫グロブリン重鎖、またはヒト化免疫グロブリン重鎖抗原結合断片を発現させ、産生させ、任意に単離させる工程を含む、ヒト化免疫グロブリン軽鎖、ヒト化免疫グロブリン軽鎖抗原結合断片、ヒト化免疫グロブリン重鎖、またはヒト化免疫グロブリン重鎖抗原結合断片の調製方法。

【請求項 10】

ヒト化免疫グロブリン軽鎖またはその抗原結合断片をコードする第 1 の組換え核酸およびヒト化免疫グロブリン重鎖またはその抗原結合断片をコードする第 2 の組換え核酸を含有し、該軽鎖またはその抗原結合断片および該重鎖またはその抗原結合断片を含む抗体または抗原結合断片が選択的に 4 7 インテグリンを結合する宿主細胞であって、

10

20

30

40

50

該第1核酸は以下：

軽鎖：CDR1 配列番号：12のアミノ酸44-59

CDR2 配列番号：12のアミノ酸75-81

CDR3 配列番号：12のアミノ酸114-122

に示されるアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）の少なくとも1つおよびヒト起源の軽鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含み；

該第2核酸は以下：

重鎖：CDR1 配列番号：15のアミノ酸50-54

CDR2 配列番号：15のアミノ酸69-85

CDR3 配列番号：15のアミノ酸118-129

に示されるアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域（CDR1、CDR2およびCDR3）の少なくとも1つおよびヒト起源の重鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含み、第1核酸が配列番号：21の可変領域をコードし、第2核酸が配列番号：19の可変領域をコードする、宿主細胞。

【請求項11】

請求項10記載の宿主細胞をヒト化免疫グロブリンの発現に適した条件下で維持し、それによりヒト化免疫グロブリン鎖が発現され、ヒト化免疫グロブリンが産生され、任意に単離される工程を含む、ヒト化免疫グロブリンの調製方法。

【請求項12】

治療または診断における使用のための請求項1記載のヒト化免疫グロブリンまたは抗原結合断片。

【請求項13】

請求項1記載のヒト化免疫グロブリンまたは抗原結合断片、および医薬としての使用のための適当な担体を含有してなる、炎症性腸疾患の治療用医薬組成物。

【請求項14】

炎症性腸疾患の治療用の医薬の製造のための請求項1記載のヒト化免疫グロブリンまたは抗原結合断片の使用。

【請求項15】

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎およびクローン病患者における炎症性腸疾患からなる群より選択される、請求項14記載の使用。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

インテグリンレセプターは、リンパ球の再循環とリンパ球の炎症部位への補給の両方の制御に重要である（カルロス（Carlos,T.M.）とハーラン（Harlan,J.M.）、Blood,84:2068-2101（1994））。ヒト4-7インテグリンは、いくつかのリガンドを有し、そのうちの1つは、腸間膜リンパ節やパイエル斑の高内皮性小静脈で発現している（ストリーター（Streeter,P.R.）ら、Nature 331:41-46（1988））粘膜血管アドレシンMAdCAM-1である（ベルリン（Berlin,C.）ら、Cell 74:185-195（1993）；アール（Erle,D.J.）ら、J.Immunol.153:517-528（1994））。このように、4-7インテグリンは、腸の粘膜リンパ組織へのリンパ球の移動を仲介するホーミングレセプターとして作用する（シュバイクホッファー（Schweighoffer,T.）ら、J.Immunol.151:717-729（1993））。さらに、4-7インテグリンは、フィブロネクチンおよび血管細胞接着分子-1（VCAM-1）と相互作用する。

例えば、潰瘍性結腸炎やクローン病のような炎症性腸疾患（IBD）は、胃腸管の炎症を伴う衰弱性及び進行性の疾患でありうる。米国だけでも推定200万人の人々を冒している症状には、腹痛、痙攣、下痢および直腸出血などがある。IBD治療には、抗炎症剤（コルチコステロイドおよびスルファサラジンなど）、免疫抑制剤（6-メルカプトプリン、シクロスボリンおよびアザチオプリンなど）および外科手術（結腸切除など）などが用いられている。ポドルスキ（Podolsky）、New Engl.J.Med.,325:928-937（1991）およ

10

20

30

40

50

びポドルスキ (Podolsky) 、 *New Engl.J.Med.* , 325:1008-1016 (1991) 。

ネズミモノクローナル抗体 (mAb A ct - 1) のようなヒト 4 7 インテグリンに対する抗体は、粘膜リンパ節の高内皮性小静脈に存在する粘膜アドレシン細胞接着分子 - 1 (MAdCAM - 1) への 4 7 インテグリン結合を妨害する。 A ct - 1 は、 ラザロビッツ (Lazarovits, A.I.) ら、 *J.Immunol.* 133:1857-1862 (1984) により、 ヒト破傷風毒素特異的 T リンパ球で免疫したマウスから最初に単離され、 マウス IgG1 /  $\kappa$  抗体であると報告された。 シュバイクホッファー (Schweighoffer, T.) ら、 *J.Immunol.* 151:717-729 (1993) による該抗体のさらに最近の分析により、 該抗体は 4 7 インテグリンを選択的に発現するヒト CD4 + 記憶 T リンパ球のある種のサブセットに結合できることが示唆された。 しかしながら、 ヒトにおける治療上の適用にネズミ抗体を使用することに関する重大な問題は、 それらはヒトにおいて高い免疫原性があり、 患者におけるマウス抗体の効力を低下させ、 持続投与を妨げうるヒト抗ネズミ抗体応答 (HAM A ) を迅速に誘導することである。 HAM A 応答は、 マウス抗体の迅速なクリアランスを生じ、 いかなる治療の恩恵をも厳密に制限してしまう。

したがって、 炎症性腸疾患に対する改良された治療アプローチに関する要求がある。

#### 発明の要約

本発明は、 免疫グロブリンが非ヒト起源 ( 例えば、 齧歯類 ) の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部 ( 例えば、 ヒト枠組み領域、 ガンマ型のヒト定常領域 ) を含有する、 4 7 インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関する。 1 つの態様において、 本明細書に記載されるヒト化免疫グロブリンは、 4

7 インテグリンへの結合に関して、 ネズミ A ct - 1 または LDP - 02 ( 実施例 4 等を参照のこと ) と競合することができる。 好ましい態様において、 ヒト化免疫グロブリンの抗原結合領域は、 A ct - 1 モノクローナル抗体に由来する ( 例えば、 LDP - 02 、 図 11 ( 配列番号 : 19 ) および図 12 ( 配列番号 : 21 ) それぞれに示された軽鎖および重鎖の可変領域を含有する免疫グロブリン ) 。

例えば、 ヒト化免疫グロブリンは、 非ヒト起源の相補性決定領域 (CDR) およびヒト枠組み領域に由来する枠組み領域 (FR) を含む抗原結合領域を含有することができる。 1 つの側面において、 4 7 インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンは、 4 7 を結合する非ヒト起源の抗体に由来する CDR およびヒト起源 ( 例えば、 GM607 ' CL ) の軽鎖に由来する FR を含む軽鎖、 ならびに 4 7 を結合する非ヒト起源の抗体に由来する CDR およびヒト起源 ( 例えば、 21 / 28 ' CL ) の重鎖に由来する FR を含む重鎖を含有する。 別の側面において、 軽鎖は、 A ct - 1 抗体の軽鎖に由来する 3 つの CDR を含有し、 重鎖は、 A ct - 1 抗体の重鎖に由来する 3 つの CDR を含有する。

また、 本発明は、 ヒト化免疫グロブリン軽鎖 ( 例えば、 A ct - 1 抗体の軽鎖の CDR1 、 CDR2 および CDR3 ならびにヒト軽鎖 FR を含有する ) 、 ならびにヒト化免疫グロブリン重鎖 ( 例えば、 A ct - 1 抗体の重鎖の CDR1 、 CDR2 および CDR3 ならびにヒト重鎖 FR を含有する ) に関する。 好ましい態様において、 本発明は、 本明細書に記載されたヒト化重鎖および軽鎖 ( 例えば、 図 7 ( 配列番号 : 12 ) に示された軽鎖の可変領域を含有するヒト化軽鎖、 図 9 ( 配列番号 : 15 ) に示された重鎖の可変領域を含有するヒト化重鎖、 図 12 ( 配列番号 : 21 ) に示された軽鎖の可変領域を含有するヒト化軽鎖、 図 11 ( 配列番号 : 19 ) に示された重鎖の可変領域を含有するヒト化重鎖 ) に関する。 また、 1 以上のヒト化軽鎖および / または重鎖を含有するヒト化免疫グロブリンも含まれる。

さらに、 本発明は、 本発明のヒト化免疫グロブリン ( 例えば、 単鎖抗体 ) をコードする配列を含有する単離された核酸、 ならびに本発明のヒト化免疫グロブリン軽鎖をコードする配列 ( 例えば、 配列番号 : 20 ) または重鎖をコードする配列 ( 例えば、 配列番号 : 18 ) を含有する単離された核酸に関する。 例えば、 本発明は、 ネズミ A ct - 1 モノクローナル抗体に由来する抗原結合領域をコードする第 1 の核酸配列と、 ヒト起源の免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部をコードする第 2 の核酸配列とを含有する、 ヒト化免疫

10

20

30

40

50

グロブリン軽鎖または重鎖をコードする融合遺伝子を提供する。

さらに、本発明は、4-7インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンまたはかかる免疫グロブリンの鎖をコードする核酸を含有する構築物に関する。例えば、4-7インテグリンに対する結合特異性を有する非ヒト抗体の軽鎖に由来するCDRおよびヒト起源の軽鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖をコードする融合遺伝子を含有する発現ベクターが提供される。かかる構築物の別の例は、4-7インテグリンに対する結合特異性を有する非ヒト化抗体の重鎖に由来するCDRおよびヒト起源の重鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含むヒト化免疫グロブリン重鎖をコードする融合遺伝子を含有する発現ベクターである。

また、本発明は、本発明の核酸を含有する構築物の1以上を含む、本発明の核酸を含有する宿主細胞に関する。1つの態様において、本発明は、ヒト化免疫グロブリン軽鎖をコードする第1の組換え核酸およびヒト化免疫グロブリン重鎖をコードする第2の組換え核酸を含有し、前記第1の核酸はネズミAct-1抗体の軽鎖に由来するCDRおよびヒト起源の軽鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含み；前記第2の核酸はネズミAct-1抗体の重鎖に由来するCDRおよびヒト起源の重鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含む、宿主細胞に関する。

また、本発明は、本発明の宿主細胞をヒト化免疫グロブリンの発現に適した条件下で維持し、それにより1または複数のヒト化免疫グロブリン鎖を発現させ、ヒト化免疫グロブリンを産生する工程を含むヒト化免疫グロブリンの調製方法を提供する。該方法は、ヒト化免疫グロブリンの単離工程をさらに含むことが可能である。

本発明のヒト化免疫グロブリンは、それらのネズミまたは他の非ヒトカウンターパートよりも免疫原性が弱くなりうる。したがって、本明細書に記載されたヒト化免疫グロブリンは、例えば、粘膜リンパ組織へのリンパ球ホーミングを制御し、それによって腸での炎症応答を低減するために、ヒトにおける治療剤として使用することができる。

さらに、本発明は、診断または（予防を含む）治療における使用のための本発明のヒト化免疫グロブリンに関する。1つの態様において、本発明は、胃腸管（腸に関連する内皮を含む）、他の粘膜組織またはMAdCAM-1分子を発現する組織の白血球浸潤に関連する疾患を含む炎症性疾患の治療等における、組織の白血球浸潤に関連する疾患の治療での使用のための本発明のヒト化免疫グロブリンに関する。特に好ましい態様において、本発明は、潰瘍性結腸炎やクローン病のような炎症性腸疾患（IBD）の治療における使用のための本発明のヒト化免疫グロブリンに関する。

別の側面において、本発明は、胃腸管、他の粘膜組織またはMAdCAM-1分子を発現する組織の白血球浸潤に関連する疾患を含む炎症性疾患の治療等における組織の白血球浸潤に関連する疾患の治療用の医薬の製造のための本発明のヒト化免疫グロブリンの使用に関する。特に好ましい態様において、本発明は、潰瘍性結腸炎やクローン病のような炎症性腸疾患（IBD）の治療用の医薬の製造のための本発明のヒト化免疫グロブリンの使用に関する。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、いくつかの独立したマウス重鎖可変領域クローンから決定した可変領域を含有するコンセンサスDNA配列（配列番号：1）および予想されるアミノ酸配列（配列番号：2）の図である。

図2は、H2B#34と称する独立したマウス重鎖可変領域クローンから決定した可変領域配列の一部を含有するヌクレオチド配列（配列番号：3）および予想されるアミノ酸配列（配列番号：4）の図である。

図3は、いくつかの独立したマウス軽鎖可変領域クローンの可変領域を含有するヌクレオチド配列（配列番号：5）および予想されるアミノ酸配列（配列番号：6）の図である。クローニング用のKasI部位を導入するために作製した2つの変異の位置が示される。

図4Aは、ネズミAct-1 mAbおよびマウスアイソタイプ適合無関係対照抗体（MOPC-21；IgG1、カッパ）の、4-7インテグリンを発現するHuT78細胞

を染色する能力を示す蛍光プロットである。

図4Bは、(i)キメラAct-1抗体、(ii)ヒトアイソタイプ適合無関係対照抗体(IgG1、カッパ)および(iii)COS-7細胞上清の、47インテグリンを発現するHuT78細胞を染色する能力を示す蛍光プロットである。

図5は、マウスAct-1軽鎖可変領域(「Act-1.v1」)のアミノ酸配列(配列番号:7)およびヒトGM607'CL軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号:8)のアラインメントである。同一のアミノ酸を垂直線で示し、類似のアミノ酸を類似性の程度により4個または2個の点で示す。CDRを括弧で標示し、残基に連続番号を付す。

図6は、マウスAct-1重鎖可変領域(「Act-1.vh」)のアミノ酸配列(配列番号:9)およびヒト21/28'CL重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号:10)のアラインメントである。同一のアミノ酸を垂直線で示し、類似のアミノ酸を類似性の程度により4個または2個の点で示す。CDRを括弧で標示し、残基に連続番号を付す。

図7は、マウスAct-1軽鎖シグナルペプチド配列に結合したマウスAct-1軽鎖可変領域のヌクレオチド配列(配列番号:11)および予想されるアミノ酸配列(配列番号:12)の図である。

図8は、成熟ヒトGM607'CL抗体カッパ軽鎖可変領域のヌクレオチド配列(配列番号:13)およびアミノ酸配列(配列番号:8)の図である。

図9は、マウスAct-1抗体重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の図である。可変領域のヌクレオチド配列を、予想されるマウスAct-1重鎖シグナルペプチド配列をコードするヌクレオチド配列に結合させ、混成配列(配列番号:14および15)を得る。(重鎖領域を増幅させるプライマーの同一性は、縮重配列から予想され、シグナルペプチドに対するアミノ酸配列は、プライマー、下流の配列および他のシグナルペプチドの配列に由来した。示されたシグナルペプチドは、Act-1ハイブリドーマのものとは同一ではない。)

図10は、ヒト21/28'CL抗体重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の図である。可変領域をコードするヌクレオチド配列は、ヒト抗体HG3'CL(レシヤビ(Rechavi,G.)ら、Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 80:855-859(1983))のV<sub>H</sub>に由来するシグナルペプチド配列をコードするヌクレオチド配列に結合させ、混成配列(配列番号:16および17)を得る。

図11は、重鎖シグナルペプチドを有するヒト化Act-1抗体(LDP-02)の重鎖の一部のヌクレオチド配列(配列番号:18)およびアミノ酸配列(配列番号:19)の図である。

図12は、軽鎖シグナルペプチドを有するヒト化Act-1抗体(LDP-02)の軽鎖の一部のヌクレオチド配列(配列番号:20)およびアミノ酸配列(配列番号:21)の図である。

図13は、ヒト化Act-1免疫グロブリン(LDP-02)の軽鎖を作製するために使用したL1~L6と称する重複相補的オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列(配列番号:22~27)、およびヒト化Act-1免疫グロブリンの重鎖を作製するために使用したH1~H10と称する重複相補的オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列(配列番号:28~37)の図である。

図14は、マウス-ヒトAct-1キメラ免疫グロブリン、ヒト化Act-1免疫グロブリンまたは無関係なヒトアイソタイプ適合対照抗体(IgG1、カッパ)を用いるHuT78細胞の染色を示す蛍光プロットである。

図15は、HuT-78細胞におけるフローサイトメトリーにより行なったビオチニル化ネズミAct-1およびヒト化Act-1(LDP-02/3A9/LOT#1、実施例4)の滴定の結果を示すグラフである。

図16は、対照ネズミIgG1またはヒトIgG1と比較した、ネズミAct-1またはヒト化Act-1免疫グロブリン(LDP-02/3A9/LOT#1、実施例4)によるビオチニル化ネズミAct-1の結合の競合阻害を示すグラフである。

図17は、(a)CAMPATH-1H、(b)CAMPATH-1G、(c)ヒトIg

10

20

30

40

50

G 1、(d) L D P - 0 2 / 3 A 9 / L O T # 1 (実施例4)、または(e) L D P - 0 1 (ヒト化抗CD18、Fc変異)の、50、25、5、2.5および0.5  $\mu$ g / mlの濃度での存在下で、ヒト末梢血単核細胞の補体介在細胞溶解に関する<sup>51</sup>クロム放出アッセイの結果を示すグラフである。

図18A～18Bは、47産生細胞(RPMI8866)のネズミAct-1(図18A)、ネズミIgG1(図18A)、LDP-02/3A9/Lot#1(図18B)またはヒトIgG1(図18B)およびヒトMAdCAM-1-Igキメラ(免疫接着)による接着阻害をモニターする接着アッセイの結果を示すグラフである。

図19は、(a)LDP-02(Fc変異した)、(b)軽鎖に1つの変異(MV4)と重鎖に二重変異(R38K、A40R)を有するLDP-02(Fc変異した)の誘導体、または(c)無関係なヒトアイソタイプ適合対照抗体(IgG1、カッパ)を用いるHUT78細胞の染色を比較したグラフである。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部を含有する、47インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関する。ヒト化免疫グロブリンは、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ のアフィニティーで47インテグリンを結合しうることが好ましく、好ましくは少なくとも約 $10^8 M^{-1}$ 、さらに好ましくは少なくとも約 $10^9 M^{-1}$ である。1つの態様において、ヒト化免疫グロブリンは、47インテグリンを結合する非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト定常領域に由来する定常領域を含む。別の態様において、47インテグリンを結合するヒト化免疫グロブリンは、非ヒト起源の相補性決定領域およびヒト起源の可変枠組み領域、ならびに任意にヒト起源の定常領域を含有する。例えば、ヒト化免疫グロブリンは、軽鎖が47インテグリンを結合する非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域およびヒト起源の軽鎖に由来する枠組み領域を含み、重鎖が47インテグリンを結合する非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域およびヒト起源の重鎖に由来する枠組み領域を含む、重鎖ならびに軽鎖を含有しうる。

また、本発明は、ヒト化免疫グロブリン軽鎖またはヒト化免疫グロブリン重鎖に関する。1つの態様において、本発明は、非ヒト起源の軽鎖CDR(即ち、1以上のCDR)およびヒト軽鎖枠組み領域を含むヒト化免疫グロブリン軽鎖に関する。別の態様において、本発明は、非ヒト起源の重鎖CDR(即ち、1以上のCDR)およびヒト重鎖枠組み領域を含むヒト化免疫グロブリン重鎖に関する。CDRは、非ヒト免疫グロブリンに由来することができる。

天然の免疫グロブリンは、2つの同一の軽鎖(約24kD)と2つの同一の重鎖(約55または70kD)が四量体を形成する共通のコア構造を有する。各鎖のアミノ末端部分は、可変(V)領域として知られ、各鎖の残りの部分のより保存された定常(C)領域から区別されうる。J領域として知られるC末端部分は、軽鎖の可変領域内にある。重鎖の可変領域内には、J領域に加え、D領域が存在する。免疫グロブリンにおけるアミノ酸配列の変化の大部分は、抗原結合に直接関与する超可変領域または相補性決定領域(CDR)として知られるV領域中の3つの分離した位置に限られる。アミノ末端から進んで、これらの領域は、それぞれ、CDR1、CDR2およびCDR3と称される。CDRは、より保存された枠組み領域(FR)により適切に保持される。アミノ末端から進んで、これらの領域は、それぞれ、FR1、FR2、FR3およびFR4と称される。CDRおよびFR領域の位置とナンバリングシステムは、カバット(Kabat)らにより定義されている(カバット(Kabat,E.A.)ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991)；表3および4も参照のこと)。

ヒト免疫グロブリンは、重鎖のアイソタイプによりクラスおよびサブクラスに分けることができる。クラスは、重鎖がそれぞれ、ガンマ(γ)、ミュー(μ)、アルファ(α)、デルタ(δ)またはイプシロン(ε)型のものであるIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを含む。サブクラスは、重鎖がそれぞれ、1、2、3、4、1およ

10

20

30

40

50

び 2型のものである Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1 および Ig A 2 を含む。選択されたクラスまたはサブクラスのヒト免疫グロブリン分子は、カッパ( )またはラムダ( )軽鎖のいずれかを含んでもよい。例えば、Cellular and Molecular Immunology、ウォンジーウィクス (Wonsiewicz,M.J.) 編、45章、41-50頁、W.B.Saunders Co、フィラデルフィア、PA (1991) ;ニソノフ (Nisonoff,A.) 、Introduction to Molecular Immunology、第2版、4章、45-65頁、Sinauer Associates,Inc.、サンダーランド、MA (1984) を参照のこと。

本明細書で用いる「免疫グロブリン」という用語は、抗体全体およびその生物学的に機能しうる断片を含むものである。かかる生物学的に機能しうる断片は、対応する全長の抗体の少なくとも1つの抗原結合機能(例えば、Act-1抗体の47に対する特異性)を保持し、好ましくは47とその1以上のリガンド(例えば、MAdCAM-1、フィブロネクチン)との相互作用を阻害する能力を保持する。特に好ましい態様において、生物学的に機能しうる断片は、47の粘膜アドレシン(MAdCAM-1)への結合を阻害することができる。使用されうる生物学的に機能しうる抗体断片の例は、単鎖抗体、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>断片等の47インテグリンに結合可能な断片を含む。かかる断片は、酵素的切断または組換え技術により生成することができる。例えば、パパインまたはペプシン切断を用い、それぞれ、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>断片を作製することができる。また、1以上の停止コドンを天然の停止部位の上流に導入した抗体遺伝子を用いて、種々の切断型の抗体も生成することができる。例えば、F(ab')<sub>2</sub>断片の重鎖をコードするキメラ遺伝子は、重鎖のCH<sub>1</sub>ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計することができる。

本明細書で用いる「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、少なくとも一部分がヒト起源のものである、異なる起源の免疫グロブリンの部分を含有する免疫グロブリンをいう。例えば、ヒト化抗体は、必要な特異性を有するマウス等の非ヒト起源の免疫グロブリンおよびヒト起源の免疫グロブリン配列に由来し(例えば、キメラ免疫グロブリン)、通常の技術により化学的に共に連結されるか遺伝子工学技術を用いて連続的なポリペプチドとして調製された(例えば、キメラ抗体のタンパク質部分をコードするDNAを発現させて連続的なポリペプチド鎖を生成することができる)部分を含有することができる。本発明のヒト化免疫グロブリンの別の例は、非ヒト起源の抗体に由来するCDRとヒト起源の軽鎖および/または重鎖に由来する枠組み領域とを含有する免疫グロブリン(例えば、枠組み変化を有するまたは有さないCDRを接ぎ合わせた抗体)である。また、キメラまたはCDRを接ぎ合わせた単鎖抗体は、ヒト化免疫グロブリンという用語に含まれるものである。例えば、キャビリー(Cabilly)ら、米国特許第4,816,567号明細書；キャビリーら、欧州特許第0,125,023B1号明細書；ボス(Boss)ら、米国特許第4,816,397号明細書；ボスら、欧州特許第0,120,694B1号明細書；ニューバーガー(Neuberger,M.S.)ら、国際公開第86/01533号パンフレット；ニューバーガーら、欧州特許第0,194,276B1号明細書；ウインター(Winter)、米国特許第5,225,539号明細書；ウインター、欧州特許第0,239,400B1号明細書；パドラン(Padlan,E.A.)ら、欧州特許出願第0,519,596A1号明細書を参照のこと。また、単鎖抗体に関しては、ラドナー(Ladner)ら、米国特許第4,946,778号明細書；ハ斯顿(Huston)ら、米国特許第5,476,786号明細書；およびバード(Bird,R.E.)ら、Science,242:423-426(1988)を参照のこと。

ヒト化免疫グロブリンの抗原結合領域(非ヒト部分)は、47インテグリンに対する結合特異性を有する非ヒト起源の免疫グロブリン(ドナー免疫グロブリンと称する)に由来することができる。例えば、適する抗原結合領域は、ネズミAct-1モノクローナル抗体に由来することができる(ラザロビツ( Lazarovits,A.I.)ら、J.Immunol.,133(4):1857-1862(1984))；例えば、実施例1～3を参照のこと)。他の供給源は、齧歯類(マウス、ラット等)、ウサギ、ブタ、ヤギまたは非ヒト靈長類(サル等)のような非ヒト供給源から得られた47インテグリン特異的抗体を含む。Act-1抗体と同一または類似のエピトープに結合する抗体のような他のポリクローナルまたはモノクローナル

10

20

30

40

50

抗体を作製することができる（例えば、コーラーら、Nature,256:495-497（1975）；ハーローら、1988、Antibodies:A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, NY)；およびCurrent Protocols in Molecular Biology, 第2巻、（補遺27、94年夏）、アウスベルら編、（John Wiley & Sons:New York, NY）、第11章（1991））。

例えば、抗体は、適切な哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギまたはヒツジ）において適した免疫原に対して惹起することができる。4-7を産生する細胞、4-7を含む膜画分、4-7の免疫原断片、適當な担体に結合させた7ペプチドが適當な免疫原の例である。抗体産生細胞（例えば、リンパ球）は、例えば、免疫した動物のリンパ節または脾臓から単離することができる。次いで、該細胞を適當な不死化細胞（例えば、骨髓腫細胞株）に融合し、それによりハイブリドーマを生成することができる。融合細胞は、選択培養技術を用いて単離することができる。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、適當なアッセイ（例えば、ELISA）により選択することができる。また、4-7インテグリンに対する結合特異性を有する非ヒト起源の免疫グロブリンは、抗体ライブラリー（例えば、非ヒトFab分子を含有するファージライブラリー）から得ることもできる。

1つの態様において、ヒト化免疫グロブリンの抗原結合領域は、非ヒト化起源のCDRを含有する。この態様において、4-7インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンは、少なくとも1つの非ヒト起源のCDRを含有する。例えば、CDRは、ヒト化免疫グロブリンが非ヒト起源の1以上の免疫グロブリン由来の重鎖CDR1、CDR2および/またはCDR3；および/または軽鎖CDR1、CDR2および/またはCDR3を実質的に含み、生じたヒト化免疫グロブリンが4-7インテグリンに結合特異性を有するように、非ヒト起源の免疫グロブリンの軽鎖および重鎖可変領域から派生させることができる。好ましくは、選択された鎖の3つのCDRすべてがドナーの対応する鎖のCDRと実質的に同じであり、さらに好ましくは、軽鎖および重鎖の3つのCDRすべてが対応するドナー鎖のCDRと実質的に同じである。

ヒト化免疫グロブリンまたはヒト起源の免疫グロブリン鎖の部分（ヒトの部分）は、いかなる適當なヒト免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖に由来することができる。もし存在するならば、例えば、ヒト定常領域またはその一部は、アレル変異体を含むヒト抗体のもしくは軽鎖、および/または（例えば、1、2、3、4）、μ、（例えば、1、2）、もしくは重鎖に由来することができる。特定の定常領域（例えば、IgG1）、変異体またはその一部は、エフェクター機能を調整するために選択することができる。例えば、変異した定常領域（変異体）は、Fcレセプターへの結合および/または補体を固定する能力を最小にするために融合タンパク質に取り込まれる（例えば、実施例3を参照のこと；ウインター（Winter）ら、英国特許第2,209,757B号明細書；モリソン（Morrison）ら、国際公開第89/07142号パンフレット；モーガン（Morgan）ら、国際公開第94/29351号パンフレット、1994年12月22日も参照のこと）。

もし存在するならば、ヒト枠組み領域（例えば、軽鎖可変領域のもの）は、抗原結合領域ドナーの類似体または均等の領域（例えば、軽鎖可変領域）に配列類似性を有するヒト抗体可変領域に由来することが好ましい。ヒト化免疫グロブリンのヒト起源の部分に関する枠組み領域の他の供給源は、ヒト可変コンセンサス配列を含む（例えば、実施例2を参照のこと；ケトルボロー（Kettleborough,C.A.）ら、Protein Engineering 4:773-783 (1991)；カーター（Carter）ら、国際公開第94/04679号パンフレット、1994年3月3日発行も参照のこと）。例えば、非ヒト部分を得るために用いた抗体または可変領域の配列は、カバットら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局（1991）に記載のヒト配列と比較することができる。特に好ましい態様において、ヒト化免疫グロブリン鎖の枠組み領域は、非ヒトドナー（例えば、マウスAkt-1抗体）の可変領域と少なくとも全体の約65%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも全体の約70%の配列同一性を有するヒト可変領域に由来する。また、ヒト部分は、非ヒトドナーの均等な部分（例えば、FR）と比較

10

20

30

40

50

したとき、用いた特定の部分（例えば、F R）内で、少なくとも約65%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも約70%の配列同一性を有するヒト抗体に由来することもできる。例えば、実施例2に記載されるように、マウスA c t - 1およびヒトG M 6 0 7' C L 軽鎖可変領域間の全体の配列同一性は、71.4%であり、マウスA c t - 1およびヒト2 1 / 2 8' C L 重鎖可変領域間の全体の配列同一性は、68.1%であった。

1つの態様において、ヒト化免疫グロブリンは、ヒト起源の抗体の1以上の鎖に由来する少なくとも1つの枠組み領域（F R）を含有する。したがって、F Rは、ヒト起源の1以上の抗体に由来するF R 1および/またはF R 2および/またはF R 3および/またはF R 4を含むことができる。好ましくは、選択されたヒト化鎖のヒト部分は、ヒト起源の可変領域に由来（例えば、ヒト免疫グロブリン鎖由来、ヒトコンセンサス配列由来）するF R 1、F R 2、F R 3およびF R 4を含む。

本発明に用いられる非ヒト起源およびヒト起源の免疫グロブリン部分は、それらが由来する免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン部分またはそれらの変異体と同一の配列を有する。かかる変異体は、1以上の残基の付加、欠失または置換により異なる突然変異体を含む。前に示したように、非ヒト起源のC D Rは、非ヒトドナーにおいて実質的に同じであり、好ましくは非ヒトドナーのC D Rと同一である。実施例2に記載されるように、ヒト起源の枠組み領域の残基をドナーの対応する部分由来の残基と置換するもの等の枠組み領域における変化をなすことができる。1以上のアミノ酸の欠失、挿入および置換を含む枠組み領域における1以上の突然変異をなすことができる。いくつかのかかる置換は、実施例2においてヒト化A c t - 1抗体の設計に記載されている。選択されたヒト化抗体または鎖に関して、枠組み突然変異を本明細書に記載のように設計することができる。好ましくは、ヒト化免疫グロブリンは、非ヒトドナーのものと類似かまたはよりよいアフィニティで、4 7インテグリンを結合することができる。変異体は、非ヒトドナーまたはアクセプターのヒト鎖の突然変異導入を含む種々の適当な方法で生成することができる。本発明のヒト化免疫グロブリンは、ヒト 4 7インテグリンに対する結合特異性を有し、ヘテロダイマーの 4 および/または 7鎖の決定基を結合可能な（断片を含む）ヒト化免疫グロブリンを含む。好ましい態様において、本発明のヒト化免疫グロブリンは、結合機能（例えば、4 7インテグリンに対する特異性を有する、同一または類似のエピトープ特異性を有する）および/または阻害機能（例えば、イン・ビトロおよび/またはイン・ビボでM A d C A M - 1に結合する 4 7インテグリンを阻害する能力、または

4 7インテグリンを産生する細胞のそのリガンド（例えば、M A d C A M - 1を産生する細胞）への結合を阻害する能力のようなイン・ビトロおよび/またはイン・ビボで4 7依存性接着を阻害する能力）のようなネズミA c t - 1抗体の少なくとも1つの機能特性を有する。したがって、好ましいヒト化免疫グロブリンは、ネズミA c t - 1抗体の結合特異性、ネズミA c t - 1抗体のエピトープ特異性（例えば、4 7（例えば、4 7インテグリン産生細胞上）への結合に関して、ネズミA c t - 1、キメラA c t - 1抗体（例えば、実施例1を参照のこと）またはヒト化A c t - 1（例えば、L D P - 0 2）と競合できる）および/または阻害機能を有することができる。

4 7インテグリンに結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの結合機能は、例えば、ヒト化免疫グロブリンと 4 7インテグリン（例えば、4 7インテグリンを含有する膜画分、ヒトリンパ球（例えば、C D 4 + 4<sup>hi</sup>, 1<sup>10</sup>サブセットのリンパ球）、ヒトリンパ球細胞株、または 4 7インテグリンを発現する 4 および/または 7をコードする核酸を含有する組換え宿主細胞）のような 4 7インテグリンを産生する細胞上で）との間の複合体の形成をモニターするアッセイを用いる標準的な免疫学的方法により検出することができる。

また、結合および/または接着アッセイまたは他の適当な方法を、所望の特異性で、ヒト化免疫グロブリン（例えば、ライプラリー由来）の同定および/または単離のための手法（例えば、4 7インテグリンを産生する細胞とそのリガンド（例えば、M A d C A M を発現する第2の細胞、M A d C A M - I g キメラとの接着をモニターするアッセイ（実施例4等を参照のこと）、または他の適当な方法に用いることもできる。

10

20

30

40

50

本発明に用いられる非ヒトおよびヒト起源の免疫グロブリン部分は、軽鎖、重鎖ならびに軽鎖および重鎖の一部を含む。これらの免疫グロブリン部分は、免疫グロブリンから（例えば、ある部分のドウノボの合成により）得ることができるとし、免疫グロブリンに由来することができ、または、免疫グロブリンまたは所望の性質（例えば、47インテグリンを結合する、配列類似性）を有するその鎖をコードする核酸を生成して発現することができる。ヒトおよび非ヒト起源の所望の部分（例えば、抗原結合領域、CDR、FR、C領域）を含有するヒト化免疫グロブリンは、所望のヒト化鎖をコードする遺伝子（例えば、cDNA）を調製するための合成および/または組換え核酸を用いて生成することができる。鎖の一部を調製するためには、1以上の停止コドンを所望の位置に導入することができる。例えば、新規に設計したヒト化可変領域をコードする核酸（例えば、DNA）配列は、存在するDNA配列を変化させるためのPCR突然変異導入方法を用いて構築することができる（例えば、カマン（Kamman,M.）ら、Nucl.Acids Res.17:5404（1989）を参考のこと）。新規CDRをコードするPCRプライマーは、同一または非常に類似したヒト可変領域に基づいて前もってヒト化した可変領域のDNA鑄型にハイブリダイズすることができる（サトー（Sato,K.）ら、Cancer Research 53:851-856（1993））。類似のDNA配列が鑄型として利用できないならば、可変領域配列をコードする配列を含有する核酸を合成オリゴヌクレオチドから構築することができる（例えば、コルビンガー（Kolbinger,F.）、Protein Engineering 8:971-980（1993））。また、シグナルペプチドをコードする配列を核酸に組み込む（例えば、合成で、ベクターへの挿入により）こともできる。天然のシグナルペプチド配列を利用できないならば、他の抗体由来のシグナルペプチド配列を用いることができる（例えば、ケトルボロー（Kettleborough,C.A.）ら、Protein Engineering 4:773-783（1991）を参考のこと）。これらの方法、本明細書に記載された方法または他の好適な方法を用いて、変異体を容易に生成することができる（例えば、実施例5を参考のこと）。1つの態様において、クローニングした可変領域（例えば、LD P-02のもの）は、突然変異を導入することができ、所望の特異性を有する変異体をコードする配列を（例えば、ファージライブラリーから；例えば、クレバー（Kropper）ら、米国特許第5,514,548号明細書；フーゲンブーム（Hoogenboom）ら、国際公開第93/06213号パンフレット、1993年4月1日公開）選択することができる。

#### 核酸および該核酸を含有する構築物

また、本発明は、本発明のヒト化免疫グロブリンまたはヒト化免疫グロブリン軽鎖もしくは重鎖をコードする配列を含有する、単離されたおよび/または組換え（例えば、本質的に純粋を含む）核酸に関する。

本明細書における「単離された」核酸とは、その供給源のゲノムDNAまたは細胞RNAの核酸（例えば、細胞中またはライブラリーのような核酸の混合物中に存在するもの）から分離された核酸であり、本質的に純粋な核酸、化学合成により、生物学的方法と化学的方法との組合せにより生成された核酸ならびに単離された組換え核酸を含む、本明細書に記載された方法または他の好適な方法により得られた核酸を含む（例えば、ドウガティ（Daugherty,B.L.）ら、Nucleic Acids Res.,19(9):2471-2476（1991）；ルイス（Lewis,A.P.）とクローエ（J.S.Crowe）、Gene,101:297-302（1991））。

本明細書における「組換え」と言及された核酸とは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および/または制限酵素を用いるベクターへのクローニングのような人工的な組換え方法に依存する手法により生成する核酸を含む、組換えDNA方法論により生成された核酸である。また、「組換え」核酸は、細胞の天然のメカニズムを通じて発生する組換え事象からも生じるものであるが、所望の組換え事象を起こさせ、おそらく起こすように設計した核酸の細胞への導入後選択されるものもある。

また、本発明は、より具体的にはヒト化Act-1免疫グロブリン（即ち、非ヒト部分がネズミAct-1モノクローナル抗体に由来する本発明のヒト化免疫グロブリン）またはその鎖をコードするヌクレオチド配列を含有する単離されたおよび/または組換え核酸に関する。1つの態様において、軽鎖は、Act-1抗体の軽鎖に由来する3つの相補性決定領域を含有し、重鎖は、Act-1抗体の重鎖に由来する3つの相補性決定領域を含有

10

20

30

40

50

する。かかる核酸は、例えば、(a)ヒト化 A c t - 1 免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列(例えば、図11の重鎖可変領域(配列番号:19)、図9の重鎖可変領域(配列番号:15))を含むポリペプチドをコードする配列を含有する核酸、(b)ヒト化 A c t - 1 免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列(例えば、図12の軽鎖可変領域(配列番号:21)、図7の軽鎖可変領域(配列番号:12))を含むポリペプチドをコードする配列を含有する核酸、(c)ヒト化 A c t - 1 免疫グロブリンの軽鎖または重鎖可変領域の少なくとも機能性部分(例えば、前記鎖を含有するヒト化免疫グロブリンの抗原結合に充分な部分)をコードする配列を含有する核酸、を含む。遺伝コードの縮重性により、選択されたポリペプチドをコードする種々の核酸を作製することができる。1つの態様において、核酸は、二本鎖または一本鎖のポリヌクレオチドを含む、前記もしくは実質的に前記図11(配列番号:18)、または前記もしくは実質的に前記図12(配列番号:20)の可変領域のヌクレオチド配列を含有する。(種々の図面が可変領域よりも大きいポリペプチド(即ち、シグナルペプチドコーディング配列または定常領域コーディング配列の一部を含む)を図示してもよいが、特定の図面の可変領域への参照は、示された配列の可変領域の部分を含むことを意味する。)これらの基準に適合する単離されたおよび/または組換え核酸は、前記したヒト化 A c t - 1 抗体またはその変異体の配列と同一の配列をコードする核酸を含有することができる。

本発明の核酸は、47インテグリンに結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの生成に使用することができる。例えば、本発明のヒト化免疫グロブリンをコードする核酸(例えば、DNA)を、さらなる配列の操作または適当な宿主細胞におけるコード化ポリペプチドの生成のために、適当な構築物(例えば、ベクター)に組み込むことができる。

#### 47インテグリンに対する特異性を有するヒト化免疫グロブリンの製造方法

本発明の別の側面は、47インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの調製方法に関する。例えば、ヒト化免疫グロブリンは、例えば、適当な宿主細胞での47インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンをコードする1以上の組換え核酸の発現により得ることができる。

また、47インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの発現に適する構築物または発現ベクターも提供される。構築物は、適当な宿主細胞に導入することができ、本発明のヒト化免疫グロブリンを発現する細胞を製造して培養で維持することができる。好適な宿主細胞は、大腸菌、枯草菌(B.スプチリス)およびまたは他の適当な細菌等の細菌細胞を含む原核細胞、真核細胞、例えばカビ細胞や酵母細胞(例えば、ピチアパストリス、アスペルギルススピーシーズ、サッカロミセスセレビジエ、シゾサッカロミセスポンベ、ニューロスボラクラッサ)または他の下等真核細胞、ならびに昆虫由来の細胞(例えば、Sf9昆虫細胞(国際公開第94/26087号パンフレット、オコンナー(O'Connor)、1994年11月24日公開)または哺乳動物由来の細胞(例えば、COS細胞、NSO細胞、SP2/0、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、HuT78細胞、293細胞)等の高等真核細胞を挙げることができる(例えば、アウスベル(Ausubel,F.M.)ら編、Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc.,(1993)を参照のこと)。

47インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンを產生する宿主細胞は、以下のように製造できる。例えば、所望のヒト化免疫グロブリンのコーディング配列の全部または一部をコードする核酸を、核酸ベクター、例えばプラスミド、ウイルスまたは他の適当な発現用レブリコン等のDNAベクターに挿入することができる。種々のベクターを利用することができ、それらには単一コピーもしくは多コピーで維持されるベクターまたは宿主細胞染色体に組込まれるベクターが含まれる。

好適な発現ベクターはいくつかの成分を含有でき、限定されないが、下記の1以上:複製起点、選択可能マーカー遺伝子、1以上の発現制御エレメント、例えば、転写制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター)、および/または1以上の翻訳シグナル;膜標的化または分泌のシグナル配列またはリーダー配列が挙げられる。構築物中、シグナル配列を、該ベクターまたは他の供給源により提供することができる。

例えば、免疫グロブリンの転写および／または翻訳シグナルを用いて発現を指示することができる。

プロモーターは、適当な宿主細胞での発現用に提供されうる。プロモーターは構成的であってもよいし、誘導性であってもよい。例えば、プロモーターがコードされているポリペプチドの発現を指示するように、ヒト化免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖をコードする核酸に操作可能に連結することができる。原核生物宿主に適した種々のプロモーター（例えば、大腸菌には lac、 tac、 T3、 T7プロモーター）および真核生物宿主に適した種々のプロモーター（例えば、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH1）、 SV40、 CMV）を、利用できる。

さらに、発現ベクターは通常、該ベクターを保有する宿主細胞を選択するための選択可能マーカーおよび複製可能発現ベクターの場合、起点または複製（an origin of replication）を含有する。抗生物質耐性または薬剤耐性を付与する産物をコードする遺伝子は、一般的な選択可能マーカーであり、原核細胞（例えば - ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）、テトラサイクリン耐性用の Tet 遺伝子）中および真核細胞（例えばネオマイシン（G418 またはゼネティシン）、 gpt（ミコフェノール酸）、アンピシリン、またはハイグロマイシン耐性遺伝子）中で、使用してもよい。ジヒドロ葉酸レダクターゼマーカー遺伝子は、メトトレキセートによる選択を、種々の宿主で可能にする。宿主の栄養要求性マーカーの遺伝子産物をコードする遺伝子（例えば、 LEU2、URA3、 HIS3）は、酵母における選択可能マーカーとしてしばしば使用される。ウイルス（例えばバキュロウイルス）またはファージベクターおよび宿主細胞のゲノムに組み込むことができるレトロウイルスベクターなどのベクターの使用も予想される。また本発明は、これらの発現ベクターを保有する細胞にも関する。

例えば、47インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードする核酸（即ち、1以上の核酸）またはかかる1もしくは複数の核酸を含有する構築物（即ち、1以上の構築物）は、1もしくは複数の核酸が1以上の発現制御エレメントに操作可能に（例えば、ベクター中で、細胞中でプロセッシングにより生成された構築物中で、宿主細胞ゲノムに組み込まれて）結合されるように、選択した宿主細胞に適した方法（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）で適当な宿主細胞に導入することができる。宿主細胞は、発現に適した条件下で（例えば、誘導剤、適切な塩類、成長因子、抗生物質、栄養補給物等を補足した好適な培地の存在下で）維持され、それによりコードされている1もしくは複数のポリペプチドを生成することができる。所望ならば、コードされた蛋白質（例えば、ヒト化Act-1抗体）は、（例えば、宿主細胞、培地、ミルク）から単離できる。この過程は、トランスジェニック動物の宿主細胞での発現を包含する（例えば、国際公開第92/03918号パンフレット、ゲンファーム インターナショナル、1992年3月19日公開を参照のこと）。

ヒト化免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖が、融合蛋白質のN末端位置、C末端位置または中間で非免疫グロブリン部分（即ち、天然に見出されるような免疫グロブリンには存在しない部分）に結合している融合蛋白質を生成することができる。例えば、いくつかの態様は、免疫グロブリン配列をコードする核酸の適当な発現ベクター、例えば、 pET ベクター（pET-15b、ノバ-ジェン等）、ファージベクター（pCANTAB-5E、ファルマシア等）または他のベクター（pRIT2T プロテインA融合ベクター、ファルマシア等）への挿入により生成されうる。得られた構築物を、発現に適した宿主細胞に導入することができる。発現後、適当なアフィニティーマトリックスを利用して、細胞溶解液からいくつかの融合蛋白質を単離または精製できる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology（Ausubel, F.M.）ら編、第2巻、補遺26、16.4.1-16.7.8（1991）を参照のこと）。

#### 治療法と組成物

本発明は、（1）47インテグリンをイン・ビトロおよび／またはイン・ビボで結合でき；および／または、（2）47インテグリンの活性または機能、例えば、（a）

10

20

30

40

50

結合機能（例えば、 $4\beta_7$ インテグリンのMAdCAM-1、フィブロネクチンおよび/またはVCAM-1に結合する能力）および/または（b）組織における白血球の補給および/または蓄積を含む白血球浸潤機能（例えば、腸粘膜組織へのリンパ球移動を阻害する能力）を調節することができるヒト化免疫グロブリンを提供する。好ましくは、ヒト化免疫グロブリンは、イン・ビトロおよび/またはイン・ビボで選択的に $4\beta_7$ を結合し、 $4\beta_7$ 媒介相互作用を阻害することができる。1つの態様において、ヒト化免疫グロブリンは、 $4\beta_7$ インテグリンを結合し、 $4\beta_7$ インテグリンの1以上のそのリガンド（例えば、MAdCAM-1、VCAM-1、フィブロネクチン）への結合を阻害することができ、それにより（組織における白血球の補給および/または蓄積を含む）組織の白血球浸潤を好ましくは選択的に阻害する。かかるヒト化免疫グロブリンは、腸関連組織、リンパ節器官または白血球（特にT細胞またはB細胞のようなリンパ球）を含む粘膜組織で、 $4\beta_7$ インテグリンを産生する細胞の血管内皮細胞への細胞接着をイン・ビトロおよび/またはイン・ビボで阻害することができる。特に好ましい態様において、ヒト化免疫グロブリン（例えば、Act-1）は、 $4\beta_7$ のMAdCAM-1および/またはフィブロネクチンとの相互作用を阻害することができる。

本発明のヒト化免疫グロブリンは、研究、診断および治療法における適用を有する様々な過程で有用である。例えば、それらは、 $4\beta_7$ インテグリンまたはその変異体を（例えば、アフィニティー精製または他の好適な方法により）検出、単離および/または精製するため、ならびに $4\beta_7$ インテグリン構造（例えば、コンフォメーション）および機能を研究するために用いることができる。

また、本発明のヒト化免疫グロブリンは、診断適用（例えば、イン・ビトロ、エクス・ビボ）または治療（予防を含む）適用における $4\beta_7$ インテグリン機能の調節にも使用されうる。

例えば、本発明のヒト化免疫グロブリンは、試料（例えば、炎症滲出物、血液、血清、腸液、 $4\beta_7$ インテグリンを産生する細胞上などの組織または体液）中の $4\beta_7$ インテグリンのレベルを検出および/または測定するために使用することができる。例えば、試料（例えば、組織および/または体液）は、個体から得ることが可能であり、化学発光アッセイ、ラジオイムノアッセイおよび免疫組織学を含む酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）等の方法を含む適当な免疫学的方法を用いて、 $4\beta_7$ インテグリン発現を検出および/または測定することができる。1つの態様において、ヒト化免疫グロブリンの $4\beta_7$ インテグリンへの特異的結合に適した条件下で、試料を本発明のヒト化免疫グロブリンと接触させる工程および形成された抗体- $4\beta_7$ インテグリン複合体を検出する工程を含む、試料中の選択された $4\beta_7$ インテグリンの検出方法が提供される。当該方法の適用において、ヒト化免疫グロブリンは、正常組織と炎症組織（例えば、ヒト由来）との $4\beta_7$ インテグリン反応性および/または発現について（例えば、免疫組織学的に）分析し、IBDまたは他の状態と $4\beta_7$ の発現増加（例えば、冒された組織において）との関連を検出するために用いることができる。本発明のヒト化免疫グロブリンは、正常組織と炎症組織とで $4\beta_7$ インテグリンの存在の免疫学的評価方法を可能にし、それを通じて、疾患の存在、疾患の進行および/または抗 $4\beta_7$ インテグリン療法の炎症性疾患における効力を評価できる。

また、本発明のヒト化免疫グロブリンは、 $4\beta_7$ インテグリンの結合機能および/または白血球（例えば、リンパ球、单球）浸潤機能を調節するために用いられる。例えば、

$4\beta_7$ インテグリンのリガンド（即ち、1以上のリガンド）への結合を阻害するヒト化免疫グロブリンは、組織、特にMAdCAM分子を発現する組織の白血球（例えば、リンパ球、单球）浸潤（組織における白血球の補給および/または蓄積を含む）に関連した疾患の治療における方法に従って投与することができる。本発明のヒト化免疫グロブリン（即ち、1以上）の有効量を、かかる疾患を治療するために個体（例えば、ヒトまたは他の靈長類のような哺乳動物）に投与する。例えば、胃腸管（腸関連内皮を含む）、他の粘膜組織、またはMAdCAM分子を発現する組織（例えば、小腸および大腸の固有層の細静脈のような腸関連組織；ならびに乳腺（例えば、泌乳性乳腺））の白血球浸潤に関連する

10

20

30

40

50

疾患を含む炎症性疾患は、本発明の方法に従って治療することができる。同様に、MAdCAM分子を発現する細胞（例えば、内皮細胞）への白血球の結合の結果としての組織の白血球浸潤に関連した疾患を有する個体を、本発明の方法に従って治療することができる。

特に好ましい態様において、そのように治療できる疾患として、炎症性腸疾患（IBD）、例えば潰瘍性大腸炎、クローン病、回腸炎、腹腔疾患、非熱帯性スプラー、セロネガティブ関節症に関連する腸疾患、微細もしくはコラーゲン性大腸炎、好酸球性胃腸炎または直腸結腸切除術や回腸肛門吻合術後に起こる囊炎が含まれる。

膵炎とインシュリン依存性真性糖尿病は、本発明の方法を用いて治療できるその他の病気である。MAdCAM-1は、NOD（非肥満糖尿病）マウスならびにBALB/cマウスおよびSILマウスの外分泌膵臓のいくつかの血管によって発現されると報告されている。MAdCAM-1の発現は、NODマウスの膵臓の炎症を起こした島の内皮上で誘導されると報告されており、MAdCAM-1は、インスリン炎の初期段階にNOD島内皮によって発現される主要アドレシンであった（ハンニネン（Hanninen,A.）ら、J.Clin.Invest.,92:2509-2515（1993））。さらに、島内には47を発現するリンパ球の蓄積が観察され、MAdCAM-1は、炎症を起こした島由来の血管への47を介したリンパ腫細胞の結合に関与していた（ハンニネンら、J.Clin.Invest.,92:2509-2515（1993））。

本発明の方法に従って治療できる粘膜組織関連炎症性疾患の例は、乳腺炎（乳腺）、胆囊炎、胆管炎または胆管周辺炎（胆管と肝臓周辺の組織）、慢性気管支炎、慢性副鼻腔炎、喘息および（例えば、胃腸管における）対宿主性移植片病を含む。クローン病に見られるように、炎症はしばしば粘膜表面を超えて広がるので、間質性纖維症をもたらす肺の慢性炎症性疾患、例えば過敏性肺炎、コラーゲン病、類肉腫症および他の突発性疾患も治療できる。

ヒト化免疫グロブリンは、47インテグリンのそのリガンドへの結合を阻害する有効量で投与される。治療の場合、有効量とは、所望の治療（予防を含む）効果を達成するに足る量（例えば、47インテグリンが介在する結合および/またはシグナル伝達を軽減または妨げ、そうすることによって、白血球の接着および浸潤および/または関連する細胞応答を阻害するに足る量）になるだろう。ヒト化免疫グロブリンは、1回量または多数回量で投与することができる。用量は、当該技術分野で公知の方法によって決定でき、例えば患者の年齢、感受性、耐性および総合的健康状態などに依存することができる。抗体の好適な用量としては、1処置あたり約0.1～約10.0mg/kg体重であることができる。

本発明の方法に従って、ヒト化免疫グロブリンは、単独でまたは別の薬剤と組み合わせて個体（例えばヒト）に投与できる。ヒト化免疫グロブリンは、その助剤投与の前、助剤投与と同時または助剤投与後に投与できる。1つの態様において、47インテグリンのそのリガンドへの結合を阻害する1を越えるヒト化免疫グロブリンを投与する。別の態様において、内皮リガンドへの白血球の結合を阻害するモノクローナル抗体、例えば、抗MAdCAM-1、抗VCAM-1または抗ICAM-1抗体を、本発明のヒト化免疫グロブリンに追加して投与する。さらに別の態様において、追加の薬学的に活性な成分（例えば、スルファサラジン、他の非ステロイド系抗炎症性化合物またはステロイド系抗炎症性化合物のような抗炎症性化合物）を、本発明のヒト化免疫グロブリンと組み合わせて投与することができる。

様々な投与経路が可能であり、治療対象の疾患または状態に応じて、非経口（静脈内注射、動脈内注射、筋肉内注射、皮下注射など）、経口（食餌法など）、局所、吸入（気管支内吸入、鼻孔内吸入または経口吸入、鼻孔内滴剤など）または直腸投与などが挙げられるが、必ずしもこれらに限られるわけではない。非経口投与が好ましい投与法である。

処方は、選択した投与経路に応じて変化するだろう（例えば液剤、乳剤）。投与対象のヒト化免疫グロブリンを含有する適当な組成物を、生理学的に許容されうる賦形剤または担体中に調製することができる。液剤や乳剤の場合は、適当な担体には、例えば塩水や緩衝

10

20

30

40

50

媒体を含む水溶液、アルコール／水溶液、乳液または懸濁液が含まれる。非経口用の賦形剤には、塩化ナトリウム溶液、リングルデキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、乳酸化リングルまたは不揮発性油が含まれる。静脈内用の賦形剤には、種々の添加物、保存剤、または液体、栄養または電解物質補充剤が含まれる（一般的には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版、Mack Publishing Co., PA, 1985を参照のこと）。吸入法の場合は、化合物を可溶化し、適当な投与用ディスペンサー（例えば、アトマイザー、ネブライザーまたは加圧エアロゾールディスペンサー）に充填することができる。

#### 実施例

以下の実施例によって本発明を説明するが、本発明は、これらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例1に記載されるように、ネズミA c t - 1抗体を精製し、該抗体の配列分析を行なった。マウスA c t - 1抗体の軽鎖および重鎖可変領域をコードするc DNAをPCRクローニングし、シーケンスした。また、A c t - 1カッパ軽鎖可変領域( $V_L$ )のアミノ酸配列は、蛋白質のシーケンスにより決定し、 $V_L$ 遺伝子のDNA配列に由來したアミノ酸配列と正確に適合することがわかった。重鎖可変領域( $V_H$ )のアミノ酸配列の大部分は、蛋白質のシーケンスにより決定され、この配列も $V_H$ 遺伝子のDNA配列から推定されるアミノ酸と適合する。これらの結果により、ハイブリドーマ細胞株から正しいマウスA c t - 1可変領域がクローニングされたことが示される。正しい配列がクローニングされたことを確認した機能的なキメラA c t - 1抗体が生成された。特に、マウスA c t - 1軽鎖および重鎖可変領域をコードするDNAを、ヒトカッパ軽鎖およびヒトガンマ-1もしくはガンマ-4重鎖定常領域それぞれに結合させた。また、キメラ抗体を、ヒト化A c t - 1 mAb(再形成A c t - 1 mAb LD P - 02)との比較分析に用いた。

4 7インテグリンとよく結合するヒト化A c t - 1抗体を作製するために、再形成ヒト可変領域を設計した（実施例2）。設計過程において補助するために、マウスA c t - 1可変領域の分子モデルを作った。ネズミA c t - 1抗体の領域は、抗原への結合に直接関与し、相補性決定領域すなわちCDRは、選択された可変領域内に接ぎ合わされた。ヒト可変領域の枠組み領域(FR)内の位置でのいくつかのアミノ酸変化がなされた。再形成ヒトA c t - 1可変領域は、元のヒト残基が対応するネズミ残基にそれぞれ変化している、選択されたヒト軽鎖可変領域のFR中の1つのアミノ酸変化および選択されたヒト重鎖可変領域のFR中の5つのアミノ酸変化を含んでいた。

実施例3に記載されるように、これらの再形成ヒトA c t - 1可変領域をコードするDNA配列を構築し、ヒト定常領域をコードするDNA配列に結合させ、得られた核酸を用いてヒト化A c t - 1免疫グロブリンを生成させた。ヒト化A c t - 1抗体を、哺乳動物細胞で発現させ（実施例3）、マウスA c t - 1抗体と比較してヒト 4 7インテグリンへの結合を試験した（実施例4）。表5に示すように、ヒト化A c t - 1抗体は、ネズミA c t - 1により認識されるエピトープに対する特異性を保持し、天然のネズミ抗体と比較して予期しない改良された結合アフィニティーを示した。

ヒト化A c t - 1抗体のいくつかの変異体は、設計過程で同定された（実施例2および5）。例えば、以下の位置の1以上での追加の変化がなされる：軽鎖変異体M 4 V (4位でのM e t V a l変異)、重鎖変異体R 3 8 K (38位でのA r g L y s変異)、重鎖変異体A 4 0 R (40位でのA l a A r g変異)。さらに、73位をヒトスレオニン残基に復帰させる重鎖変異体I 7 3 T (73位でのI l e T h r復帰突然変異)がヒト枠組み領域中のこの位置で見られた。一本鎖でのこれらの変化の1以上の導入または1を越える鎖でのこれらの変化の種々の組合せがなされる。

#### 実施例1 A c t - 1 $V_H$ および $V_L$ 領域のクローニングならびにネズミ - ヒトA c t - 1キメラ免疫グロブリンの構築と発現

##### A c t - 1 $V_H$ および $V_L$ 領域のクローニング

RNAは、製造業者の示したプロトコールに従ってTRIZol試薬(Gibco/BRL)を用いて、A c t - 1モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞から得た（ラザロビツツら、J. Immunol. 133 (4) :1857-1862 (1984)；ラザロビツツとコルビン(R.B. Colvin

10

20

30

40

50

)により供与された)。

転写された重鎖および軽鎖可変領域は、製造業者の示したプロトコールに従って Ig - Prime キット (Novagen) を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅した。要約すると、1.5 μg の全 RNA を、2.0 μl の 5X MMLV 緩衝液 (5X = 250 mM Tris-HCl、25 で pH 8.3、37.5 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>)、1.0 μl の 100 mM DTT (ジチオスレイトール)、0.5 μl の 10 mM dNTP 混合物 (各 10 mM の dATP、dCTP、dTTP、dGTP)、0.5 μl のオリゴdT (1 μg/μl)、0.25 μl のアセチル化 BSA (4 mg/ml)、1.0 μl の適当な Ig-3' プライマー (10 pmol/μl)、0.5 μl の MMLV 逆転写酵素 (200 ユニット/μl) および 10 μl の全容量まで添加した RNA 10 一ゼ不含有水を含む反応で、cDNA に逆転写した。混合物を 37 で 5 分間、42 で 30 分間および 99 で 5 分間インキュベートした。各 Ig-3' プライマーを別々の反応に用いた。

可変領域は、製造業者のプロトコールに従って、逆転写した材料から増幅した。要約すると、8 μl の逆転写した材料を、4 μl の 2.5 mM dNTP、5 μl の 10X 反応緩衝液 (10X = 100 mM Tris-HCl、25 で pH 8.8、500 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>、1% Triton X-100)、2.5 μl の Ig-5' リーダープライマー (10 pmol/μl) (各 Ig-5' プライマーを別々の PCR 反応に用いた)、0.25 μl (1.25 ユニット) の AmpliTaq<sup>R</sup> DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer) および 50 μl の全容量までの水と混合した。 20

5' プライマー Mu Ig V<sub>H</sub>5' - A、Mu Ig V<sub>H</sub>5' - B、Mu Ig V<sub>L</sub>5' - A および Mu Ig V<sub>L</sub>5' - B との増幅に関して、サイクルパラメーターは、1 分、94 ; 1 分、50 ; 2 分、72 の 35 サイクル後 72 で最後の 6 分の伸長であった。アニーリング温度を 60 に上げたことを除いて、他のすべての 5' プライマーについて同じ反応条件を用いた。

重鎖可変領域は、3' プライマーとして Mu Ig G V<sub>H</sub>3' - 2 または Mu Ig M V<sub>H</sub>3' - 1 のいずれか、および 5' プライマーとして Mu Ig V<sub>H</sub>5' - B または Mu Ig V<sub>H</sub>5' - E のいずれかを用いて増幅が成功した。軽鎖可変領域は、3' プライマーとして Mu Ig V<sub>L</sub>3' - 1 および 5' プライマーとして Mu Ig V<sub>L</sub>5' - G を用いて増幅が成功した。 30

これらのプライマーの配列は、以下のようであった：

Mu Ig GV<sub>H</sub> 3' - 2 (配列番号: 56) :

5'-CCC AAG CTT CCA GGG RCC ARK GGA TAR ACI GRT GG

Mu Ig MV<sub>H</sub> 3' - 1 (配列番号: 57) :

5'-CCC AAG CTT ACG AGG GGG AAG ACA TTT GGG AA

Mu Ig V<sub>H</sub> 5' - B (配列番号: 58) :

5'-GGG AAT TCA TGR AAT GSA SCT GGG TYW TYC TCT T

10

Mu Ig V<sub>H</sub> 5' - E (配列番号: 59) :

5'-ACT AGT CGA CAT GAA GWT GTG GBT RAA CTG GRT

Mu Ig  $\kappa$  V<sub>L</sub> 3' - 1 (配列番号: 60) :

5'-CCC AAG CTT ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA

Mu Ig  $\kappa$  V<sub>L</sub> 5' - G (配列番号: 61) :

5'-ACT AGT CGA CAT GGA TTT WCA RGT GCA GAT TWT CAG CTT

20

増幅した断片をアガロースゲルで精製し、Ig - Primeキットとともに提供されたpT7Blue Tベクター (Novagen) にライゲートし、ライゲーション混合物を用いて、製造業者のプロトコールに従って、該キットとともに提供されたNovablueコンピテント細胞を形質転換した。

適当なサイズのインサートを含む白色コロニーを、pT7Blueベクターのポリクローニングサイトのすぐ外側のインサートの反対側でアニールするT7プロモータープライマーおよびU-19マープライマーを用いてシーケンスした。シーケンスは、製造業者の推奨したプロトコールに従ってSequence T7DNAポリメラーゼキット (USB/Amersham Life Science) を用いてミニプレップDNAで行なった。

30

いくつかの独立した重鎖可変領域クローン由来のコンセンサスDNA配列 (配列番号: 1) および推定アミノ酸配列 (配列番号: 2) を図1に示す。縮重プライマーは、配列においてある縮重へ導いた。開始コドンは、ヌクレオチド13~15によりコードされるMetであり、予想されるリーダーペプチダーゼ切断部位は、ヌクレオチド67~69によりコードされるSerとヌクレオチド70~72によりコードされるGlnとの間 (ヌクレオチド13~69はリーダーペプチドをコードする) である。残基433~435によりコードされるアラニンで始まるネズミ定常領域の部分を示す。

いくつかの独立した軽鎖可変領域クローンのDNA配列 (配列番号: 5) およびアミノ酸配列 (配列番号: 6) を図3に示す。重鎖可変領域とは異なり、増幅した配列は縮重していないなく、おそらく、使用したプライマーがあまり縮重していないなく、可変領域が単一のプライマー対のみから増幅されたためであろう。

40

キメラ重鎖遺伝子の構築

キメラマウス-ヒト重鎖遺伝子をコードする遺伝子を作製した。ヒト重鎖定常領域の供給源は、野生型ヒトガンマ1 (1) 定常領域を含むクローン (ヘルマン ウォルトマン (Herman Waldman) 博士 (オックスフォード大学) から得た) であり;構築物は、pEE6発現ベクター (Celltech) 中にヒト化抗CD18重鎖遺伝子を含有する3818と称した。定常領域は、その教示がそのまま参照により本明細書に取り込まれる、シムズ (Sims, M.J.) ら、J.Immunol., 151 (4): 2296-2308 (1993) および1993年2月4日に公開された国際公開第93/02191号パンフレットに記載のようにpEE6.hCMVにクローニングされたヒト化CD18重鎖遺伝子の定常領域と一致する。ヒト化抗CD18抗体

50

の重鎖可変領域および定常領域（野生型ガンマ1）をコードする配列は、Hind IIIとEco RIとの消化により発現ベクターから放出された。重鎖遺伝子を含む1.421b p断片を回収し、pCR-Script<sup>TM</sup> (Stratagene)のHind IIIおよびEco RI部位にサブクローニングし、pCR-CD18Hと称するプラスミドを得た。Spe I制限部位は、抗CD18重鎖遺伝子の可変領域と定常領域との間のジャンクションに位置する。pCR-CD18HをHind IIIとSpe Iで消化して、重鎖可変領域を放出させた。この可変領域を、以下のように、縮重したマウスAct-1可変領域と置換した。新規な制限部位を取り込むために2つのプライマーを合成した。これらのプライマーは：5' - プライマー（配列番号：41）：

10

Hind III

5' - T[AA GCT T]CC GCC ATG GGA TGG AGC

3' - プライマー（配列番号：42）：

Spe I

5' - GGT GAC [ACT AGT] GCC TTG ACC CCA G

であった。太字の活字は、鑄型配列と異なるプライマー中のヌクレオチドを示す。図2に示したヌクレオチド配列（配列番号：3）およびアミノ酸配列（配列番号：4）を有するH2B#34と称する独立したマウスAct-1重鎖クローンを鑄型として、前記5'および3'プライマーとともに用いて、開始コドンの5'側Hind III部位とJ領域のちょうど3'側のSpe I部位を同時に導入するマウス可変領域を増幅させた。PCR断片をpCR-Script<sup>TM</sup>に直接サブクローニングしてプラスミドpCR-mACT1HVを生じさせ、正しい配列を確認した。次いで、Hind IIIとSpe Iとの消化によりpCR-mACT1HVから断片を放出させて、抗CD18可変領域の代わりにpCR-CD18HのHind IIIおよびSpe I部位に挿入し、pCR-mhACT1Hch1を得た。次いで、Hind IIIとEco RIでpCR-mhACT1Hch1からキメラ重鎖（マウスAct-1可変+ヒトガンマ1定常）遺伝子を放出させ、hCMVプロモーターを含有するpEE6hCMV-Bベクターに戻しクローニングし、pEE6mhACT1Hch1と称する構築物を得た。

20

キメラ軽鎖遺伝子の構築

キメラマウス-ヒト軽鎖遺伝子は、重鎖に関するものと同様な様式で構築した。しかしながら、キメラ軽鎖の場合、新規な制限部位Kas Iは、KG#87と称するマウスAct-1軽鎖可変領域クローンの1つを鑄型として用いる可変領域断片のPCR増幅、およびヒト化抗CD18カッパ軽鎖遺伝子を含む構築物（ヘルマン ウォルトマン博士（オックスフォード大学）から得た；pEE12発現ベクター中にヒト化抗CD18軽鎖を含む3819と称する構築物）を鑄型として用いるカッパ軽鎖定常領域のPCR増幅により構築物内で工作した。定常領域は、シムズ（Sims, M.J.）ら、J. Immunol., 151 (4): 2296-2308 (1993) および1993年2月4日に公開された国際公開第93/02191号パンフレットに記載のようにpEE12にクローニングされたヒト化CD18軽鎖遺伝子の定常領域と一致する。

30

可変領域に対するプライマーは：

40

5' - プライマー (配列番号: 4 3) :

HindIII  
5' - T [AA GCT T] CC GCC ATG AAG TTG CCT

3' - プライマー (配列番号: 4 4) :

Kas I  
5' - [GGC GCC] GCA TCA GCC CGT TTT

10

であった。太字の活字は、鋳型中のヌクレオチドとは異なるプライマー中のヌクレオチドを示す。Kas I 部位を創出させるためのコーディング領域内の 2 個のヌクレオチドの変化、図 3 の 4 2 3 位で T G および 4 2 6 位で A G はサイレントであり、アミノ酸配列は変化しなかった。

カッパ定常領域に対するプライマーは:

5' - プライマー (配列番号: 4 5) :

Kas I  
5' - C [GG CGC C] AT CTG TCT TCA TC

20

3' - プライマー (配列番号: 4 6) :

HindIII  
5' - [AAG CTT] CTA ACA CTC TCC

であった。

軽鎖可変領域および定常領域を、それぞれの鋳型とプライマーを用いて別々に増幅し、PCR 産物を p C R - S c r i p t <sup>TM</sup> に別々にサブクローニングして配列を確認した。次いで、各断片を HindIII と Kas I との消化により該ベクターから放出させ、ゲルで精製して、HindIII 消化によりヒト化抗 C D 1 8 軽鎖遺伝子をすでに除去しておいた 3 8 1 9 p E E 1 2 発現ベクターの HindIII 部位にトリプルライゲートした。得られた構築物を P E E 1 2 m h A C T 1 L c h i と称する。

30

キメラ免疫グロブリンの発現

キメラ重鎖および軽鎖遺伝子の両方を含む発現ベクターの構築のために、全重鎖遺伝子と CMV プロモーターを、 B g I I I と B a m H I との消化により p E E 6 発現ベクター ( p E E 6 m h A C T 1 H c h i ) から放出させた。次いで、この断片を、 p E E 1 2 軽鎖遺伝子発現ベクター ( p E E 1 2 m h A C T 1 L c h i ) の B a m H I 部位にライゲートし、それが別の CMV プロモーターの転写制御下にあるキメラ軽鎖遺伝子およびキメラ重鎖遺伝子を両方とも含む p E E 1 2 m h L H c h i と称する 1 つのプラスミドが生成した。

p E E 6 h C M V - B および p E E 1 2 発現ベクターならびに C e l l t e c h グルタミン シンセターゼ ジーン アンプリフィケーション システムは、以前に記載されている ( 例えは、その教示がそれぞれ、そのまま参照により本明細書に取り込まれる国際公開第 8 6 / 0 5 8 0 7 号パンフレット ( Celltech ) 、国際公開第 8 7 / 0 4 4 6 2 号パンフレット ( Celltech ) 、国際公開第 8 9 / 0 1 0 3 6 号パンフレット ( Celltech ) 、欧州特許第 0 3 2 3 9 9 7 B 1 号明細書 ( Celltech ) および国際公開第 8 9 / 1 0 4 0 4 号パンフレット ( Celltech ) を参照のこと ) 。

40

キメラ抗体の一過性の発現のために、 2 0  $\mu$  g の p E E 1 2 m h L H c h i を、以下のようにエレクトロポレーションにより C O S - 7 細胞 ( アメリカンタイプカルチャーコレクション、パークロードライブ 1 2 3 0 1 、ロックビル、 M D 、 2 0 8 5 2 ) にトランスフェクトした。対数増殖期で生育している C O S - 7 細胞を、トリプシン - E D T A での

50

処理により組織培養フラスコから採集した。該細胞をリン酸緩衝化塩水 (P B S ) で 1 回、ハンクのバランス塩溶液 (H B S S ) で 1 回洗浄し、1 m l の H B S S 当たり  $1.5 \times 10^7$  個の細胞濃度で再懸濁させた。0.8 m l の H B S S 中  $1.2 \times 10^7$  個の細胞を 20  $\mu$  g のプラスミド D N A と混合し、室温で 10 分間インキュベートした。次いで、D N A / 細胞混合物を 0.4 c m のエレクトロポレーションキュベットに移し、B i o - R a d G e n e P u l s e r を用いて 250 V、960  $\mu$  F で電流を適応した。エレクトロポレーション後室温で 10 分間のインキュベーション後、該細胞を 20 m l の培養培地 (ダルベッコの改変イーグル培地 (D M E M ) + 10 % F C S ) に移し、162 c m<sup>2</sup> の組織培養フラスコ (Costar) で培養した。5 日後、細胞培養上清を集め、47 インテグリンを発現する H u T 7 8 細胞を染色する能力を試験した。H u T 7 8 細胞 (ヒトリンパ腫細胞株) は、アメリカンタイプカルチャーコレクション、パークローネドライブ 12301、ロックビル、M D 、20852 のアクセス番号 A T C C T I B 161 から利用することができる。

100  $\mu$  l の一過性にトランスフェクトした C O S - 7 細胞培養上清、モックトランスフェクトした C O S - 7 細胞上清、精製したネズミ A c t - 1 抗体 (10  $\mu$  g / m l ) またはそれぞれマウスに対する精製した無関係アイソタイプ適合対照抗体 (マウス I g G 1 、カッパ (M O P C 2 1 ) 、Sigma 製の 10  $\mu$  g / m l ) およびヒトに対する精製した無関係アイソタイプ適合対照抗体 (ヒト I g G 1 、カッパ、Sigma 製の 10  $\mu$  g / m l ) を、 $1 \times 10^5$  個の H u T 7 8 細胞と氷上で 30 分間インキュベートした。該細胞を、2 % ウシ胎仔血清 (F C S ) および 0.01 % アジ化ナトリウムを含む P B S からなる緩衝液 (F A C S 緩衝液) を氷冷したもので 2 回洗浄した。次いで、該細胞を適切な蛍光二次抗体 (フルオレッセイン (F I T C ) 結合 A f f i n i P u r e F (a b')<sub>2</sub> 断片ヤギ抗マウス I g G (H + L) (Jackson ImmunoResearch) またはフルオレッセイン (F I T C ) 結合 A f f i n i P u r e F (a b')<sub>2</sub> 断片ヤギ抗ヒト I g G (H + L) (Jackson ImmunoResearch) のいずれか) とともに氷上で 30 分間インキュベートした。氷上で 30 分後、該細胞を F A C S 緩衝液で 2 回洗浄し、300 m l の同じ緩衝液に再懸濁し、B e c t o n D i c k i n s o n F A C s c a n でフローサイトメトリーにより分析した。図 4 A は、マウスアイソタイプ適合無関係対照抗体、M O P C 2 1 (I g G 1 、カッパ) と比較したネズミ A c t - 1 m A b の染色を示す。図 4 B は、ヒトアイソタイプ適合無関係対照抗体 (I g G 1 、カッパ) およびモックトランスフェクトした C O S - 7 細胞上清と比較した H u T 7 8 細胞のキメラ A c t - 1 抗体の染色を示す。したがって、ネズミ A c t - 1 抗体により生じた染色と比較して、キメラ抗体は同様に H u T 7 8 細胞を染色した。まとめると、これらのデータは、マウス A c t - 1 可変領域に関して適切な配列をうまくクローン化し、かつ、発現したことを示す。

#### アミノ酸配列分析

アミノ酸配列分析を、精製したネズミ A c t - 1 重鎖および軽鎖で行ない、ハイブリドーマから単離された軽鎖および重鎖可変領域の c D N A の同一性を確認した。これは、軽鎖に関しては以下のように達成された：

ネズミ A c t - 1 (5 m g / m l ) を、窒素雰囲気下、0.3 M ホウ酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム中、37° で 2 時間、2 m M D T T で還元した。次いで、該溶液をヨードアセトアミドで 10 m M にし、室温で 4 時間インキュベートした。非変性条件下での S D S - P A G E 分析により、蛋白質が定量的に還元されていることを確認した。次いで、該蛋白質溶液を P B S で大量に透析し、アリコートを S u p e r d e x 7 5 カラム (16 / 60 、Pharmacia) に適用した (操作 1 )。重鎖および軽鎖は、排除容量のそれに対応する溶出容量でこのカラムから共溶出し、このことは、2 つの鎖がまだ共に保持されていることを示唆する。次いで、新たなアリコートを 8 M 尿素処理し、変性条件下 (6 M 尿素) で s u p e r d e x 7 5 カラムにかけた (操作 2 )。両鎖は、おそらくフォールディングされないことにより、ボイドボリュームに再び共溶出した。S D S - P A G E 分析により、2 つのゲル濾過操作から溶出された 2 つの試料に両鎖が存在することを確認した。これらの試料を、N 末端配列分析 (Commonwealth Biotechnologies, Inc.) 50

に供し、以下の結果を得た：

試料2：DVVVTQTPSLPVSFDGQV（配列番号：47）

試料1：DVVVTQTPSL（配列番号：48）

得られた配列は、DNA配列から推定された成熟軽鎖のN末端に対応するものである。重鎖の配列を得るためのこの試行および他の試行により、そのN末端がブロックされているようであることが示唆された。したがって、内部ペプチド断片のアミノ酸配列分析を重鎖について行なった。

内部アミノ酸シーケンスを単純化するために、ペプシンでの切断により抗体からF(ab')2断片を生成させた。ネズミAct-1を、0.1Mクエン酸ナトリウム、pH3.0中、抗体：ペプシンが1:200の割合でペプシンにより37℃で2時間切断した。SDS-PAGE分析で評価したように、反応は完全であった。次いで、蛋白質をプロテインGおよびプロテインAカラムを通して精製した。次いで、前記したように、試料を還元してアルキル化し、調製用SDS-PAGE(15%)により重鎖断片を軽鎖断片から分離した。重鎖断片を切り出し、ランニング緩衝液を有する1mlの0.1%SDSに2時間電気溶出させた。この試料を、2ngのAsp-Nエンドプロテイナーゼで30分間切断し、SDS-PAGE(17.5%)により断片を分離した。消化産物は、0.1M Hepes pH8.0、0.1%SDSに一晩受動溶出させ、N末端配列分析( Commonwealth Biotechnologies, Inc.)に供した。

17Kda断片から得られた配列は、DYAIDYWG（配列番号：49）であり、これは、重鎖のクローンに存在していた（図1；配列AIDYはJH4領域の開始部位に対応する）。

#### 実施例2 マウスAct-1可変領域の分子モデル化

CDRを接ぎ合わせた可変領域の設計を補助するために、マウスAct-1可変領域の分子モデルを作製した。よくキャラクタライズされた蛋白質ファミリーの構造を免疫グロブリンでモデル化することは、ホモロジーによるモデル化に関して確立された方法を用いて行なった。分子モデル化は、UNIXオペレーティングシステム、分子モデリングパッケージQUANTA (Polygen Corp., Waltham, MA) および解明された蛋白質構造のBrookhaven結晶学データベース下で稼働するSilicon Graphics IRIS 4Dワークステーションを用いて行なった。第1工程として、新規可変領域の枠組み領域(FR)を、類似の構造的に解明された免疫グロブリン可変領域由来のFRでモデル化した。同一のアミノ酸側鎖は、それらの元の方向で保持されていたが、変異した側鎖は、元のマウスAct-1抗体と同様なカイ(chi)アングルを維持するように最大重複法を用いて置換された。新規可変領域のCDRの大部分は、CDRに関する標準構造に基づいてモデル化された(ショチア(Chothia, C.)とレスク(A.M. Lesk)、J. Mol. Biol. 96:901-917 (1987); ショチアら、Nature 342:877-883 (1989); トランタノ(Tramontano, A.)ら、J. Mol. Biol. 215:175-182 (1990); ショチアら、J. Mol. Biol. 227:799-817 (1992))。公知の標準構造がない重鎖可変領域のCDR3のような場合、CDRループは、いかなる構造的に解明された蛋白質にも存在する類似のループ構造に基づいてモデル化した。最後に、好ましくない原子の接触を軽減し、ファンデルワールスおよび静電的相互作用を最適化するために、該モデルをQUANTAで実行したようなCHARMMポテンシャル(ブルックス(Brooks, B.R.)、J. Comp. Chem. 4:187-217 (1983))を用いるエネルギー極小化に供した。

マウスAct-1可変領域に関して、軽鎖可変領域由来のFRは、マウスモノクローナル抗体4-4-20(ヘロン(Herron, J.N.)ら、Proteins. Structure, Function and Genetics 5:271-280 (1989))のFab断片由来のFRでモデル化した。重鎖可変領域由来のFRは、マウスモノクローナル抗体D11.15(キターラ(Chitarra, V.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:7711-7715 (1993))のFab断片由来のFRでモデル化した。マウスAct-1抗体とモデルの基礎となった可変領域との間で異なるこれらのアミノ酸側鎖を置換した。次いで、2つの異質可変領域(即ち、4-4-20に基づくカッパ軽鎖可

10

20

30

40

50

変領域およびD 1 1 . 1 5 に基づく重鎖可変領域)を互いの観点から正しい方向に置換するため、F a b 4 - 4 - 2 0 抗体の軽鎖を、(カバット (Kabat, E.A.) ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局 (1991) により規定されたように) 残基 3 5 ~ 3 9、4 3 ~ 4 7、8 4 ~ 8 8 および 9 8 ~ 1 0 2 の空間で整列させることにより D 1 1 . 1 5 の軽鎖上に重ね合わせた。

m A b A c t - 1 の軽鎖可変領域の C D R 1 ( L 1 ) は、ショチアラ、Nature 342:877-883 (1989) により提唱されたように、L 1 標準サブグループ 4 に適合した。マウス F a b 4 - 4 - 2 0 (前記参照のこと) の L 1 ループは、アミノ酸の長さが同一であり、アミノ酸配列が類似し、さらに標準サブグループ 4 にも適合した。その結果として、該 L 1 ループは、F a b 4 - 4 - 2 0 の L 1 ループでモデル化された。同様に、m A b A c t - 1 の軽鎖可変領域の C D R 2 ( L 2 ) および C D R 3 ( L 3 ) は、それぞれの標準サブグループ 1 ループ構造および F a b 4 - 4 - 2 0 の対応する C D R の両方に適合した。したがって、A c t - 1 カッパ軽鎖可変領域の L 2 および L 3 ループは、F a b 4 - 4 - 2 0 の C D R L 2 および L 3 でモデル化された。

m A b A c t - 1 の重鎖可変領域の C D R 1 ( H 1 ) は、マウス m A b D 1 1 . 1 5 (前記を参照のこと) の対応する H 1 ループと同様に、ショチアラ、Nature 342:877-883 (1989) により規定されたように、H 1 標準サブグループ 1 に適合した。さらに、m A b D 1 1 . 1 5 C D R 1 ループは、m A b A c t - 1 の H 1 と長さが同一であり、アミノ酸配列が非常に類似していた。その結果として、軽鎖と同様に、このループは、該モデルの基礎となった重鎖可変領域の C D R 1 ループでモデル化された。重鎖可変領域の C D R 2 ( H 2 ) を規定するのはより困難であったが、H 2 標準サブグループ 2 に対応するように思われた。また、D 1 1 . 1 5 抗体の H 2 ループも同一の標準サブグループに適合し、アミノ酸配列が非常に類似していたので、m A b A c t - 1 の H 2 ループは、D 1 1 . 1 5 の H 2 ループでモデル化された。

前記考察したように、重鎖可変領域の C D R 3 は、高度に変化しており、同定可能な構造グループに分類することができない。H 3 ループをモデル化するためには、同一の長さと類似のアミノ酸配列のループ - 好ましくは別の抗体由来 - が同定され、ループのモデル化の基礎として用いられる。ループサイズに関して A c t - 1 の C D R 3 に適合する、3種の抗体由来のすべてが H 3 ループである3つのループが存在した。立体的不一致についてすべての3つのループ構造をモデルで試験した後、ヒト抗体 P o t (ファン (Fan, Z.C.) ら、J.Mol.Biol.228:188-207 (1992) ) 由来の H 3 ループが選ばれ、m A b A c t - 1 の H 3 ループをモデル化した。自明な立体的不一致についてモデルの全体を調整した後、該モデルを Q U A N T A で実行したように、エネルギー極小化に供した。

#### C D R 接合可変領域の設計

C D R を接ぎ合わせた可変領域の設計における第1工程は、ヒト化可変領域の基礎として役立つヒト軽鎖および重鎖可変領域の選択である。ヒト可変領域の選択に関する2つのアプローチを試験して比較した。1つのアプローチでは、ヒト可変領域をヒト可変領域の異なるサブグループに対するコンセンサス配列から選択した(カバット (Kabat, E.A.) ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局 (1991) )。齧歯類軽鎖および重鎖可変領域を、ヒトコンセンサス配列と比較し、最も類似したヒト軽鎖および重鎖コンセンサス配列を、ヒトラムダ軽鎖可変領域の6つのサブグループ、ヒトカッパ軽鎖可変領域の4つのサブグループおよびヒト重鎖可変領域の3つのサブグループの中から選択した(ケトルボロー、Protein Engineering 4:773-783 (1991) を参照のこと)。別のアプローチでは、ヒト可変領域をヒト可変領域に関するすべての公開された配列から選択した(カバット (Kabat, E.A.) ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局 (1991) )。齧歯類軽鎖および重鎖可変領域のアミノ酸配列を、ヒト配列と比較し、齧歯類可変領域と高い程度の類似性を有するヒト可変領域を選択した。同一のヒト抗体に由来するヒト軽鎖および重鎖可変領域は、2つの可変領域が適切に集合す

10

20

30

40

50

るということを確実にするために用いることができる(クイーン(Queen,C.)ら、Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 86:10029-10033(1989))。しかしながら、本明細書に記載されるように、鑄型として選択されたヒト軽鎖および重鎖可変領域は、2つの異なるヒト抗体に由来するものであった。このようにして、齧歯類可変領域に高い程度の類似性を有するヒト可変領域を選択することが可能であった。2つの異なるヒト抗体に由来する可変領域に基づくCDRを接ぎ合わせた抗体の多くの成功例がある。最もよく研究された例の1つは、再形成されたヒトCAMPATH-1抗体である(リーヒマン(Riechmann,L.)ら、Nature 322:323-327(1988))。

再形成ヒトACT-1可変領域を設計するために、マウスACT-1可変領域を、マウスおよびヒト可変領域のすべてのサブグループに関するコンセンサス配列と比較した(カバット(Kabat,E.A.)ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991))。その結果を表1および2に要約する。

マウスAct-1軽鎖可変領域は、全体で83.9%の同一性およびFRのみ内で87.5%の同一性を有し、マウスカッパ軽鎖サブグループIIのコンセンサス配列と最も類似していた(表1)。ヒト抗体配列の観点から、マウスAct-1軽鎖可変領域は、全体で72.3%の同一性およびFRのみ内で78.8%の同一性を有し、ヒトカッパ軽鎖サブグループIIのコンセンサス配列と最も類似していた(表1)。

表1. マウスAct-1カッパ軽鎖可変領域とマウスおよびヒトカッパ軽鎖可変領域のサブグループのコンセンサス配列との比較。

CDR配列を有するおよび有しないマウスAct-1カッパ軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、CDR配列を有するおよび有しないマウスならびにヒトカッパ軽鎖可変領域の異なるサブグループのコンセンサス配列と比較した。最も類似したマウスおよびヒトサブグループのパーセント類似性および同一性を掲載する。

マウスまたはヒト可変領域	Kabat サブグループ	完全可変領域 またはFRのみ	%類似性	%同一性
マウス	II	完全	91.07	83.93
		FRのみ	95.00	87.50
ヒト	II	完全	83.93	72.32
		FRのみ	90.00	78.75

マウスAct-1重鎖可変領域は、全体で83.5%の同一性およびFRのみ内で94.3%の同一性を有し、マウス重鎖サブグループIIBのコンセンサス配列と最も類似していた(表2)。ヒト抗体配列の観点から、マウスAct-1重鎖可変領域は、全体で68.6%の同一性およびFRのみ内で75.9%の同一性を有し、ヒト重鎖サブグループIのコンセンサス配列と最も類似していた(表2)。これらの結果により、マウスAct-1可変領域がマウス可変領域の典型例のようであることが確認される。また、この結果は、ヒト可変領域鑄型またはCDR接合用受容体のよい供給源として役立ちうるヒト可変領域のサブグループを示唆する。

表2. マウスAct-1重鎖可変領域とマウスおよびヒト重鎖可変領域のサブグループのコンセンサス配列との比較。

CDR配列を有するおよび有しないマウスAct-1重鎖可変領域のアミノ酸配列は、CDR配列を有するおよび有しないマウスならびにヒト重鎖可変領域の異なるサブグループのコンセンサス配列と比較した。最も類似したマウスおよびヒトサブグループのパーセント類似性および同一性を掲載する。

10

マウスまたはヒト可変領域	Kabat サブグループ	完全可変領域 またはFRのみ	%類似性	%同一性
マウス	IIB	完全	89.26	83.47
		FRのみ	95.40	94.25
ヒト	I	完全	81.82	68.60
		FRのみ	85.06	75.86

20

また、マウスAct-1可変領域は、マウスおよびヒト可変領域の記録されたすべての例の個々の配列とも比較した（カバット（Kabat, E.A.）ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局（1991）；UW GCGパッケージ（ウイスコンシン大学））。ヒト抗体配列に関して、マウスAct-1軽鎖可変領域は、ヒト抗体GM607'CL（クロベック（Klobeck, H.-G.）ら、Nature 309: 73-76 (1984)）由来のヒトカッパ軽鎖可変領域の配列と非常に類似していた。図5は、マウスAct-1軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：7）およびヒトGM607'CL軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：8）のアラインメントを示す。予想されたように、ヒトGM607'CLの軽鎖可変領域は、ヒトカッパ軽鎖可変領域のサブグループIIのメンバーである。マウスAct-1およびヒトGM607'CL軽鎖可変領域間の全体の配列同一性は、71.4%であると計算された。マウスAct-1重鎖可変領域は、ヒト抗体21/28'CL（デルシモニア（Dersimonian, H.）ら、J. Immunol. 139: 2496-2501 (1987)）由来のヒト重鎖可変領域の配列と非常に類似していた。図6は、マウスAct-1重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：9）およびヒト21/28'CL重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：10）のアラインメントを示す。予想されたように、ヒト21/28'CLの重鎖可変領域は、ヒト重鎖可変領域のサブグループIのメンバーである。マウスAct-1およびヒト21/28'CL重鎖可変領域間の全体の配列同一性は、68.1%であると計算された。これらの比較に基づき、ヒトGM607'CL軽鎖可変領域を、再形成ヒトAct-1軽鎖可変領域の設計に関するヒト鋳型として選択し、ヒト21/28'CLの重鎖可変領域を、再形成ヒトAct-1重鎖可変領域の設計に関するヒト鋳型として選択した。

30

設計過程の第2の工程は、選択されたヒト軽鎖および重鎖可変領域に齧歯類CDRを挿入することであった。カバット（Kabat, E.A.）ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局（1991）により規定されたように、齧歯類CDR全体をヒトFRに結合して単純なCDR接合部を作製した。いくつかの場合において、単純なCDR接合でヒト化される齧歯類抗体は、抗原に対してほとんどまたは全く結合を示さないであろう。これらのアミノ酸残基のいずれが、抗原との相互作用を介して直接的にまたはCDRループの配置を変化させることにより間接的に、

40

50

抗原への結合に反する影響を及ぼすと考えられるかどうかを決定するために、ヒトF Rのアミノ酸配列を研究することが重要である。

第3の工程において、ヒトF Rのアミノ酸残基を抗原への良好な結合を達成するために変えるべきかに関する決定がされた。この段階で、齧歯類可変領域のモデルが設計過程において最も有用になる。また、ショチアラ、Nature 342:877-883 (1989) により規定されたように、CDRの標準構造も有用である。該標準構造の一部である齧歯類アミノ酸残基のいずれかをヒト化可変領域中に保存することが重要である。ある位置のアミノ酸が異常であるかまれであるかを決定するためには、ヒト化対象の齧歯類抗体の配列を他の齧歯類抗体由来の類似の配列と比較することが役に立つ。これは、その位置での齧歯類アミノ酸が抗原結合に重要な役割を有することを示唆するであろう。齧歯類可変領域のモデルを研究することにより、特定の位置のアミノ酸が抗原結合に影響を及ぼしうるか否かを予想することが可能である。個々のヒト抗体由来のヒト可変領域を設計の基礎として用いられつつあるとき、そのときは、個々のヒト配列をヒト可変領域のそのサブグループのコンセンサス配列と比較することが望ましい。特に異常なアミノ酸はいずれも注意すべきである。ほとんどの場合、ヒト可変領域中のその位置に存在するアミノ酸から齧歯類可変領域中のその位置に存在するアミノ酸に変えるべきヒトF Rにおけるいくつかのアミノ酸が同定される。

表3および4は、再形成ヒトA c t - 1可変領域がどのように設計されたかを要約する。

表3は、再形成ヒトm A b A c t - I V<sub>L</sub>領域の設計に用いたアミノ酸配列のアライメントであり、4列にはヒト化対象のマウスA c t - 1軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号: 7)、5列(マウス - II)にはマウスA c t - 1可変領域が属するマウス可変領域のサブグループに関するコンセンサス配列(配列番号: 50)、6列(ヒト - II)にはマウスA c t - 1可変が最も類似するヒト可変領域のサブグループに対するコンセンサス配列(配列番号: 51)、7列には鑄型として供する(即ち、G M 6 0 7 ' C L)ヒト可変領域のアミノ酸配列(配列番号: 8)および8列(A c t - I R H V)には設計された再形成ヒトA c t - 1可変領域のアミノ酸配列(配列番号: 52)を掲載する。表4は、再形成ヒトm A b A c t - I V<sub>H</sub>領域の設計に用いたアミノ酸配列のアライメントであり、4列にはヒト化対象のマウスA c t - 1重鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号: 9)、5列(マウスII B)にはマウスA c t - 1可変領域が属するマウス可変領域のサブグループに対するコンセンサス配列(配列番号: 53)、6列(ヒトI)にはマウスA c t - 1が最も類似するヒト可変領域のサブグループに対するコンセンサス配列(配列番号: 54)、7列には鑄型として供する(即ち、2 1 / 2 8 ' C L)ヒト可変領域のアミノ酸配列(配列番号: 10)および8列(A c t - I R H V<sub>H</sub>)には設計された再形成A c t - 1可変領域のアミノ酸配列(配列番号: 55)を掲載する。表3および4の終わりから2番目の列は、マウスA c t - 1と選択されたヒトF Rとの間で異なる残基のF Rにおける位置(表面または埋没)を示す。表3および4の最後の列は、可変領域中のその位置に関連したコメントを掲載する。

表3において、以下の印を用いる: (\*)カバット(Kabat)コンセンサス配列即ち、カバットサブグループ内の95%以上の出現(カバット(Kabat,E.A.)ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991))(5列および6列の場合)、またはショチアラ、Nature 342:877-883(1989)により規定されたようなCDRループ(5列および6列の場合)に対する規定構造の一部としてもしくはCDRループ(8列の場合)に対する規定構造の一部としてのいずれかにより規定された非変異残基;(太字)ヒトアミノ酸残基が対応するマウス残基により置換されたF RおよびCDRでの位置;(下線)ヒト残基が類似のマウス残基番号と異なるF Rでの位置;( )ヒトF Rでの変化の番号付け;(マウス A b A c t - 1)マウスA c t - 1抗体由来のV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列;(マウス - II)サブグループII由来のマウスカッパV<sub>L</sub>領域のコンセンサス配列(カバットら、前述)(ヒト - II)サブグループII由来のヒトカッパV<sub>L</sub>領域のコンセンサス配列(カバットら、前述);(G M 6 0 7 ' C L)ヒトG M 6 0 7 ' C L抗体由来のアミノ酸配列(クロベックら、Nature 309:7

10

20

30

40

50

3-76 ( 1984 ) ) ; ( 表面または埋没 ) 抗体可変領域の両鎖における残基の残りに関連したアミノ酸の位置 ; ( A c t - I R H V<sub>K</sub> ) 再形成ヒト m A b A c t - I V<sub>L</sub> 領域のアミノ酸配列。

表3 再形成ヒト m A b A c t - I V<sub>L</sub> 領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-IまたはRH V <sub>K</sub>	表面または埋没	コメント
1	1	FR1	D	D*	D	D			
2	2	1	V	I*	I	V	埋没	L1ノープに対する標準AA (△1)	
3	3	1	V	V*	V	V			
4	4	1	V	M	M	M	埋没	L1とL2の間で埋没。 マウスκ-IIでは V=9/245, M=202/245。 M=42/45, ヒト κ-IIではVはみられ ない。	結合が弱い場合第2 ページョンでこれを Vailに変えること を考慮。
5	5	1	T	T*	T*	T	T		
6	6	1	Q	Q*	Q*	Q	Q		
7	7	1	T	T	S	S	表面	結合部位(BS)に 達位。	
8	8	1	P	P	P*	P	P		
9	9	1	L	L	L*	L	L		

10

20

30

40

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>L</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアラインメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH V <sub>K</sub>	表面または埋没	コメント
10	10		S	S*	S	S	S		
11	11		L	L*	L	L	L		
12	12		P	P	P	P	P		
13	13		V	V*	V*	V	V		
14	14		S	S	T*	T	T	表面	BSに達位。 マウスκ-IIでは S=151/248。 ヒトκ-IIでは Tのみ(30/30) みられる。
15	15		F	L	P	P	P	表面	BSに達位。 マウスκ-IIでは F=9/253。 ヒトκ-IIではFは みられない。 ヒトκ-IIでは P=29/31。
16	16		G	G*	G	G	G	表面	
17	17		D	E	E	E	E	表面	BSに達位。 E=18/30。 ヒトκ-IIではDは みられない。
18	18		Q	Q	P*	P	P	表面	BSに達位でターン 上。 ヒトκ-IIではP のみ(31/31) みられる。

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>l</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアランメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH VK	表面または埋没	コメント
19	19		V	A	A*	A	A	埋没	コア内へ向くが標準マウスからヒトに変化。
20	20		S	S*	S*	S	S	埋没	マウスκ-IIではV=6.6./2.5.3, A=1.87./2.5.3。ヒトκ-IIではAのみ(3.0./3.0)みられる。
21	21		I	I*	I*	I	I	埋没	
22	22		S	S*	S*	S	S	埋没	
23	23	FR1	C	C*	C*	C	C	埋没	
24	24	CDR1	R	R	R	R	R	埋没	
25	25		S	S*	S*	S	S	埋没	
26	26		S	S*	S*	S	S	埋没	
27	27		Q	Q	Q	Q	Q	埋没	ヒトループに対する標準AA。
27A	28		S	S	S	S	S	埋没	ヒトループに対する標準AA。
27B	29		L	L	L*	L	L	埋没	ヒトループに対する標準AA。

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>l</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(焼き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH V <sub>K</sub>	表面または埋没	コメント
27C	30		A	V	L	L	A		L1ループに対する標準AA。
27D	31		K	H	H	K			L1ループに対する標準AA。
27E	32		S	S	S	S			L1ループに対する標準AA。
27F			-	-	X	-	-		
28	33		Y	N	D	N	Y		L1ループに対する標準AA。
29	34		G	G*	G	G			L1ループに対する標準AA。
30	35		N	N	N	Y	N		L1ループに対する標準AA。
31	36		T	T*	N	N	T		L1ループに対する標準AA。
32	37		Y	Y*	Y*	Y	Y		L1ループに対する標準AA。
33	38		L	L*	L*	L	L		L1ループに対する標準SS。
34	39	CDR1	S	E	N	D	S		バックティングAA。異常(117/1365)。ここではA, HおよびNが最も一般にみられる。

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>l</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH V <sub>K</sub>	裏面または埋没	コメント
35	40	FR2	W	W*	W	W			
36	41		Y	Y	Y	Y			パッキングAA。 最も一般的なAA。
37	42		L	L*	L	L			
38	43		H	Q*	Q	Q	埋没		パッキングAA。 Hは異常(31/1312)° Qは最も一般的なAA (1158/1312)°。
39	44		K	K	K	K			
40	45		P	P*	P	P			
41	46		G	G*	G*	G			
42	47		Q	Q*	Q	Q			
43	48		S	S*	S	S			
44	49		P	P*	P*	P			パッキングAA。 最も一般的なAA。
45	50		Q	K	Q	Q			

10

20

30

40

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>1</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH V <sub>K</sub>	表面または埋没	コメント
46	51		L	L	L	L			パッキングAA。 最も一般的なAA。
47	52		L	L*	L	L			
48	53		I	I*	I*	I	I		L2ループに 対する標準AA。
49	54	FR2	Y	Y	Y*	Y	Y		
50	55	CDR2	G	K	L	L	G		L2ループに 対する標準AA。
51	56		I	V	V	G	I		L2ループに 対する標準AA。
52	57		S	S*	S*	S	S		L2ループに 対する標準AA。
53	58		N	N	N	N	N		
54	59		R	R	R*	R	R		
55	60		F	F	A	A	F		
56	61	CDR2	S	S*	S*	S	S		
57	62	FR3	G	G*	G*	G	G		
58	63		V	V*	V*	V	V		
59	64		P	P	P*	P	P		
60	65		D	D*	D	D	D		
61	66		R	R*	R	R	R		

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>L</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH V <sub>K</sub>	裏面または埋没	コメント
62	67	—	F	F*	F*	F	F		
63	68	—	S	S	S*	S	S		
64	69	—	G	G*	G	G	G		
65	70	—	S	S*	S*	S	S		
66	71	—	G	G*	G*	G	G		
67	72	—	S	S*	S	S	S		
68	73	—	G	G*	G	G	G		
69	74	—	T	T*	T*	T	T		
70	75	—	D	D	D	D	D		
71	76	—	F	F*	F*	F	F		
72	77	—	T	T*	T*	T	T		
73	78	—	L	L*	L*	L	L		
74	79	—	K	K	K	K	K		
75	80	—	I	I*	I*	I	I		
76	81	—	S	S	S	S	S		

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>l</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(焼き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH V <sub>K</sub>	表面または埋没	コメント
77	82		T	R*	R	R		表面	BSに遠位。 マウスκ-IIでは T=6/221, R=211/221。 R=11/12, Tはヒトκ-IIでは みられない。
78	83		I	V	V*	V	Y	埋没	コアに向くが 標準マウスから ヒトに変化。 マウスκ-IIでは I=6/213, V=195/213。 Vのみ(12/12) ヒトκ-IIで みられる。
79	84		K	E	E	E	E	表面	BSに遠位。 マウスκ-IIでは K=20/215, E=191/215。 E=9/12, Kは ヒトκ-IIではみら れない。
80	85		P	A*	A	A	A	表面	BSに遠位。 マウスκ-IIでは P=6/183, A=175/183。 ヒトκ-IIでは P=1/12, A=11/12。

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>l</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH VK	表面または埋没	コメント
81	86		E	E*	E	E	E		
82	87		D	D*	D	D	D		
83	88		L	V*	V	V	V	半分埋没 BSに遠位。 Vのみ(12/12) ヒトκ-IIでみられる。	
84	89		G	G*	G*	G	G		
85	90		M	V	V*	V	V	半分埋没 BSに遠位。 マウスκ-IIでは M=6/212。 V=196/212。 Vのみ(12/12) ヒトκ-IIでみられる。	
86	91		Y	Y*	Y*	Y	Y		
87	92		Y	Y	Y*	Y	Y	パッキングAA。 最も一般的なAA。	
88	93	FR3	C	C*	C*	C	C		
89	94	CDR3	L	F	M*	M	L	パッキングAA。 Lは異常(93/1238)。 Qは最も一般的な AA(654/1238)。	
90	95		Q	Q*	Q	Q	Q	L3ループに 対する標準AA。	

10

20

30

40

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>l</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスAct-1	ヒトII	ヒトII	GM 607 CL	Act-1またはRH V <sub>K</sub>	表面または埋没	コメント
91	96	l	G	G	A	A	G			L3/パッキングAAに対する標準。第3の最も一般的なAA。
92	97	l	T	T	L	L	T			L3ループに対する標準AA。
93	98	l	H	H	Q	Q	H			L3ループに対する標準AA。
94	99	l	Q	V	X	X	Q			L3ループに対する標準AA。
95	100	l	P	P*	P	P	P			L3ループに対する標準AA。
95A		-	P	R*	-	-	-			
95B		-	-	-	-	-	-			
95C		-	-	-	-	-	-			
95D		-	-	-	-	-	-			
95E		-	-	-	-	-	-			
95F		-	-	-	-	-	-			
96	101	l	Y	Y	X	X	Y			パッキングAA。第2の最も一般的なAA。
97	102	CDR3	T	T*	T*	T	T			L3に対する標準。

10

20

30

40

表3 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>1</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスκ-II	ヒトκ-II	GM 607 CL	Act-1またはRH V <sub>K</sub>	表面または埋没	コメント
98	103	FR4	F	F*	F*	F	F		バックティングAA。 最も一般的なAA。
99	104	—	G	G*	G*	G	G		
100	105	—	G	G	Q	Q	Q	半分埋没	BSに遠位。 ヒトκ-IIでは Q=1/2/1/3, G=1/1/2。
101	106	—	G	G*	G*	G	G		
102	107	—	T	T*	T*	T	T		
103	108	—	K	K*	K	K	K		
104	109	—	L	L*	V	V	V	半分埋没	BSに遠位。 ヒトκ-IIでは L=5/14, V=9/14。
105	110	—	E	E*	E	E	E		
106	111	—	I	I	I*	I	I		
106A	—	—	—	—	—	—	—		
107	112	FR4	K	K*	K	K	K		

表4において、以下の印を用いる：(\*)カバット(Kabat)コンセンサス配列即ち、カバットサブグループ内の95%以上の出現(カバット(Kabat,E.A.)ら、Sequences of P 50

roteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局（1991）（5列および6列の場合）、またはショチアラ、Nature 342:877-883（1989）により規定されたようなCDRループ（8列の場合）に対する規定構造の一部としてのいずれかにより規定された非変異残基；（太字）ヒトアミノ酸残基が対応するマウス残基により置換されたFRおよびCDRでの位置；（下線）ヒト残基が類似のマウス残基番号と異なるFRでの位置；（）ヒトFRでの変化の番号付け；（マウス Ab Act-1）マウスAct-1抗体由来のV<sub>H</sub>領域のアミノ酸配列；（マウスIIb）サブグループIIb由来のマウスV<sub>H</sub>領域のコンセンサス配列（カバットら、前述）；（ヒトI）サブグループI由来のヒトV<sub>H</sub>領域のアミノ酸配列（カバットら、前述）；（ヒト21/28'CLヒト21/28'CL抗体由来のアミノ酸配列（デルシモニアンら、J. Immunol. 139: 2496-2501（1987））；（表面または埋没）抗体可変領域の両鎖における残りの残基に関連したアミノ酸の位置；（Act-I RH V<sub>H</sub>）再形成ヒトmAb Act-I V<sub>H</sub>領域のアミノ酸配列。 10

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>H</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスHB	ヒトI	ヒトDナ- 21/28CL	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または 埋没	コメント
1	1	FR1	Q	Q	Q	Q	Q		
2	2		V	V*	V	V	V		
3	3		Q	Q*	Q*	Q	Q		
4	4		L	L*	L*	L	L		
5	5		Q	Q	V	V	V	表面	結合部位(BS)に 遠位。
6	6		Q	Q	Q	Q	Q		マウスⅡBでは Q=135/143。 ヒトIでは V=49/53。 Q=1/53。
7	7		P	P	S*	S	S	半分埋没	BSに遠位。 マウスⅡBでは P=102/150。 ヒトIではPは みられない。
8	8		G	G*	G*	G	G		
9	9		A	A	A	A	A		
10	10		E	E	E	E	E		
11	11		L	L*	V	V	V	表面	BSに遠位。 ヒトIでは V=50/54。 L=4/54。

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>n</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアラインメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	マウスIIIB	ヒトI	ヒトDナー	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または埋没	コメント
12	12		V	V*	K	K	K	K	埋没	コア内へ向くが標準マウスからヒトに変化。 ヒトIではK=41/55, V=3/55。
13	13		K	K	K*	K	K	K		
14	14		P	P*	P*	P	P	P		
15	15		G	G*	G*	G	G	G		
16	16		T	A	A	A	A	A	表面	BSに遠位。 マウスII BではT=12/139, A=117/139。 ヒトIではT=1/52 A=23/52。
17	17		S	S*	S*	S	S	S		
18	18		V	V*	V	V	V	V		
19	19		K	K	K	K	K	K		

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>κ</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	ヒトI	ヒトドナー21/28CL	Act-1 RH <sub>VH</sub>	表面または埋没	コメント
20	20	-	L	V	V	V	Act-1 RH <sub>VH</sub>	埋没	コア内へ向くが標準マウスからヒトに変化。 マウスII BではL=138/179。 ヒトIではV=36/52。 L=1/52。
21	21	-	S	S*	S	S	S	表面	
22	22	-	C	C*	C	C			
23	23	-	K	K*	K	K			
24	24	-	G	A*	A	G		埋没	H1ループに対する標準AA(△1)。 GはマウスII Bではみられない。 ヒトIではG=12/51。 A=34/51。
25	25	-	Y	S*	S*	S	S	表面	B Sから離れた方へ向き、抗原(Ag)結合しないと思われる。 マウスII BではY=1/185。 S=48/50。 YはヒトIではみられない。

10

20

30

40

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>n</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	ヒトI	ヒトドナー21/28CL	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または埋没	コメント
26	26		G	G*	G	G			H1ループに対する標準AA。
27	27		Y	Y	Y	Y			H1ループに対する標準AA。
28	28		T	T	T	T			H1ループに対する標準AA。
29	29		F	F*	F	F			H1ループに対する標準AA。
30	30	FR1	T	T	T	T			H1ループに対する標準AA。
31	31	CDR1	S	S	S	S			H1ループに対する標準AA。
32	32		Y	Y	Y	Y			H1ループに対する標準AA。
33	33		W	W	A	A	W		
34	34		M	M	I	M			H1ループに対する標準AA。
35	35		H	H	S	H	H		パッキングAA。 最も一般的なAA。
35A			-	-	-	-			
35B		CDR1	-	-	-	-			
36	36	FR2	W	W*	W*	W	W		

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>n</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	ヒトI	ヒトDナーヒト21/28CL	Act-1 RH V <sub>II</sub>	表面または埋没	コメント
37	37	-	V	V	V	V			パッキングAA。 最も一般的なAA。
38	38	-	K	K	R*	R	R	埋没	コア内へ向くが標準マウスからヒトに変化。 マウスIIBでは $K=1.77/1.88$ 。 $R=4.8/4.9$ 。 KはヒトIではみられない。 しかし、Ly sはH2ループをパッキングするであろうから、結合が弱い場合A40Rとともに第2バージョンで変えることを考慮。
39	39	-	Q	Q	Q*	Q	Q		パッキングAA。 最も一般的なAA。

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>H</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	ヒトI	ヒトドナー-21/28CL	Act-1 RH <sub>V<sub>H</sub></sub>	表面または埋没	コメント
40	40	-	R	A	A	A			コア内へ向くが標準マウスからヒトに変化。マウスⅡBではR=160/177。ヒトIではA=37/49, R=0/49。しかし、ArgはH2ループをパッキングするであろうから、結合が弱い場合A38Kとともに第2バージョンで考えることを考慮。
41	41	-	P	P	P	P	P		
42	42	-	G	G	G	G	G		
43	43	-	Q	Q	Q	Q	Q		
44	44	-	G	G	G	R	R	埋没	コア内へ向くが標準マウスからヒトに変化。ヒトIではG=43/48, R=5/48。

10

20

30

40

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>H</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	ヒトI	ヒトドナー21/28CL	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または埋没	コメント
45	45		L	L*	I*	L	L		パッキングAA。 最も一般的なAA。
46	46		E	E*	E*	E	E		パッキングAA。 最も一般的なAA。
47	47		W	W*	W*	W	W		パッキングAA。 最も一般的なAA。
48	48		I	I*	M	M	I	埋没	Ileは隠れて H2ループを支える (△2)。 ヒトIでは Met=41/48. Ile=1/48。
49	49	FR2	G	G*	G	G	G		
50	50	CDR2	E	R	W	W	E		
51	51		I	I	I	I	I		
52	52		D	D	N	N	D		
52A	53		P	P*	P	A	P		H2ループに対する 標準AA。
52B			-	-	Y	-			
52C			-	-	-	-			
53	54		S	N	G	G	S		H2ループに対する 標準AA。

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>H</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIB	ヒトI	ヒトDナーナー	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または埋没	コメント
54	55		E	S	N	21/28CL	E		H2ループに対する標準AA。
55	56		S	G	G		S		H2ループに対する標準AA。
56	57		N	G	D		N		
57	58		T	T	T		T		
58	59		N	N	N		K	N	
59	60		Y	Y	Y		Y	Y	
60	61		N	N	A		S	N	
61	62		Q	E	Q		Q	Q	
62	63		K	K*	K		K	K	
63	64		F	F*	F		F	F	
64	65		K	K	Q		Q	K	
65	66	CDR2	G	S	G		G	G	
66	67	FR3	K	K*	R		R	表面	BSに埋没。 R=39/49, KはヒトIでは みられない。
67	68		A	A*	V		V	半分埋没	BSに埋没。 V=45/48, AはヒトIでは みられない。
68	69		T	T*	T		T	T	

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>n</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	TRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	ヒトI	ヒトドナー	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または埋没	コメント
69	70		L	L*	I	I	L	埋没	L e uは離れてH2ループを支える(△3)。 ヒトIではI l e=2 6/4 9, L e u=1/4 9。
70	71		T	T*	T	T	T	埋没	
71	72		V	V	A	R	V	埋没	H2ループに対する標準AA(△4)。
72	73		D	D*	D	D	D		
73	74		I	K	T	T	I	表面	H2ループの背後でA g結合に直接役割を果たすであろう(△5)。 I l eはマウスII BまたはヒトIでみられない。 ヒトIではT=2 1/4 9。
74	75		S	S	S*	S	S		
75	76		S	S*	T	A	A	表面	B Sに選位。 T=2 6/5 0, A=4/5 0, SはヒトIではみられない。
76	77		S	S	S	S	S		
77	78		T	T*	T	T	T		

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>h</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアランメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	ヒトI	ヒトドナー	Act-1 RH <sub>V<sub>h</sub></sub>	表面または埋没	コメント
78	79	—	A	A	A	A			
79	80	—	Y	Y*	Y	Y			
80	81	—	M	M	M	M			
81	82	—	Q	Q	E	E		半分埋没	B Sに遺位。 マウスII Bでは Q=163/194。 ヒトIでは E=35/50, Q=11/50。
82	83	—	L	L*	L	L	L		
82A	84	—	S	S	S	S	S		
82B	85	—	S	S	S	S	S		
82C	86	—	L	L*	L*	L	L		
83	87	—	T	T*	R	R	R	表面	B Sに遺位。 ヒトIでは R=33/51, T=4/51。
84	88	—	S	S*	S	S	S		
85	89	—	E	E	E	E	E		
86	90	—	D	D*	D*	D	D		

10

20

30

40

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>h</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス HB	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または 埋没	コメント
87	91	1	S	S*	T	T	T	表面	BSに適位。 ヒトIでは T=48/51, S=2/51。
88	92	1	A	A*	A	A	A		
89	93	1	V	V*	V	V	V		
90	94	1	Y	Y*	Y*	Y	Y		
91	95	1	Y	Y	Y	Y	Y		パッキングAA。 最も一般的なAA。
92	96	1	C	C*	C*	C	C		
93	97	1	A	A	A*	A	A		パッキングAA。 最も一般的なAA。
94	98	FR3	R	R	R	R	R		H1ループに対する 標準AA。
95	99	CDR3	G	Y	A	G	G		パッキングAA。 このがイントで みられる第2の もっとも一般的 な残基-OK。
96	100	1	G	Y	P	-	G		
97	101	1	Y	Y	G	-	Y		
98	102	1	D	G	Y	-	D		

10

20

30

40

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>n</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウス Act-1	マウス IIB	ヒト I	ヒトドナー	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または 埋没	コメント
99	103	I	G	G	G	G	G		
100	104	I	W	S	-		W		
100A	105	I	D	S	G		D		
100B	106	I	Y	X	G	-	Y		
100C	107	I	A	X	G	-	A		
100D	108	I	I	V	C	-	I		パッキングAA。 I=26/1211。 FおよびMが最も 一般的にみられる。
100E		-	-	Y	Y	-			
100F		-	-	X	R	Y			
100G		-	-	-	G	Y			
100H		-	-	Y*	D	G			
100I		-	-	W	Y	S			
100J		-	-	Y	X	G			
100K		I	-	F	F	S			
101	109	I	D	D	N	D			
102	110	CDR3	Y	Y	Y	Y	Y		
103	111	FR4	W	W*	W*	W	W		パッキングAA。 最も一般的なAA。

10

20

30

40

表4 再形成ヒトmAb Act-1 V<sub>H</sub>領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント(続き)

Kabat	#	FRまたはCDR	マウスAct-1	マウスIIB	ヒトI	ヒトドナー	Act-1 RH V <sub>H</sub>	表面または 埋没	コメント
104	112	—	G	G*	G	G	G		
105	113	—	Q	Q	Q	Q	Q		
106	114	—	G	G*	G*	G	G		
107	115	—	T	T*	T	T	T		
108	116	—	S	T	L	L	L	表面	BSに選位。 マウスII Bでは T=8.8/14.9。 ヒトIでは L=2.5/3.9, T=7/3.9。
109	117	—	V	V	V*	V	V	V	
110	118	—	T	T*	T	T	T		
111	119	—	V	V*	V	V	V		
112	120	—	S	S*	S*	S	S		
113	121	FR4	S	S	S*	S	S	S	

再形成ヒトAct-1軽鎖可変領域の設計(表3)に関して、ヒトFRの1つの残基がヒトFRに存在するアミノ酸から元のマウスFRに存在するアミノ酸に変化した。この変化

は、FR1の2位であった（カバット（Kabat,E.A.）ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局（1991）により規定されたように）。特に、ヒトGM607'CL軽鎖可変領域で見られるイソロイシンがマウスAct-1軽鎖可変領域で見られるようなバリンに変化した。カッパ軽鎖可変領域でのこの位置は、L1ループの正しい方向と構造に厳密な位置の1つとして、ショチアラ、Nature 342:877-883（1989）により同定され、それ自体、「標準アミノ酸」の1つとして知られている。ループコンフォメーションにおける重要な役割のため、かかるマウス枠組み残基は、再形成可変領域で一般にいつも保存されている。

FR1の4位では、マウス配列においてバリンおよびヒト配列においてメチオニンが存在する。バリンからメチオニンへの変化は、両アミノ酸が非極性で、疎水性残基であるので、それ自体ドラスティックな変化ではなく、したがって、ヒト配列に存在するメチオニンを再形成ヒトAct-1可変領域に使用した。しかしながら、該モデルは、バリンがL1ループとL2ループとの間に埋もれており、蛋白質に埋もれた場合のバリンの平均体積は142<sup>3</sup>であることを示唆するが、一方、メチオニンは約171<sup>3</sup>の空間を占める。より大きなメチオニン残基は、L1ループとL2ループのいずれかまたは両方のコンフォメーション変化を生じさせうるであろう。再形成ヒトAct-1の抗原結合は、再形成ヒトAct-1軽鎖可変領域において4位のメチオニンからバリンへの追加の変化により改良されてもよい。

再形成ヒトAct-1重鎖可変領域の設計（表4）に関して、ヒトFRに存在するアミノ酸から元のマウスFRに存在するアミノ酸に変化したヒトFRの5つの残基が存在した。FR1の24位およびFR3の71位では（カバット（Kabat,E.A.）ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局（1991）により規定されたように）、これらの位置はそれぞれH1ループとH2ループの標準構造の一部である（ショチアラ、Nature 342:877-883（1989））、マウス配列に存在するようなアミノ酸残基が再形成ヒトAct-1重鎖可変領域に保持されていた。これらの位置でのいかなるアミノ酸変化もH1ループとH2ループのパッキングと最終的な構造を破壊しうるので、これらの厳密な位置でのマウス残基は、ヒト化重鎖可変領域で定型的に保存されている。

FR2の48位では、ヒト配列のメチオニンがマウスAct-1配列に存在するようなイソロイシンに変化した。イソロイシンをメチオニンに置換することは異常である。より重要なことには、該モデルは、イソロイシン残基がH2ループの下に隠れて埋もれていることを示す。結論として、この埋もれた位置での変化は、H2ループの構造に影響を及ぼし、故に抗原結合を妨害したかもしれない。

FR3の69位では、ヒト配列のイソロイシンがマウスAct-1配列に存在するようなロイシンに変化した。イソロイシンをロイシンに置換することは異常ではないけれども、該モデルは、ロイシンがH2ループの下に埋もれていることを示す。結論として、48位の残基のように、この位置での変化は、H2ループのコンフォメーションに影響を及ぼし、それにより抗原結合を破壊しうるだろう。

最後に、FR3の73位では、ヒト配列のスレオニンがマウス配列に存在するようなイソロイシンに変化した。FR3のこの位置でのイソロイシンは、マウスサブグループII BまたはヒトサブグループIでこれまで見られたことがなく（カバット（Kabat,E.A.）ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局（1991）により規定されたように）、このことは、この位置のイソロイシンが抗原結合に重要な役割を有するかもしれないことを示唆する。

該モデルにおいて、73位のロイシンが結合部位の縁近辺の表面上に存在するようであり、47インテグリンのエピトープの大きさと方向に応じて抗原結合に直接の役割を果たす可能性があるだろう。しかしながら、表面残基の位置として、抗体全体は、もしマウスアミノ酸が再形成ヒト抗体に存在しないならば、より低い免疫原性ポテンシャルを有するだろう。イソロイシンは、再形成抗体誘導体においてヒトスレオニン残基に置換でき、新規な構築物を再試験して、2番目のバージョンが類似のレベルの抗原結合を維持するか

10

20

30

40

50

どうかを決定した。

再形成ヒト A c t - 1 重鎖可変領域の元の設計でなされたヒト F R での 5 つの変化に加え、抗原結合を改良するかもしれない 2 つの別の変化が存在した。該モデルは、マウス m A b A c t - 1 の重鎖可変領域の 3 8 L y s および 4 0 A r g 残基が H 2 ループの下に隠れて位置し、C D R 2 の 6 3 P h e に近接してパッキングすることを示唆する（表 4 と同じ番号付け）。しかしながら、これらの残基も重鎖可変領域の核に位置し、それらがそれらの対応するヒトアミノ酸（各 3 8 A r g および 4 0 A l a ）を置換するために用いられるならば、他の有害な効果を有するかもしれないであろう。したがって、F R 2 の 3 8 位と 4 0 位に対する変化は、m A b A c t - 1 の再形成ヒト重鎖可変領域に取り込まれなかった。しかしながら、再形成重鎖の修飾のいずれかまたは両方を誘導体に用いて抗原結合を改良してもよい。

#### 結論

マウス A c t - 1 可変領域のモデルは、主に他の抗体可変領域の溶解した構造に基づいて作られた。該モデルをヒト化 A c t - 1 可変領域の設計に用いた。再形成ヒト可変領域の抗原結合部位の構造を保持することに特に重点を置いた。

再形成ヒト A c t - 1 軽鎖可変領域および再形成ヒト A c t - 1 重鎖可変領域を設計した（表 3 および 4 ）。再形成ヒト A c t - 1 軽鎖可変領域は、マウス A c t - 1 軽鎖可変領域の C D R およびヒト G M 6 0 7 ' C L 抗体の軽鎖可変領域由来の F R を基礎とした。1 つのアミノ酸変化がヒト F R の 2 位でなされた。再形成ヒト A c t - 1 重鎖可変領域は、マウス A c t - 1 重鎖可変領域の C D R およびヒト 2 1 / 2 8 ' C L 抗体の重鎖可変領域由来の F R を基礎とした。5 つのアミノ酸変化がヒト F R の 2 4 、 4 8 、 6 9 、 7 1 および 7 3 位でなされた。

さらに、再形成ヒト A c t - 1 可変領域のさらなるバージョンの設計に考慮されるであろうカッパ軽鎖の F R 1 の 4 位の 1 つの部位ならびに重鎖の F R 2 の 3 8 および 4 0 位の 2 つの部位が注目された。また、抗体の表面上の位置という観点から、重鎖の F R 3 の 7 3 位の 1 つの残基もマウスからヒトアミノ酸への復帰突然変異の候補として同定された。

#### 実施例 3 再形成可変領域をコードする核酸の構築

正しい重鎖および軽鎖可変領域が生物化学的に（部分アミノ酸配列）および機能的に（H u T 7 8 細胞のキメラ抗体染色）クローニングされたことを確認した後、再形成アミノ酸配列を前記のように設計した。次に、再形成抗体鎖をコードする遺伝子を設計して調製した。

#### ヒト化 A C T - 1 の設計、構築および発現

実施例 2 に記載のようにヒト化抗体の一次アミノ酸配列を決定した後、該配列を縮重核酸配列に逆翻訳し、M a c V e c t o r (Kodak, Scientific Imaging Systems) 4 . 5 . 3 版を用いて可能性のある制限酵素部位を分析した。次いで、制限酵素切断部位を取り込むが一次アミノ酸配列を保存する核酸配列を選択した。サブクローニングに使用される注目の制限酵素部位を有する重鎖核酸配列（配列番号：1 8 ）およびアミノ酸配列（配列番号：1 9 ）を図 1 1 に示し、ならびに軽鎖核酸配列（配列番号：2 0 ）およびアミノ酸配列（配列番号：2 1 ）を図 1 2 に示す。

以下のようにして、ヒト化 A c t - 1 重鎖および軽鎖可変領域遺伝子を構築した。軽鎖に対して L 1 ~ L 6 （それぞれ配列番号：2 2 ~ 2 7 ）、重鎖に対して H 1 ~ H 1 0 （それぞれ配列番号：2 8 ~ 3 7 ）と称する重複した相補的なオリゴヌクレオチドを、A p p l i e d B i o s y s t e m s D N A S y n t h e s i z e r M o d e l 3 9 2 を用いて合成した（図 1 3 ）。5 5 ℃で一晩脱保護した後、オリゴを S p e e d - V a c で乾燥させ、1 0 0 m l の水に再懸濁させ、B i o - S p i n 6 カラム（Bio-Rad）で脱塩した。該オリゴの濃度は、2 6 0 n m で吸光度を測定することにより決定し、オリゴを変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。

各オリゴの 1 0 0 μ g を 2 倍容量の負荷色素（9 5 % ホルムアミド、2 0 m M E D T A 、0 . 0 5 % プロモフェノールブルー、0 . 0 5 % キシレンシアノール F F ）と混合し、6 5 ℃で 2 分間加熱し、1 X T B E 中で約 3 時間、2 5 0 V で泳動した。該ゲルを臭化

10

20

30

40

50

エチジウムで染色し、紫外線下で観察した。次いで、正しい長さのオリゴをゲルから切り出し、水とともに透析チューブに入れ、電気溶出させた。該オリゴを、等容量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1 v/v）（Gibco/BRL）で2回抽出し、0.1倍容量の3.0M 酢酸カリウム（pH 6）と2倍容量の冷エタノールの添加により沈澱させた。遠心分離後、ペレットを70%エタノールで1回洗浄し、真空乾燥させ、50 μlの水に再懸濁させた。

相補性オリゴを、等モル量（50 μlの水に約100 μg）の精製オリゴを等容量（100 μl）の2X アニーリング緩衝液（2X = 1M NaCl、pH 7.5の40 mM Tris-HCl、2 mM EDTA）と混合することによりアニーリングした。オリゴは、95まで10分間加熱することにより変性させた後、65で8時間インキュベーションした。次いで、アニーリングしたオリゴを、以前に記載のようにエタノール沈澱させ、40 μlの水に再懸濁した。

アニーリングしたオリゴの伸長は、2 μlのラージフラグメントDNAポリメラーゼI（Klenow）、5 μlの2.5 mM dNTPおよび5 μlの10X 緩衝液（10X = 10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、25でpH 7.9）を添加し、最終容量を52 μlまで上げることにより達成した。該混合物を室温で1時間インキュベートした。37で0.5時間のインキュベーションで1 μlのdNTPと1 μlのKlenowをさらに添加した。重鎖断片Aを伸長させる必要がなかったことに注目すること。

アニーリングして伸長した断片を、12%非変性ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動により一本鎖のアニーリングしていないものから精製した。該ゲルを臭化工チジウムで染色し、紫外線下で観察した。正しい長さの断片を切り出し、前記したように透析チューブ中の電気溶出により回収した。該断片を、等容量のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコールで2回洗浄し、エタノール沈澱し、10 μlの水に再懸濁させた。

3つの軽鎖断片（LA、LBおよびLC）ならびに5つの重鎖断片（HA～HEと称する）を、別々にpCR-Script<sup>TM</sup>にライゲートし、以下に記載したことを除いて、製造業者の推奨したプロトコールに従ってpCR-Scriptキット（Stratagene）を用いてXL-1 Blue Supercompetent Cellsに形質転換した。断片pCR-LAおよびpCR-LBは、制限酵素MscIでの消化を阻止するであろうDcmメチラーゼを避けるために、DM1（Gibco/BRL）コンピテント細胞に形質転換した。白色コロニーを拾い、製造業者の推奨したプロトコールに従ってSequence T7DNAポリメラーゼキットを用いてミニプレップDNAをシーケンスした。インサートのそれぞれ反対側にアニーリングするT3およびT7プライマーをシーケンスに用いた。

ヒト化重鎖可変領域および軽鎖可変領域断片の複雑サブクローニングは、合成の間に配列に取り込まれた特異的な制限部位を用いて達成された。重鎖断片HA～HDは、以下に記載するように断片の連続サブクローニングを可能にする、各配列の末端に追加のAgeI制限部位を含む。

pCR-HAおよびpCR-HB由来のミニプレップDNAを制限酵素SpeIとAgeIで消化した。DNAは、1%アガロースゲルで電気泳動した。141 bp断片HBを該ゲルから回収し、SpeIおよびAgeI部位でpCR-HAにライゲートし、pCR-HABが生じた。次に、112 bp断片HCを、XbaIとAgeIを用いてpCR-HCから放出させ、pCR-HABのXbaIおよびAgeI部位にライゲートし、プラスミドpCR-ACを得た。断片HD（141 bp）およびHC（130 bp）は、断片HDに対しては制限部位NheIおよびAgeIを、ならびに断片Eに対しては制限部位BstEIIおよびAgeIを用いて、同じ一連の様式でライゲートした。pCR-scriptにすべての5つの重鎖可変領域断片を含む最終プラスミドを、pCR-HAEと称した。すべての消化は、65の最適インキュベーション温度を有するBstEIIを用いる場合を除いて、37で少なくとも2時間のインキュベーションでミニプレップDNAを用いて行なった。ライゲーションは、1：10のベクター対インサート比でT4DNAリ

10

20

30

40

50

ガーゼを用いて 16 で一晩行ない、次の日に、製造業者の推奨したプロトコールに従つて D H 5 サブクローニング効率コンピテンツ細胞 (Gibco/BRL) に形質転換した。

p C R - S c r i p t <sup>TM</sup> 中の A c t - 1 ヒト化重鎖可変領域を、 p C R - H A E の H i n d I I I と A g e I での消化により放出させた。この 4 1 1 b p 断片を用いて、 H i n d I I I と A g e I で消化しておいた p E E 6 m h A C T 1 H c h i (実施例 1) のマウス可変領域配列を置換し、 p E E 6 h C M V - B にヒト化 A C T - 1 重鎖遺伝子を生成させた。得られたプラスミドを p E E 6 h A C T 1 H と称する。正しい D N A 配列は、シーケンスにより決定した。

p C R - S c r i p t <sup>TM</sup> 中の軽鎖断片 A を、 B s p E I と M s c I で消化した。次いで、この 1 5 3 b p 断片を用いて、 p C R - s c r i p t <sup>TM</sup> 中のマウス可変軽鎖の B s p E I から M s c I のマウス部分を置換した。このプラスミドを p C R - L h A m B C と称する。 M s c I と N r u I で消化した軽鎖断片 B および N r u I と K a s I で消化した軽鎖断片 C を、 p C R - L h A m B C の M s c I および K a s I 部位にトリプルライゲートし、残りのマウス配列を置換した。消化、ライゲーションおよび形質転換には、 D M 1 コンピテンツ細胞を最後の形質転換を除くすべてに使用することを除いて、前述したのと同じ手法を用いた。

p C R - S c r i p t <sup>TM</sup> 中のヒト化軽鎖可変領域およびプラスミド p E E 1 2 m h A C T 1 L c h i (実施例 1) を H i n d I I I と K a s I で消化した。3 6 0 b p 軽鎖可変領域断片および 3 1 5 b p 軽鎖定常領域をゲルで精製し、 p E E 1 2 の H i n d I I I 制限部位にトリプルライゲートし、 p E E 1 2 h A C T 1 L を得た。シーケンスを行ない、正しい方向および核酸配列を確認した。

ヒト化重鎖および軽鎖遺伝子の両方を含む発現ベクターは、以下の例外を除いて、キメラ抗体に関して記載されたのと同じ方法 (実施例 1、キメラ免疫グロブリンの発現を参照のこと) を用いて構築した。ヒト化可変重鎖領域の追加の B g 1 I I 制限部位により、 B g 1 I I での切断の際には部分消化を用いて正しい断片を得た。ヒト化重鎖および軽鎖遺伝子の両方を含むベクターを、 p E E 1 2 h A C T 1 L H と称する。

すべてのヒト化抗体構築物の一過性の発現および細胞染色は、キメラ抗体に用いられたものと同じプロトコールを用いて行なった (実施例 1、キメラ免疫グロブリンの発現を参照のこと)。図 14 は、無関係のアイソタイプ適合対照抗体 (I g G 1、カッパ) と比較して、マウス - ヒトキメラ A c t - 1 抗体またはヒト化 A c t - 1 抗体を用いる H u T 7 8 染色の結果を示す。

骨髄腫細胞株である N S O 細胞 (Methods in Enzymol. 73 (B) :3-46 (1981) ; ヨーロピアンコレクション・オブ・アニマルセルカルチャーズ、PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, U.K., ECACC No. 85110503) の安定なトランスフェクタントは、 N S O 細胞の p E E 1 2 h A C T 1 L H とのエレクトロポレーションにより得た。

#### N S O 細胞の安定な発現

安定なトランスフェクション用の 4 0  $\mu$  g の p E E 1 2 h A C T 1 L H を、構築物の細菌のプラスミド部分内を切断する S a 1 I 制限酵素での消化により線状にした。線状 D N A を、2 倍容量のエタノールと 1 / 1 0 倍容量の酢酸ナトリウムを用いて溶液から沈澱させ、7 0 % エタノールで洗浄し、乾燥させて滅菌水に再懸濁した。

対数増殖中の N S O 細胞は、非選択培地 (ダルベッコの改変イーグル培地 (高グルコース)、2 mM L - グルタミン含有、ピルビン酸ナトリウム不含、4 5 0 0 m g / L グルコースおよび 2 5 mM H E P E S 緩衝液 (GIBCO/BRL、カタログ番号 12430-021) 含有、1 0 % ウシ胎仔血清 (Gibco/BRL、カタログ番号 16000-044) を補足) で維持した。 N S O 細胞を遠心分離し、洗浄して、 D N A の添加後に該細胞が 1 0 <sup>7</sup> 細胞 / m l の濃度で存在するように、冷 P B S に再懸濁した。線状プラスミド D N A (4 0  $\mu$  g) を、氷上のエレクトロポレーションキュベット中の 1 0 <sup>7</sup> 個の細胞に加えた。該細胞と D N A を泡を生じさせないようにゆっくり混合させ、該混合物を氷上で 1 0 分間放置した。該キュベットの外側を拭いて乾燥させ、 G e n e P u l s e r (Bio-Rad) を用いて 1 5 0 0 V、3  $\mu$  F の 2 回の連続パルスを加えた。該キュベットを 1 0 分間氷上に戻した。

10

20

30

40

50

トランスフェクトした細胞を、 $50\mu\text{l}$ の非選択培地中 $3 \times 10^5$ 、 $7.5 \times 10^4$ および $1.5 \times 10^4$ 細胞/ $\text{m}^2$ の密度で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。その後、 $150\mu\text{l}$ の選択培地（グルタミン不含ダルベッコの変更イーグル培地、 $4500\text{mg/L}$ のグルコース含有、 $4\text{mg/L}$ のピリドキシンHC1含有、 $110\text{mg/L}$ のピルビン酸ナトリウム含有、硝酸鉄不含、L-グルタミン不含（JRH Biosciences、カタログ番号51435-78P）、 $1\text{X GS}$ サブルメント（JRH Biosciences、カタログ番号58672-77Pから入手した $50\text{X GS}$ サブルメント）と $10\%$ 透析ウシ胎仔血清（Gibco/BRL、カタログ番号26300-061）を補足）をすべてのウエルに添加した。該プレートを、実質的な細胞死が起り、不連続な生存コロニーが出現するまでインキュベーターに戻した。一旦グルタミン非依存性トランスフェクタントのコロニーが見られれば、シングルコロニーを有するウエルを選択し、消費した組織培養上清を回収し、以下に記載のようにELISAによりヒトIgG分泌をアッセイした。このようにして、その後の研究に用いた3A9と称する抗体産生クローニングを得た。第2のトランスフェクションは、選択をL-メチオニンスルホキシミン（MSX、グルタミンシテターゼインヒビター）の存在下で行なうことを除いて、前記したように行なった。

陽性のコロニーは、以下のようにしてヒトIgG分泌に対するELISAによりスクリーニングした。ELISAプレート（NUNC Maxisorp）を、炭酸塩緩衝液pH9.5中 $2.5\mu\text{g}/\text{m}^2$ で $100\mu\text{l}$ のAffiniPure F(ab')<sub>2</sub>断片ロバ抗ヒトIgG（H+L）（Jackson ImmunoResearch Laboratories）を用いて、4で一晩被覆した。プレートをPBS Tween 20で4回洗浄し、 $200\mu\text{l}$  PBS、1% BSAで、37で2時間ブロックした。プレートを洗浄し、 $100\mu\text{l}$ の安定なトランスフェクトNSOの上清で37で15分間インキュベートした。PBS 1% BSA中 $1\text{mg}/\text{m}^2$ のヒトIgG1カッパを標準として用いた。新鮮なNSO培地（DME+GSサブルメント）を陰性対照として用いた。プレートを洗浄し、PBS（Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>なし）中 $0.05\mu\text{g}/\text{m}^2$ で $100\mu\text{l}$ のペルオキシダーゼ結合AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>断片ロバ抗ヒトIgG（H+L）（Jackson ImmunoResearch Laboratories）を用いて、37で15分間インキュベートした。5mg O-フェニレンジアミンジヒドロクロリド（OPD）の1錠（Sigma）を $12\text{m}^2$ のクエン酸緩衝液（0.1M、pH 5.0）に溶解し、該錠剤が溶解した後、 $12\mu\text{l}$ の30%過酸化水素を加えた。洗浄して二次抗体を除去した後、 $100\mu\text{l}$ の溶解したOPD基質を加えた。反応は12.5%の硫酸で停止させ、Dynatech Plate Readerで490nmでプレートを読んだ。陽性のウエルを、ウエル当たり2、1および0.5個の細胞の限界希釈によりクローニングした。シングルクローニング由来のすべてのウエルをELISAによる抗体産生に関して陽性と評価した場合、該株はクローニングされたと見なした。

一過性または安定細胞トランスフェクタント培養物の細胞培養上清由来のヒト化ACT-1抗体の精製は、Bio-Cadワーカステーション（Perceptive Biosystems, Inc.）を用いるプロテインAアフィニティクロマトグラフィー（Poros A/M 4.6/100mm, 5mL/min）により行なった。該カラムは、PBSで平衡化させた後、前もって $0.2\text{mL}$ の2ミクロンフィルターで濾過しておいた細胞培養上清を適用した。1回の操作当たり適用した細胞培養上清の体積は、抗体の濃度により変えた。通常、1回の所定の操作で、 $15\text{mg}$ 以下の抗体をカラムに適用した。流速は、精製手法を通して $5\text{mL}/\text{min}$ であった。結合後、まず、該カラムをOD<sub>280nm</sub>=0になるまでPBSで大量に洗浄した。次いで、該カラムを最小限 $50\text{mL}$ のカラム体積でさらに洗浄した。次いで、該カラムを引き続き $0.1\text{M}$ 酢酸ナトリウム、pH 5.0で洗浄した。溶出は、 $0.1\text{M}$ クエン酸ナトリウム、pH 3.5での洗浄により達成された。溶出液は、 $5\text{mL}$ の画分で回収し、 $200\mu\text{l}$ の $1.5\text{M}$ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 1.2の添加によりpHを中性にした。次いで、抗体含有画分をプールし、限外濾過（セントリコン、30,000 KDaカットオフ、Amicon）により所望の濃度に濃縮した。

#### Fc変異改変体の構築

また、ヒト化ACT-1抗体の非Fc結合（Fc変異）版も構築した。この抗体は、ヒト

10

20

30

40

50

化 A c t - 1 抗体と同じ可変領域（図 11 および図 12 ）ならびに、 F c R 認識を排除し、 F c 結合を除去するように設計された I g G 1 重鎖定常領域に 2 個のアミノ酸の置換（即ち、 L e u <sup>235</sup> A l a <sup>235</sup> 置換および G l y <sup>237</sup> A l a <sup>237</sup> 置換）を除いて同一のヒト I g G 1 定常領域を有する。 F c 変異誘導体の重鎖をコードする核酸を以下のように構築した。 p E E 1 2 発現ベクター中でヒト化抗 C D 1 8 抗体（国際公開第 9 3 / 0 2 1 9 1 号パンフレット（1993 年 2 月 4 日公開）；シムズら、 J. Immunol. 151 (4) :2296-2308 (1993) ）の軽鎖および重鎖をコードするが、部位特異的変異導入（ L e u <sup>235</sup> A l a <sup>235</sup> および G l y <sup>237</sup> A l a <sup>237</sup> ）により 2 個のアミノ酸置換を I g G 1 重鎖定常領域内に導入した 3 6 7 8 と称する構築物（ヘルマン・ウォルトマン博士、オックスフォード大学から供与）を、 A g e I と E c o R I で消化してガンマ定常領域変異を含む 9 0 0 b p の断片を放出させた。次いで、この断片を用いて、 p E E 6 h A C T 1 H の A g e I / E c o R I 部位で重鎖野生型ガンマ 1 定常領域を置換し、 p E E 6 h A C T 1 H / F C m u t を生じさせた。両鎖を含有する他の構築物に対しては、前記したのと同様な方法で、再形成軽鎖遺伝子および F c 変異再形成重鎖遺伝子を含む 1 つの構築物（ p E E 1 2 h A C T 1 L H / F C m u t ）を調製した。

#### 実施例 4 ヒト化 A C T - 1 抗体 L D P - 0 2 のキャラクタライゼーション

最初のキャラクタライゼーション研究は、 p E E 1 2 h A C T 1 L H / F C m u t で一過性にトランスフェクトした C O S - 7 細胞から產生された抗体を用いて行なった。この抗体標品は、前記したように產生および精製され、以下、適當なロット番号が後に続く「 1 ° H U M A C T - 1 」と称する。

前記ネズミ細胞株 N S O の安定なトランスフェクタント（線状 p E E 1 2 h A C T 1 L H / F C m u t でトランスフェクト）から產生された抗体を用いて、追加のアッセイを行なった。この抗体標品を以下、「 L D P - 0 2 / 3 A 9 / L o t 1 」と称する。

「 L D P - 0 2 / 3 A 9 / L o t # 1 」抗体を以下に記載の次の研究に用いた： S D S - P A G E 、ウエスタンプロット分析、等電点電気泳動、アミノ酸組成分析、種交差反応性、滴定、補体介在溶解アッセイ、 A D C C アッセイおよび結合阻害アッセイ。「 1 ° H U M A C T - 1 L o t # 7 をアフィニティーアッセイ # 1 ~ 2 に使用し、 1 ° H U M A C T - 1 L o t # 8 / 9 をアフィニティーアッセイ # 3 ~ 5 に使用し、そして 1 ° H U M A C T - 1 L o t # 8 / 9 を C 1 q 結合アッセイに使用した。

#### A . 物理化学的特性

##### 1 . S D S - P A G E

同一性の立証を補助し、最初の標品をキャラクタライズして純度を評価するために、 L D P - 0 2 / 3 A 9 / L o t # 1 を、非還元および還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ S D S - P A G E ）に供し、コロイドクーマシーブルーで染色した。

0 . 8 2 m g / m l の公称濃度の L D P - 0 2 / 3 A 9 / L o t # 1 を 8 0  $\mu$  l 、微量濃縮器に加えた。抗体を溶解したクエン酸緩衝液を、 1 6 0  $\mu$  l の T r i s 緩衝液（ 0 . 5 m M 、 p H 8 . 8 ）で 3 回交換した。緩衝液交換後の試料の最終容量は、 1 3 5  $\mu$  l であり、 0 . 4 8 6 m g / m l の蛋白質濃度を得た。この溶液を非還元および還元緩衝液で 2 倍に希釈し、 0 . 2 4 3 m g / m l の濃度を得た。 3 . 1 6  $\mu$  g の蛋白質を含む 0 . 2 4 3 m g / m l 溶液の 1 3  $\mu$  l アリコートを、 S D S ゲルの指定された試料のレーンに負荷した。 S D S - P A G E を行ない、対照アーティクルは、マーク（ M a r k ） 1 2 分子量標準（ Novex, #LC5677 ）を含んでいた。

非還元条件下では、 L D P - 0 2 / 3 A 9 / L o t # 1 に、 2 0 0 , 0 0 0 ダルトンよりわずかに小さい見かけ上の分子量を有する主要なバンドが存在した。 1 1 6 , 3 0 0 ~ 2 0 0 , 0 0 0 ダルトンの間に、いくつかのマイナーな成分が観察された。約 9 7 , 4 0 0 ダルトンの分子量、 5 5 , 4 0 0 ダルトンよりわずかに大きな分子量および 3 1 , 0 0 0 ダルトンより小さい分子量を有する 3 つの追加のマイナーな成分も観察された。レーザーデンシトメトリーを用いてゲルをスキャンすることにより、染色されたポリペプチドバンドの定量分析、次いで、各可視化バンドに関連したエリアのパーセントの計算を可能にし

10

20

30

40

50

た(表5)。定量分析から得られたデータは、約200,000ダルトンで観察された主要な成分が試験した試料のレーンで全染色バンドの84.4%に相当することを示唆する。この主要なバンドは、インタクトな抗体に相当したが、55,000および、31,000ダルトンの他のバンドはそれぞれ、1本の重鎖および軽鎖に相当した。

還元条件下では、2つの主要な成分が電気泳動ゲル上で観察された。該成分のうちの1つの分子量は、約55,400ダルトンであり、該ゲルレーンで可視化された全染色バンドの68.6%に相当し、一方、31,000ダルトンよりわずかに小さいものに相当する第2の成分は、全染色バンドの30.5%に相当した(表5)。これらの2つの成分の分子量は、免疫グロブリンGの重鎖および軽鎖の予想される分子量とよく一致する。これらのデータは、約99%の標品がインタクトな抗体または1本の重鎖もしくは軽鎖免疫グロブリン鎖のいずれかからなることを示唆する。また、2つの主要な成分以外にも、66,300ダルトンよりわずかに小さい1つのマイナーな成分が観察された。

この分析から、インタクトな免疫グロブリンGに対するものと一致する高分子量種がLDP-02/3A9/Lot#1に主要なバンドとして存在する。また、いくつかのマイナーなバンドもLDP-02/3A9/Lot#1に存在する。還元後、免疫グロブリンG分子の重鎖および軽鎖のものと一致する電気泳動上の移動度を示す2つの主要なバンドが観察された。

表5

## 純度データの一覧

コロイドクーマシーブルー、非還元条件

試料	レーン	エリアパーセント (主要成分)
LDP-02/3A9/Lot#1	5	84.4%

純度データの一覧  
コロイドクーマシーブルー、還元条件

試料	レーン	低分子量エリア パーセント	低分子量 エリアパーセント
LDP-02/3A9/Lot#1	9	68.6%	30.5%

## 2. ウエスタンプロット分析

前記したように、SDS-PAGEにより試料および標準を分析した。要約すると、還元しないおよび還元した試料を4~20%Tris-グリシンゲルで分析した。また、ノベックス(Novex)マーク(Mark)12分子量標準もゲルで泳動した。それぞれ0.51および1.09μgの蛋白質を生ずる、0.2143mg/ml溶液の2.1μlおよび4.5μlアリコートの容量をSDSゲルの指定された試料レーンに負荷した。SDS-PAGE後、ノベックス(Novex)ウエスタン・トランスファー・アパレイタス(Western Transfer Apparatus)の使用説明書に従って、試料蛋白質をゲルからニトロセルロースに移した。用いたトランスファー緩衝液は、2

0 %メタノール中 1 X Tris - グリシン緩衝液であった。約 2 時間後、該ニトロセルロースプロットをトランスファー装置から除去し、DDI 水でリーンした。次いで、該ニトロセルロースプロットを、3 %ゼラチンおよび 0.1 %Tween 20 を含む Tris 緩衝液 (20 mM) 中、37 °で 35 分間プロックした。該プロットをブロッキング溶液から除去し、Tris 緩衝液で 2 回洗浄した。抗マウス IgG 抗体ストック溶液を 20 mM Tris - 3 % BSA 溶液で 1000 倍に希釈することにより調製したヤギ抗マウス IgG 溶液を、該プロットに添加し、2 ~ 8 °で一晩インキュベートした。インキュベーション後、該プロットを 5 分毎に Tris 緩衝液を 4 回交換することで洗浄した。抗ヤギ IgG アルカリホスファターゼコンジュゲートを 20 mM Tris - 3 % BSA 溶液で 5000 倍に希釈することにより調製した抗ヤギ IgG アルカリホスファターゼコンジュゲート溶液を、該プロットに添加し、室温で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、該プロットを 5 分毎に Tris 緩衝液を 4 回交換することで洗浄した。BCIP / NBT (5 - プロモ - 4 - クロロ - 3' - インドリルホスフェート p - トルイジン塩 / ニトロ - ブルーテトラゾリウムクロリド) 基質を、10 ml 同時に該プロットに添加した。プロットを揺動させながら室温で現像した。Tris 緩衝液でプロットをリーンすることにより反応を停止させた。次いで、ヤギ抗マウス IgG の代わりにヤギ抗ヒト IgG を用いて前記手法を繰り返した。

抗マウス IgG 試薬を用いる非還元および還元の両条件下で、0.51 µg および 1.09 µg の IgG 試料が、該ニトロセルロースプロット上で明確に検出された。バンドの強度は、濃度が増加するにつれて増加した。非還元条件下で、200,000 ダルトンマーク - カーよりもわずかに速く移動する主要なバンドが検出された。また、いくつかのより弱いバンドも検出された。これらのバンドのうちの 2 つは、主要バンドよりも遅く移動し、他の 3 つのバンドは概ねより速く移動した。還元条件下では、免疫グロブリン G の重鎖および軽鎖の特徴を有する 2 つのバンドが検出された。

非還元および還元の両条件下で抗ヒト IgG 試薬を用いて、0.51 µg および 1.09 µg の IgG 試料を該ニトロセルロースプロット上で明確に検出した。バンドの強度は、濃度が増加するにつれて増加した。非還元条件下で、200,000 ダルトンよりもわずかに小さい見かけ上の分子量マーク - カーを有する種に相当する主要バンドが検出された。また、抗マウス IgG で検出され、該プロットで観察されたより弱いバンドも検出された。免疫染色の強度は、抗ヒト IgG で検出した際のすべてのバンドに対してより強かった。他のプロットでは観察されないいくつかの追加のバンドが検出された。これらのバンドは、抗マウス IgG で認識されるエピトープを欠く IgG 断片に相当すると思われる。還元条件下では、免疫グロブリン G の重鎖の特徴を有するバンドが検出された。該抗体はヒト IgG の Fc 部分に特異的であったので、軽鎖は検出されなかった。抗ヒト IgG で検出を行なった際に、抗マウス IgG で現像したプロットでは見られないいくつかのマイナーバンドが観察された。2 つのプロット間のこの相違は、抗マウス IgG 結合に対するエピトープを欠く IgG 断片の存在の結果であろう。

### 3. 等電点電気泳動

LD P - 02 / 3A9 / Lot #1 を等電点電気泳動 (IEF) に供し、コロイドクーマシーブルーで染色した。LD P - 02 / 3A9 / Lot #1 に対して得られた結果を、同一のゲルで泳動した IEF 標準と比較した。

0.82 mg / ml の公称濃度の LD P - 02 / 3A9 / Lot #1 を 80 µl、微量濃縮器に加えた。抗体が入っているクエン酸緩衝液を、160 µl の Tris 緩衝液 (0.5 mM、pH 8.8) で 3 回交換した。試料の最終容量は、135 µl であった。最終濃度は、0.486 mg / ml であると計算された。この溶液を、2 X IEF 試料緩衝液で 2 倍に希釈して、0.243 mg / ml の濃度を得た。3.16 µg の蛋白質を生ずる 0.243 mg / ml 溶液に対して 13 µl のアリコートを、IEF ゲルの指定された試料の上に負荷した。対照のアーティクルは、IEF 標準 pI 3.6 ~ 9.3 を含んでいた (Sigma, Cat #I-3018)。

標準プロットは、8 つの IEF 標準の相対的な移動距離の平均をこれらの標準蛋白質のそ

10

20

30

40

50

それぞれについて公知の p I に対してグラフ化することにより作成した。これらのデータの回帰直線に適合させることにより、0.03459 の負の傾斜と 8.91857 の切片を得た。該適合の  $R^2$  は、0.99206 に等しかった。

表 6 は、6 つの IEF 標準および LDP - 02 / 3A9 / Lot # 1 により移動した平均の距離を含む。また、LDP - 02 / 3A9 / Lot # 1 について計算された p I もこの表に示す。

標準プロット由来の直線回帰パラメーターを用いて、LDP - 02 / 3A9 / Lot # 1 に関する 5 つのバンドの概略 p I 値は、8.09 の p I 値で表される優勢なピークとともに、7.88、7.95、8.09、8.26 および 8.43 であると計算された（表 6）。この主要ピークの p I 値は、一次アミノ酸配列に基づく予想 p I 値 7.91 に都合よく匹敵する。

表 6

<u>標準</u>	<u>移動距離*</u>	<u>p I<sup>1</sup></u>
レクチン	3. 3 mm	8. 8
レクチン	9. 5 mm	8. 6
レクチン	17. 88 mm	8. 2
ミオグロビン	59. 3 mm	6. 8 10
カルボニックアンヒドライゼ I	74. 0 mm	6. 6
カルボニックアンヒドライゼ II	92. 5 mm	5. 9
β-ラクトグロブリンA	105. 8 mm	5. 1
トリプシンインヒビター	122. 0 mm	4. 6
 <u>試料</u>	<u>移動距離</u>	<u>p I<sup>1</sup></u>
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド1)	14. 0 mm	8. 43
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド2)	19. 0 mm	8. 26
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド3)	24. 0 mm	8. 09
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド4)	28. 0 mm	7. 95
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド5)	30. 0 mm	7. 88

\* 平均

40

<sup>1</sup> 標準曲線に基づく (p I 対移動距離)

ここで：

試料 p I = 切片 - 傾斜 (試料移動距離)。

4. アミノ酸組成分析

アミノ酸組成分析を、LDP-02/3A9/Lot #1 の蛋白質含有量およびアミノ酸組成を決定して同一性を確認するために行なった。

まず、三連の 45 μl アリコートを加水分解用に取り除いた。加水分解は、6N HCl 50

蒸気を用いて 165 で 60 分間行なった。対照として、加水分解容器は、 LDP-02 / 3A9 / Lot #1 と同時に加水分解される標準蛋白質を含んでいた。また、アミノ酸標準は、 LDP-02 / 3A9 / Lot #1 分析の前後にクロマトグラフィーに付した。対照のアーティクルは、標準蛋白質としてウシ血清アルブミン (Tektagen Solution Control:310:197A) 、およびアミノ酸標準としてアミノ酸加水分解混合物 (Tektagen Solution Control:310:199A) を含んでいた。

試験方法には、カラム後ニンヒドリン反応および 2 波長での吸光度のモニターを伴うイオノ交換 HPLC による再懸濁した蛋白質加水分解物または遊離のアミノ酸溶液の分析を用いた。両波長での吸光度は、三連でアミノ酸標準を分析することにより得られた校正表と比較して定量化した。

表 7 にアミノ酸組成を示す。 LDP-02 / 3A9 / Lot #1 の蛋白質濃度は、 0.709 mg / mL であると決定された。 W および C の定量の欠如に関する補正に基づいて、蛋白質濃度を、 0.740 mg / mL に修正した。データおよび直接関係のある計算値を表 8 に要約する。

LDP-02 / 3A9 / Lot #1 に関しては、 165 で 6N HCl 蒸気を用いる単一の加水分解時点 (60 分) を行なった。標準蛋白質 (BSA) に由来する補正係数を、蛋白質含有量の決定に適用した (表 8) 。

この方法の条件下では、ともに溶出するシステインのピークの存在により、プロリンに関して得られたモルパーセント値 (表 7) がわずかに高くなるかもしれない。その結果として、プロリンの定量の精度は試料に依存し、試料加水分解物中に存在するシステインの量に基づく。この分析に関して、プロリンの含有量を、 BSA 由来の補正係数を用いて補正した (表 8) 。この補正の精度は試料に依存し、 BSA (6.0%) および試料中のシステインの相対量に基づく。

重鎖および軽鎖のヌクレオチド配列に基づき、相対パーセント (頻度またはモルパーセント) としての LDP-02 の予想アミノ酸組成 (予想 %) ならびにアミノ酸分析の実際の結果 (実測 %) を表 9 に示す。予想値対実測値の比較は、前記したようにプロリンがともに溶出するシステインのピークにより人為的に高いと思われることを除いて、良好な相関を示す。

表 7

試料 :	補正なしの LDP-02/3A9/ LOT#1	B S A由来の補正係数 を有するLDP-02/3A9/ LOT#1	W/C <sup>1</sup> およびB S A由 来の補正係数を有する LDP-02/3A9/LOT#1
AA	モル%	モル%	モル%
N/D	9. 1	9. 0	8. 6
T	6. 5	7. 5	7. 2
S	9. 2	13. 3	12. 7
Q/E	11. 4	11. 3	10. 8
P	8. 2	9. 8	9. 4
G	7. 8	7. 4	7. 1
A	5. 9	5. 8	5. 6
V	10. 2	9. 5	9. 1
M	0. 3	0. 7	0. 7
I	2. 5	2. 6	2. 5
L	8. 2	7. 9	7. 6
Y	5. 2	5. 0	4. 8
F	3. 4	3. 4	3. 3
H	2. 2	2. 2	2. 1
K	7. 0	6. 9	6. 6
R	2. 9	2. 9	2. 8
合計	100		

<sup>1</sup> - 相関係数は0. 958であり、これは、それぞれ1. 8%および2. 4%のWおよびCの含有量に基づいている。

表 8

## 蛋白質含有量の測定

AA	平均 n m o l	<sup>2</sup> 補正係数	補正後 n m o l	残基 MW	見出された量 ( n g )
N/D	5.954	0.991	5.900	115.1	679
T	4.243	1.156	4.905	101.1	496
S	6.054	1.448	8.766	87.1	764
Q/E	7.436	0.991	7.369	128.1	944
P	5.365	0.830	4.453	97.1	432
G	5.080	0.951	4.831	57.1	276
A	3.884	0.983	3.818	71.1	271
V	6.681	0.930	6.213	99.1	616
M	0.221	2.433	0.538	131.2	71
I	1.606	1.036	1.664	113.2	188
L	5.379	0.961	5.169	113.2	585
Y	3.374	0.954	3.219	163.2	525
F	2.229	0.992	2.211	147.2	325
H	1.442	0.981	1.415	137.2	194
K	4.616	0.984	5.542	125.2	582
R	1.922	1.005	1.392	156.2	302
カラムに注入した総量 ( n g ) :					7250
再構成容量 ( $\mu$ l ) :					220
<sup>3</sup> 加水分解した総量 ( n g ) :					31900
加水分解した総量 ( $\mu$ g ) :					31.9
元の試料容量 ( $\mu$ l ) :					45

希釈した試料容量 (μl) :	45
加水分解用アリコート値 (μl) :	45
蛋白質濃度 (mg/m1) :	0.709
W/Cに対する補正後の蛋白質濃度 (mg/m1) :	0.740

<sup>1</sup> 蛋白質含有量はシステインおよびトリプトファンに対して補正しない。 10

<sup>2</sup> BSA由来の補正係数を、検出した各アミノ酸に適用した。

<sup>3</sup> 加水分解した全ng = (注入した全ng × 再構成容量) / 注入容量 (50  
μl)

表 9

## アミノ酸組成

アミノ酸記号	アミノ酸	数	予想%	実測%
A	Ala	68	5.06	5.6
C	Cys	32	2.38	---
D	Asp	56	4.17	---
E	Glu	68	5.06	---
F	Phe	40	2.98	3.3
G	Gly	90	6.70	7.1
H	His	28	2.08	2.1
I	Ile	30	2.23	2.5
K	Lys	96	7.14	6.6
L	Leu	98	7.29	7.6
M	Met	10	0.74	0.7
N	Asn	50	3.72	---
P	Pro	94	6.99	9.4
Q	Gln	64	4.76	---
R	Arg	36	2.68	2.8
S	Ser	170	12.65	12.7
T	Thr	100	7.44	7.2
V	Val	126	9.38	9.1
W	Trp	24	6.98	---
Y	Tyr	64	4.76	4.8
N/D	Asn/Asp	106	7.89	8.6
Q/E	Gln/Glu	132	9.82	10.8

## 5. MALDI - TOF MS 分析

LDP-02/3A9/Lot #1をMALDI - TOF MSにより分析して、分子量を決定した。149, 808 Daを中心とする質量を有する主要ピークが検出された。74, 927 Daを中心とするピークは、主要ピークに見出される種の+2イオンを表す。+2イオンの質量は、M+Hイオンのちょうど半分ではないことに注目すべきであり；このわずかな格差は実験上の不正確さにより生ずると思われ、これは測定値の+/- 0.2%以内である。

抗体の予測された一次配列に基づくと、予想された分子質量は、147, 154 Daであるべきである。観測されたおよび予測されたIgG分子質量の間の2, 654 Daという質量の差は、該分子のグリコシル化によることが最も蓋然性が高いといえる。この観測された差は、約1.8%のグリコシル化レベルを表す。

10

20

30

40

50

## B. アフィニティー

まず、LDP-02/3A9/Lot#1およびネズミACT-1(Lot#2)の滴定を、ヒト由来のHUT-78細胞でフローサイトメトリーを用いて行なった。要約すると、 $1.0 \times 10^6$ 個のHUT-78細胞を、ビオチニル化ネズミACT-1(Lot#2)、ビオチニル化ネズミIgG1(LeukoSite, Inc.で作られたLot#1)、ビオチニル化LDP-02/3A9/Lot#1またはビオチニル化ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch, Avondale, PA; Lot 25794)のいずれか $100 \mu l$ の容量に4で20分間懸濁した後、抗体を除去した。特に示さない限り、すべての試薬は、0.15M PBS/1.0% FCS/0.1%アジ化ナトリウムで希釈した。両抗体に対する濃度変化には、 $30 \mu g / ml$ (ネズミACT-1のみ)、 $15 \mu g / ml$ 、 $7.5 \mu g / ml$ およびそれらの続く $1:10$ 希釈が含まれた。一次抗体の除去後、次に、該細胞を、 $1:200$ に希釈した $100 \mu l$ のストレプトアビジンフィコエリスリン(Dako Corp., Carpinteria, CA)に懸濁した。 $200 \mu l$ のPBSで洗浄した後、細胞を $0.5 ml$ のPBS/1%ホルマリンに再懸濁し、分析するまで冷凍した。試料は、フィコエリスリンを励起させるために $488 nm$ のレーザーを用いて、FACScan(Becton Dickinson Corp., San Jose, CA)で分析した。各試料に対して、最小限 $10,000$ 個の細胞を分析し、最大平均チャンネルフルオレッセンス(MCF)の半値を計算した。すべての試料は、二連で行なった。

これらの滴定研究により、約 $1.0 \mu g / ml$ の濃度で、ネズミACT-1およびLDP-02/3A9/Lot#1の両方を用いて最大の蛍光に近づくことが示唆された(図15)。最大平均チャンネルフルオレッセンスの半値は、ネズミACT-1よりもLDP-02の方が低い濃度で達成された(それぞれ、ビオチニル化ネズミACT-1 Lot#2に対して $0.1 \mu g / ml$ およびLDP-02/3A9/Lot#1に対して $0.02 \mu g / ml$ )。

アフィニティー(および特異性)の相対的評価は、フローサイトメトリーならびにLDP-02およびネズミAct-1抗体の交差競合結合を用いて、逆にヒト由来のHUT-78細胞で行なった。要約すると、 $1.0 \times 10^6$ 個のHUT-78細胞を、種々の濃度の非コンジュゲート化 $1^{\circ}$ HUM ACT-1または非コンジュゲート化ネズミAct-1のいずれかと $0.1 \mu g / ml$ のビオチニル化ネズミAct-1(Lot#2)の $100 \mu l$ に、4で20分間懸濁した後、抗体を除去した。別々の実験において、 $100 \mu l$ の $0.02 \mu g / ml$ のビオチニル化LDP-02/3A9/Lot#1を、種々の濃度の非コンジュゲート化ネズミACT-1(Lot#2)および非コンジュゲート化LDP-02/3A9/Lot#1とともに用いた。一定に保たれたビオチニル化抗体の濃度は、前記したように、同一の条件下で染色したHUT-78細胞での最大平均チャンネルフルオレッセンス(MCF)の半値で得られた濃度であった。特に示さない限り、すべての試薬は、0.15M PBS/1.0% FCS/0.1%アジ化ナトリウムで希釈した。両抗体に対する濃度変化は、 $2.0 \times 10^{-6} M$ ~ $5.0 \times 10^{-11} M$ の対数增加の半値にわたっていた。一次抗体の除去後、次に、該細胞を、 $1:200$ に希釈した $100 \mu l$ のストレプトアビジンフィコエリスリン(Dako Corp., Carpinteria, CA)に懸濁した。 $200 \mu l$ のPBSで洗浄した後、細胞を $0.5 ml$ のPBS/1%ホルマリンに再懸濁し、分析するまで冷凍した。試料は、フィコエリスリンを励起させるために $488 nm$ のレーザーを用いて、FACScan(Becton Dickinson Corp., San Jose, CA)で分析した。各試料に対して、最小限 $10,000$ 個の細胞を分析し、MCFを計算した。すべての試料は、二連で行なった。IC<sub>50</sub>は、ビオチニル化ホモログ抗体からMCFで50%の低下を生ずる非コンジュゲート化抗体の濃度として決定された。

アフィニティーの見積もりは、LDP-02( $1^{\circ}$ HUM ACT-1)とネズミACT-1との間の5つの独立した交差競合実験で行なった。ビオチニル化ネズミAct-1を該アッセイで一定に保つ抗体として用いた場合、LDP-02に対する平均IC<sub>50</sub>値( $\pm 1 SEM$ )( $5.43 \pm 0.86 nM$ )は、ネズミACT-1に対するもの( $7.94 \pm 1.17 nM$ ;  $p = .02$ 、両側t-検定:平均に対して対の2個の試料)よりも統計

学的に低く、一方、無関係なヒト Ig G 1 またはネズミ Ig G 1 は、競合的効果を有していないかった（すべての実験を表 10 に要約する；1つの実験を図 16 に示す）。同様に、ビオチニル化 LDP-02 / 3A9 / Lot # 1 が該アッセイで一定に保たれた抗体である場合、HuT-78 細胞膜から LDP-02 を競合除去するのに LDP-02 / 3A9 / Lot # 1 よりも高い濃度の非コンジュゲート化ネズミ Act-1 を要した（それぞれ、 $IC_{50} = 6.3 \text{ nM}$  対  $4.3 \text{ nM}$ ）。各実験において、LDP-02 は、ネズミ Act-1 よりも低い  $IC_{50}$  を有した。これらの結果は、LDP-02 がネズミ Act-1 により認識されるエピトープに対して特異的であり、その結合アフィニティーがネズミ抗体のものよりも良好であったことを示唆する。

表 10

10

## ネズミ ACT-1 およびヒト化 ACT-1 (LDP-02)

## アフィニティー評価

実験 #	抗体	Lot #	$IC_{50}$ (nM)
1	ACT-1 (ネズミ)	2	7.57
2		2	10.95
3		2	6.02
4		2	4.91
5		2	10.24
平均 $\pm$ SEM		7.94 $\pm$ 1.17	20
			30
1	LDP-02 (ヒト化)	7	4.34
2		7	6.13
3		8/9	4.71
4		8/9	3.53
5		8/9	8.44
平均 $\pm$ SEM		5.43 $\pm$ 0.86	40

 $p = 0.02$ 

## 両側 t-検定：平均に対して対の 2 個の試料

## C. 種の交差反応性

フローサイトメトリーを用いて、種の交差反応性を評価した。ヒト、イヌ、ネコ、モルモットまたはラットから採取した  $100 \mu\text{l}$  の EDTA 抗凝固血を、FACS チューブに加

50

えた。血漿を除去し、次いで、血液ペレットを、15  $\mu$ g / ml の濃度でビオチニル化 LDP - 02 / 3A9 / Lot # 1、無関係なビオチニル化ヒト IgG (Jackson ImmunoResearch, Avondale, PA)、ビオチニル化ネズミ Act - 1 Lot # 2 または無関係なビオチニル化ネズミ IgG1 (Dako Corp., Carpinteria, CA) のいずれか 100  $\mu$ l 中に再懸濁した。特に示さない限り、すべての試薬は、0.15M PBS / 1.0% FCS / 0.1% アジ化ナトリウムで希釈した。試料を 4° で 20 分間抗体とともにインキュベートした後、該抗体を洗浄により除去した。次いで、細胞を 4° で 20 分間、1:200 に希釈したストレプトアビシンフィコエリスリン (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) 100  $\mu$ l とともにインキュベートした。次いで、赤血球を、製造業者のプロトコールに従って、市販の溶解試薬 (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて溶解した。PBS で洗浄した後、細胞を 0.5 ml の PBS / 1% ホルマリンに再懸濁し、分析するまで冷凍した。試料は、フィコエリスリンを励起させるために 488 nm のレーザーを用いて、FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) で分析した。リンパ球捕捉ゲートを前方に 90 度の光散乱パラメーターでセットした。各試料に対して、10,000 個の細胞を分析した。

ビオチニル化 LDP - 02 / 3A9 / Lot # 1 は、ネズミ Act - 1 で生じたものと類似で、ヒトまたはネズミアイソタイプ適合対照での染色により生じたパターンとは異なる異質の染色パターンでヒトリンパ球の亜集団を認識した。さらに、イヌまたはネコ由来のリンパ球で調べたとき、LDP - 02 / 3A9 / Lot # 1 およびネズミ Act - 1 は両方とも、ヒトリンパ球を用いて派生したものと類似の異質な染色パターンを生じた。LDP - 02 / 3A9 / Lot # 1 またはネズミ ACT - 1 は、これらの条件下でラットまたはモルモット由来のリンパ球を認識しなかった。

#### D. C1q 結合

以前に記載された技術 (シムズら、J. Immunol. 151:2296-2308 (1993)) を用いて、フローサイトメトリーを使用して LPD - 02 のヒト補体成分 C1q を結合する能力を評価した。ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を標準フィコール (Ficoll) 密度分離により単離した。まず、375,000 個の細胞を 4° で 10 分間、10% 正常ウサギ血清 / PBS でブロックした。洗浄による除去の後、該細胞を、10  $\mu$ g / ml の (a) CAMPATH - 1H (Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K.)、(b) ヒト IgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、(c) LDP - 01 (2 個のアミノ酸置換を IgG 1 重鎖定常領域に含み (Leu<sub>235</sub> Ala<sub>235</sub> および Gly<sub>237</sub> Ala<sub>237</sub>))、また、「FcRmut CD18」とも称する、国際公開第 93/02191 号パンフレット (1993 年 2 月 4 日公開) およびシムズら、J. Immunol. 151 (4):2296-2308 (1993) に記載された抗 CD18 抗体の誘導体、Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K.)、または (d) LDP - 02 (1°C human ACT - 1 Lot # 8/9) のいずれか 100  $\mu$ l とともに、4° で 20 分間インキュベートした。CAMPATH - 1H を陽性対照抗体として供し、一方、LDP - 01 およびヒト IgG1 を陰性対照抗体として用いた。すべての試薬を 2% BSA / PBS で希釈した。追加の陰性対照として、2% BSA / PBS も単独で加えた。次いで、抗体を洗浄により除去し、細胞を 4° で 30 分間、10  $\mu$ g / ml のヒト補体成分 C1q (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 50  $\mu$ l に再懸濁した。次いで、細胞を洗浄して、20  $\mu$ g / ml の FITC 結合ウサギ抗ヒト C1q 抗体 (Dako Corp., Carpinteria, CA) 100  $\mu$ l に 4° で 20 分間再懸濁した。200  $\mu$ l の PBS で洗浄した後、細胞を 0.5 ml の PBS / 1% ホルマリンに再懸濁し、分析するまで冷凍した。試料は、FITC を励起させるために 488 nm のレーザーを用いて、FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) で分析した。各試料について、最小限 10,000 個の細胞を分析し、平均チャンネルフルオレッセンス (MCF) を計算した。

ヒト PBMC を、CAMPATH - 1H 結合ヒト C1q とともにインキュベートし、MCF で有意なシフトが生じたが、PBMC の LDP - 01、BSA またはヒト IgG1 とのインキュベーションにより誘発された染色パターンはすべて類似しており、相対的に低い

バックグラウンド染色を特徴とした。LDP-02とのPMBcのプレインキュベーションにより生じた染色のパターンは、これらの陰性対照試料で生じたものと同一であり、LDP-02はこれらの条件下ではC1qを結合しないことを示唆した。

#### E. 補体介在溶解

LDP-02/3A9/Lot #1の補体介在細胞溶解に関与する能力を、Bindon (Bindon, C.I.) ら (Transplantation, 40:538-544 (1985)) により以前に記載されたプロトコールを用いて調べた。ヘパリン処理したヒト血液を無菌的に吸引し、血漿を回収してすぐに氷上に置いた。末梢血単核細胞 (PBMC) は、フィコール-ハイパーク (Ficoll-Hypaque)、密度  $1.077 \text{ g/m}^3$  の層に重層して 15 分間遠心分離することにより単離し、RPMI 1640/10% FCS/100U/ml ペニシリン/100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン/2.0 mM L-グルタミンからなる完全培地で 2 回洗浄した。次いで、2500 万個の細胞を 37 度で 1 時間、 $150 \mu\text{Ci}$  の $^{51}\text{Cr}$ クロム酸ナトリウム (E.I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE) の滅菌塩水中でインキュベートした。細胞を培地で 2 回洗浄し、 $10^6/\text{ml}$  に再懸濁した。次いで、培地中に 50、25、5、2.5 および  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の (a) CAMPATH-1H (Therapeutic Center, Cambridge, U.K.)、(b) CAMPATH-1G (Therapeutic Center, Cambridge, U.K.)、(c) ヒト Ig G1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、(d) LDP-02/3A9/Lot #1、または (e) LDP-01 (FcRmut CD18, Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K. (前記参照のこと)) のいずれか  $100 \mu\text{l}$  を含む U 底マイクロタイプレートのウエルに、 $50 \mu\text{l}$  の懸濁物 ( $5.0 \times 10^4$  個の細胞) を添加した。CAMPATH-1 抗体を陽性対照抗体としてアッセイに用い、一方、ヒト Ig G1 および LDP-01 を陰性対照として用いた。追加のウエルは、完全培地中の 0.1% Triton-X-100 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) の  $100 \mu\text{l}$  に懸濁した細胞を含んでいた。Triton-X-100 とインキュベートした細胞を用いて全放出を測定し、一方、抗体を含まない対照ウエルを用いて自発放出を測定した。室温で 15 分間のインキュベーション後、補体供給源として  $50 \mu\text{l}$  の自己血漿を各ウエルに添加して 20% の最終濃度とした。該細胞を 37 度で 45 分間インキュベートし、次いで、 $100 \text{ g}$  で 2 分間遠心分離し、 $100 \text{ u l}$  の上清を回収した。放出された $^{51}\text{Cr}$  は、Cobrall ガンマカウンター (Packard Instruments, Downers Grove, IL) で測定した。すべての試料は、二連で行なった。特異的 $^{51}\text{Cr}$  放出パーセントは、式：

$$(試験 - 自発) \times 100\%$$

特異的放出 = \_\_\_\_\_

#### 全体 - 自発

を用いて計算した。

Bindon (Bindon) ら (Transplantation, 40:538-544 (1985)) により以前に報告されたように、CAMPATH-1H および CAMPATH-1G は両方とも、用量に依存した様式でヒト PBMC の補体介在溶解を 35% まで誘発した。さらに、予想されたように、ヒト Ig G1 および LDP-01 (Fc-mut CD18) 対照は、いかなる検出可能な細胞溶解をも誘発しなかった。LDP-02 は、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  までを含む調べたいかなる濃度でも細胞溶解を介しなかった (図 17)。

#### F. 抗体依存性細胞傷害 (ADCC)

ヒト CD3+芽球を標的細胞として用い、LDP-02 の抗体依存性細胞傷害 (ADCC) に関与する能力を評価した。CD3+芽球は、PBS で  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に希釈した抗 CD3 抗体 RT6.6 で被覆した 24 ウエルプレートで生成した。ヒト末梢血単核細胞 (PBMCs) は、フィコール-ハイパーク (Ficoll-Hypaque)、密度  $1.077 \text{ g/m}^3$  の層に重層して 15 分間遠心分離することにより単離し、前章で記載したように、完全培地で洗浄および再懸濁した。次いで、200 万個の細胞を 24 ウエルプレートの各ウエルに加え、37 度、5% CO<sub>2</sub> で 4 日間インキュベートした。次いで、細胞

30

10

20

40

50

をカルチャーフラスコに移し、10ユニット/mlの濃度のヒト組換えIL-2 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) を含む培地で、37、5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。培養3日後、次に、10.0 × 10<sup>6</sup>個のCD3芽球を37で45分間、150 μCiの<sup>51</sup>クロム酸ナトリウム (E.I.du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE; Lot#95M682) の滅菌塩水中でインキュベートした。完全培地で2回洗浄した後、細胞を2 × 10<sup>5</sup>細胞/mlになるように再懸濁し、50 μlの懸濁物 (10,000個の細胞) をU底96ウエルマイクロタイプレートのウエルに加えた。該ウエルは、培地中に50、5、2.5、0.5、0.25または0.05 μg/mlの最終濃度のCAMPATH-1H (Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K.) またはLDP-02/3A9/Lot#1のいずれか50 μlを含んでいた。細胞を室温で30分間抗体とともにインキュベートした後、異なるドナー由来の0.5 × 10<sup>6</sup>個の新たに単離したPBMC (ficol 1-hyque勾配、37で完全培地で2回洗浄) をエフェクター細胞として各ウエルに加えた (50:1のエフェクター:標的比)。追加のウエルには、培地中5% Triton-X-100 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) の100 μlを加えた。Triton-X-100とインキュベートした細胞を用いて全放出を測定し、一方、抗体およびエフェクター細胞を含まない対照を、自発放射能放出を測定するために算入した。細胞を室温で100g、2分間遠心分離し、37、5%CO<sub>2</sub>で20時間インキュベートした後、細胞をV底96ウエルプレートに移し、室温で沈澱させた。100 μlの上清を回収し、放出された放射能をCobrallガンマカウンター (Packard Instruments, Downers Grove, IL) で測定した。すべての試料は、二連で行なった。特異的<sup>51</sup>Cr放出パーセントは、式：

$$(試験 - 自発) \times 100\%$$

特異的放出 = \_\_\_\_\_

全体 - 自発

を用いて計算した。

シムズら、J. Immunol., 151 (4):2296-2308 (1993) により以前に示されたように、CAMPATH-1Hは、用量に依存した様式でADCCに関与し、5.0 μg/ml以上の濃度で約30%までの特異的<sup>51</sup>Cr放出を誘発した。調べたいかなる濃度でもLDP-02を含むウエルでは特異的放出を検出しなかった。

#### G. MAdCAM-1への接着阻害

4.7のMAdCAM-1への結合を阻害するLDP-02の能力は、蛍光標識した4.7+RPMI 8866細胞 (ヒトB細胞リンパ腫)、およびヒトIgG1のFc領域 (Fc変異LDP-02の定常領域を作製するために用いた同じ構築物由来の定常領域)に融合したヒトMAdCAM-1の全細胞外ドメインを含有するMAdCAM-1キメラを用いて評価した。

#### 1. MAdCAM-IgGキメラの構築

pCDhuMAd4と称するヒトMAdCAM-1クローン (pCDNA3中のクローン4cDNA; シジャン (Shyjan, A.M.) ら、J. Immunol., 156:2851-2857 (1996); その教示は、参照によりそのまま本明細書に取り込まれる) を、1995年2月10日に出願された米国出願第08/386,857号明細書の一部継続出願である、1995年9月1日に出願された米国出願第08/523,004号明細書の一部継続出願である、1996年2月12日に出願された国際出願番号PCT/US96/02153 (国際公開第96/24673号パンフレット) に記載されたように、ヒトMAdCAM-1の細胞外領域のPCR增幅用の鋳型として用い、ヒトIgG1の定常領域と融合させた。MAdCAM-IgGキメラを構築するために、ヒトMAdCAM-1コーディング配列の5'末端 (ATGコドン、太字) を含むプライマーHUMADIG4/2 (配列番号: 62) を合成した：

## HindIII

5' -GGAAGCTTCCACCATGGATTTCGGACTGGCCC-3'

この5'プライマーは、HUMADIG3と称する3'プライマーと合わせて用い、ヒトMAdCAM-1の全細胞外ドメインをコードする領域を増幅した。3'プライマーHUMADIG3(配列番号：63)は、下記配列を有する：

## SpeI

5' -GGACTAGTGGTTGGACGAGCCTGTTG-3'

示したように、5'HindIII部位または3'SpeI部位を有するプライマーを設計した。これらのプライマーを使用して、インビトロゲン(Invitrogen)(San Diego, CA)製のPCRオプティマイザーキットを用いてMAdCAM断片をPCR増幅した。PCR産物を酵素HindIIIおよびSpeIで消化して、クローニング用末端を生成させ、グラスマックス(Glassmax)DNA単離システム(Gibco, Bethesda, MD)を用いるゲル電気泳動により精製した。

CH1、CH2およびCH3領域を包含する約1kbの断片を、Fc変異ヒト定常領域を有するヒト免疫グロブリン1重鎖をコードする構築物からSpeIとEcoRIとの消化により切り出した。その教示がそれぞれ参照によりそのまま本明細書に取り込まれる、シムズら(J. Immunol., 151:2296-2308 (1993))およびウォルトマンら(国際公開第93/02191号パンフレット 1993年2月4日(第23頁))により記載されたように、この構築物中のヒト定常領域は、CAMPATH-1H重鎖(ライヒマンら、Nature, 322:323-327 (1988))のPCR増幅により得られたものに相当する。この構築物の定常領域中の変異(Leu<sup>235</sup> Ala<sup>235</sup>およびGly<sup>237</sup> Ala<sup>237</sup>)は、ヒトFcレセプターへの結合を低下させるように設計され、オリゴヌクレオチド特異的変異導入により生成された。したがって、生成したMAdCAM-Ig融合体は、Leu<sup>235</sup> Ala<sup>235</sup>およびGly<sup>237</sup> Ala<sup>237</sup>変異の導入を除いて、シムズら(J. Immunol., 151:2296-2308 (1993))およびウォルトマンら(国際公開第93/02191号パンフレット)により記載されたSpeI-EcoRI定常領域断片を含む。

Fc変異IgG1定常領域をコードする1kbのSpeI-EcoRI断片を、Glassmax DNA単離システム(Gibco, Bethesda, MD)を用いるゲル電気泳動により単離した。この定常領域断片およびMAdCAMの全細胞外ドメインを含むHindIII-SpeI断片を、HindIIIとEcoRIで消化しておいたベクターpEE12(ステファンズ(Stephens, P.L.)とコケット(M.L. Cockett)、Nucl. Acids Res., 17:7110 (1989)およびベビングトン(Bebbington, C.R.)とヘンツェル(C.C.G. Hentschel)、1987、哺乳動物細胞におけるクローニング遺伝子の発現のための遺伝子増幅に基づくベクターの利用、(Academic Press, N.Y.)に三部ライゲーションで連結した。細菌株DH10Bの形質転換体を得た。コロニーを生育させ、ミニープラスミドプレップを制限マッピングにより分析した。Fc変異IgG1定常領域に融合したMAdCAM-1の全細胞外ドメインを含有する融合蛋白質をコードする構築物(構築物HuMAdIg21)を、全MAdCAM-1部分にわたってシーケンスし、セグメントが適切に融合していることおよびPCRで誘導した変異がないことを確認した。キメラをNSO細胞で生成させ、標準的なプロテインAアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

## 2. 接着アッセイ

高結合型平底96ウエルプレート(Costar)を、炭酸塩緩衝液、pH 9.5で2.5μg/mlに希釈した50μlのMAdCAM-1キメラを用いて、37℃で1時間被覆した。次いで、マイクロプレート自動洗浄機(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT)を用いて、洗浄緩衝液(50mM Tris HCl、0.14M NaCl、1mM MnCl<sub>2</sub>、pH 7.2)で1回ウエルを洗浄し、PBSに希釈した10% FBS 100μlで、37℃で1.5時間ブロックした。

まず、 RPMI 8866細胞(47を発現する(そして41を発現しない)ヒトBリンパ腫細胞株(アール(Erle, D.J.)ら、J. Immunol., 153:517 (1994); アール博士から供与))を20mlのPBS(4)で洗浄し、PBS中4.0 × 10<sup>6</sup>細胞/ml

10

20

30

40

50

に再懸濁した。B C E C F ( 2 ' , 7 ' - ビス - ( 2 - カルボキシエチル ) - 5 - ( アンド 6 ) - カルボキシフルオレッセイン , アセトキシメチルエステル ; Molecular Probes, Inc. , Eugene, OR ) を、 D M S O 中 5 0  $\mu$  g / m l に再構成し、 1 : 5 0 0 の最終希釈になるように細胞懸濁物に加えた。 3 7 で 3 0 分間インキュベートした後、 次に、 細胞をアッセイ緩衝液 ( 2 % ウシ胎仔血清を含む H B S S 、 2 5 mM H E P E S 、 ベニシリン / ストレプトマイシン、 pH 7.2 ) で洗浄し、 V 底 9 6 ウエルプレートの各ウエルに 5 0 , 0 0 0 個の細胞を加えた。 次いで、 細胞を、 アッセイ緩衝液中に 1 5 . 0 ~ 0 . 0 0 0 7 5  $\mu$  g / m l の濃度の ( a ) ネズミ A c t - 1 、 ( b ) ネズミ I g G 1 ( Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO ) 、 ( c ) L D P - 0 2 / 3 A 9 / L o t # 1 、 または ( d ) ヒト I g G 1 ( Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO ) のいずれか 1 0 0  $\mu$  l に室温で 1 0 分間再懸濁した。 M A d C A M - 1 キメラで被覆したプレートを洗浄してプロッキング緩衝液を除去し、 次いで、 これらの蛍光標識された R P M I 8 8 6 6 細胞を各ウエルに移した。 該プレートをアルミホイルで覆って、 室温で 3 0 分間、 4 0 R P M のプラットホーム振盪機 ( New Brunswick Scientific Co. , Inc. , Edison, NJ ) 上に置いた。 未結合の細胞を 1 回の洗浄工程で除去し、 続いて洗浄前後に、 フルオレッセンス コンセントレーター アナライザ ( Fluorescence Concentrator Analyzer ) ( IDEXX Laboratories, Inc. , Westbrook, ME ) で蛍光を測定した ( 4 8 5 n m で励起、 5 3 5 n m で読む ) 。 各ウエルについての結合した細胞のパーセントは、 式 :

$$\text{結合した細胞\%} = \frac{\text{洗浄前のR F U}}{\text{洗浄後のR F U}} \times 100$$

10

20

### 洗浄後のR F U

を用いる相対蛍光単位 ( R F U ) から計算された。

L D P - 0 2 およびネズミ A c t - 1 の両方は、 用量に依存した様式で、 ヒト M A d C A M への R P M I 8 8 6 6 細胞の接着を阻害した ( 図 1 8 A ~ 1 8 B ) 。 5 0 % 接着を阻害する濃度 ( I C<sub>50</sub> ) は、 ネズミ A c t - 1 ( 0 . 0 0 1 8  $\mu$  g / m l ) および L D P - 0 2 ( 0 . 0 0 1 4  $\mu$  g / m l ) に関して相対的に類似していた。 したがって、 L D P - 0 2 は、 少なくともネズミ A c t - 1 と同じ程度に有効に M A d C A M - 1 への 4 7 介在接着を機能的に阻害した。

### 実施例 5 追加のヒト化抗体

前記したように、 実施例 2 で設計された再形成抗体のいくつかの変異を作製してアフィニティを改良することおよび / または再形成抗体の抗原性を減少させることができる。かかる構築物は、 1 以上の下記変異 : 軽鎖の M 4 V 変異、 重鎖の R 3 8 K 変異、 重鎖の A 4 0 R 変異および重鎖の I 7 3 T 復帰突然変異を有するものを含むがこれに限定されるものではない。 変異体は、 独立して ( 例えば、 1 つの鎖に 1 つの変異 ) または種々の組合せで生成させることができる。

例えば、 図 1 9 は、 再形成抗体 ( 実施例 2 で設計された ) または軽鎖に 1 つの追加の変異 ( M V 4 ) および重鎖に 2 つの追加の変異 ( R 3 8 K 、 A 4 0 R ) を有する誘導体を用いた H u T 7 8 染色の結果を示す。 これらの 2 つの抗体は、 H u T 7 8 細胞で類似の染色パターンを示す ( 図 1 9 ) 。 該変異は、 製造業者の提案するプロトコールに従って、 トランスフォーマー サイト - ディレクテッド ミュータゼネシス キット ( Clontech ) を用いて核酸配列を変化させることにより作製した。 重鎖および軽鎖可変領域の両方の変異は、 p C R - S c r i p t<sup>TM</sup> にクローニングされた可変領域で作製された。 トランスオリゴ S c a I / S t u I ( Clontech ) をトランスオリゴ用に用いた。 変異誘発オリゴの配列 ( 配列番号 : 3 8 ~ 4 0 ) は、 下記のようであった :

30

40

H/R 38 K (配列番号: 38) :

5' - C TGG CCA ACG

H/I 73 T (配列番号: 39) :

5' - CAC ATT GAC TGT AGA CAC TTC CGC T  
AG CAC AGC C

L/M 4 V (配列番号: 40) :

5' - CCG GAG GTG ATG TTG TGG TGA CTC

発現ベクター-pEE6hCMV-BおよびpEE12へのサブクローニングならびに重鎖および軽鎖遺伝子の両方を含む発現プラスミドの構築を含む他のすべての操作は、最初の再形成抗体に関する記載と同様であった。また、一過性のトランスフェクションおよび細胞染色も最初の再形成抗体に関する記載と同様になされた。

#### 均等物

当業者であれば、単なる日常的な実験方法によって、本明細書に記載された発明の具体的な特徴に対する多くの均等物を認識し、あるいは確認することができるであろう。そのような均等物は、以下の請求の範囲の範疇に含まれることを意図されている。

10

20

【図1】

5' プライマー領域

10 20 30 40 50  
TTACKRGWMK WC ATG RRA TGS ASC TRK RTC ATY YTC TTC TTG GTC TCA ACA  
M X X X X I X F L V S T>  
60 70 80 FW1 90  
GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG  
A T S V H S Q V Q L Q Q P G A E>  
100 ↑ シグナルペプチド切断部位  
110 120 130 140  
CTT GTG AAG CCT GGG ACT TCA AGC CTG TCC TGG AAG GGT TAT GGC  
L V K P G T S V K L S C K G Y G>  
150 160 CDR1 170 180 FW2 190  
TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC GTG GTG AAG CAG AGG CCT GGA  
Y T F T S Y W M H W V K Q R P G>  
200 210 220 CDR2 230 240  
CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT ATT ACT  
Q G L E W I G E I D P S E S N T>  
250 260 270 280 290  
AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGC AAG GGC ACA TTG ACT GTC GAC ATT  
N Y N Q K F K G K A T L T V D I>  
300 310 320 330  
TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CTC AGC ACC CTG ACA TCT GAG GAC  
S S T A Y M Q L S S L T S E D>  
340 350 360 370 380  
\* FW3 \* \* \* CDR3 \* \* \*  
TCT GCG GTC TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC TAT  
S A V Y Y C A R G Y D G W D Y>  
390 400 FW4 410 420 430  
GCT ATT GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GCC  
A I D Y W G Q G T S V T V S S A>  
440 450 460 470 480 490  
AAA AGC ACA CCRYCN CSYKTMTCY YYSBDNNCCC YKGRWSCYTG GNNGAAGCTT  
K T T>

3' プライマー領域

FIG. 1

【図2】

10 20 30 40 50  
TTACTTGAGG ACTCGGG ATG GGA TGG ACC TAT ATC ATC TTC TTC TTG GTC TCA  
M G W S Y I I F F L V S>  
60 70 80 90 100  
ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT  
T A T S V H S Q V L Q Q P G A>  
110 120 130 140  
GAG CTT GTG AAG CCT GGG ACT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GGT TAT  
E L V K P G T S V K L S C K G Y>  
150 160 170 180 190  
GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT  
G Y T F T S Y W M H W V K Q R P>  
200 210 220 230 240  
GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT ATT  
G Q G L E W I G E I D P S E S N>  
250 260 270 280 290  
ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGC AAG GGC ACA TTG ACT GTC GAC  
T N Y N Q K F K G K A T L T V D>  
300 310 320 330 340  
ATT TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG  
I S S T A Y M Q L S S L T S E>  
350 360 370 380  
GAC TCT GCG GTC TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC  
D S A V Y Y C A R G G Y D G W D>  
390 400 410 420  
TAT GCT ATT GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACA TCA GTC ACC  
Y A I D Y W G Q G T S V T>

FIGURE 2

【図3】

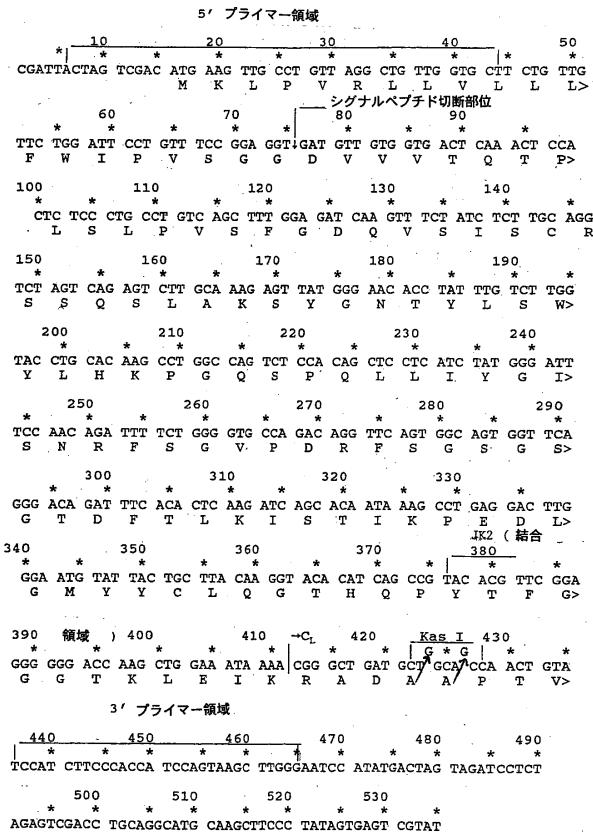


FIG. 3

【図4A】

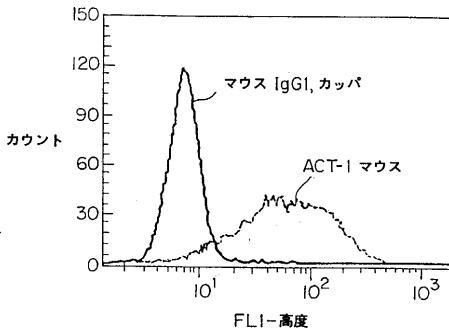


FIG. 4A

【図4B】

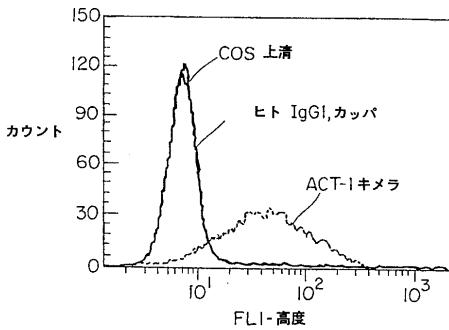


FIG. 4B

【図5】

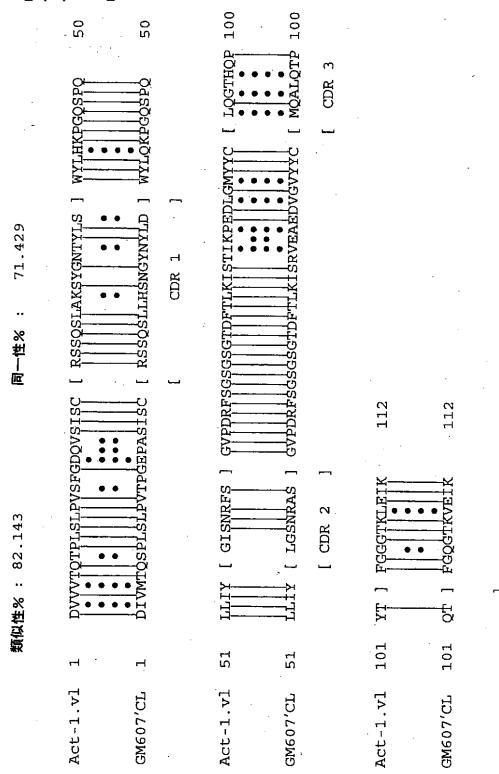


FIGURE 5

【図6】

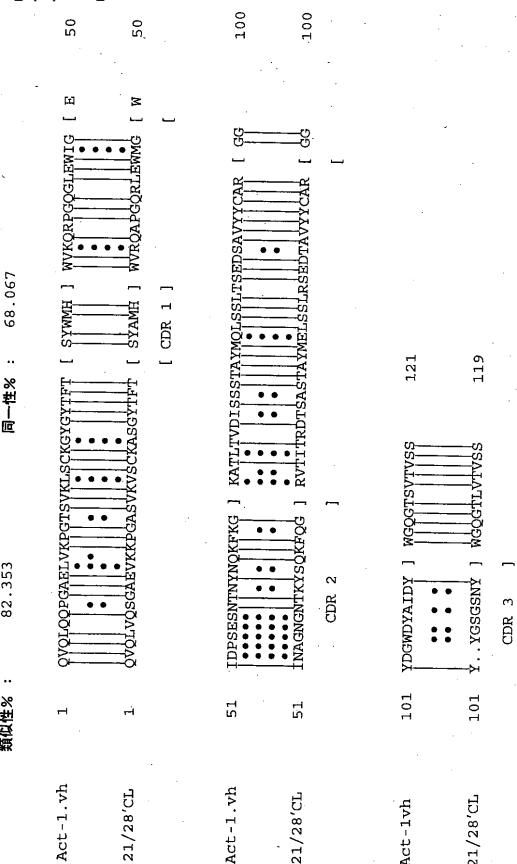


FIGURE 6

【図7】

1 ATGAAAGTTGCCCTGTTAGGTGTTGGCTCTGTTCTGGATTCCCTGTTCCGGAGGT  
1 TACCTTCAACGGACAATCCGACAACACAGAAGACAAACAGACCTAAGGACAAGGCTCCA  
[M K L P V R L L L F W I P V S G G]  
シグナルペプチド

60 61 ATCTCCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCACTCTCCCTGCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCTCC  
CTATAACACTACTGAGTCAGAGGAGGTGAGAGGGACGGCGAGTGGGACCTCTCGGCCGGAGG  
[D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S]  
棒組み1

61 GATGTTGTGGTGAATCAAACCTCAGCTCTCCCTGCCCTGTCAGCTTGGAGATCAAGTTCT  
120 61 CTACAAACACCACTGAGTTGGTGGAGGGACGGCACAGTCGAACACCTCTAGTCAAAAGA  
[D V V T Q T P L S L P V S F G D Q V S]  
棒組み1

121 ATCTCTTGCGAGTCTAGTCAGACTCTGGCAAAAGACTTATGGAAACACCTTGGCTTGG  
180 121 TAGAGAACGTCAGATCTCAAGAACGATCTCAATACCCCTGTCGATAAACAGAAC  
[I S C][R S S Q S L A K S Y G N T Y L S][W]  
CDR 1

181 TACCTGGCACAGGCTGCCAGTCTCCACAGCTCTCATCTATGGATTCCACAGATT  
180 181 ATGGACGTGTCGGACGGTCAGAGGTGTCGAGGAGTAGATAACCTAAAGGTGTC  
[Y L H K P G Q S P Q L L I Y][G I S N R F]  
棒組み2 CDR 2

241 TCTGGGGTGCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGTTCAAGGACAGATTTCACACTCAAGATC  
300 AGACCCACGGCTCTCAAGTCACCGTCAAGTCACCTGTCAGTAAAGGTGTC  
[S][G V P D R F S G S G T D F T L K I]  
棒組み3

301 AGCACAAATAAGCCTGAGGACTTGGAATGTTACTGTTAACAGGTACACATCAGCCG  
360 TCGTGTATTTCGGACTCTCTGAACCCCTACATAATGAGGAATGTTCCATGTTAGTC  
[S T I K P E D L G M Y Y C][L Q G T H Q F]  
CDR 3

361 TACACGTTGGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA  
396 ATGTGCAAGCCCTCCCTGGTTGACCTTATT  
[Y T][F G G T K L E I K]  
棒組み4

FIG. 7

【図8】

1 GATATTGATGACTCAGTCCTCCACTCTCCCTGCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCTCC  
60 61 CTATAACACTACTGAGTCAGAGGAGGTGAGAGGGACGGCGAGTGGGACCTCTCGGCCGGAGG  
[D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S]  
棒組み1

61 ATCTCCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCACTCTCCCTGCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCTCC  
120 61 TAGAGAACGTCAGATCTCAAGAACGATCTCAATACCCCTGTCGATAAACAGAAC  
[I S C][R S S Q S L L H S N G Y N Y L D][W]  
棒組み1 CDR 1

121 TACCTGGCAGAACGGCAGTCTCCACAGCTCCATCTATGGATTCTAACACTGGGGCT  
180 121 ATGGACGTGTCGGCTCCAGTCAGAGGAGGTGTCAGGAGACTAGATAAACCCAAAGATTAGCC  
[Y L Q K P G Q S P Q L L I Y][L G S N R A]  
棒組み2 CDR 2

240 181 TCGGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGGACTGGGTCAGGCACAGATTTCACACTGAAATC  
300 AGGCCCCAGGGACTCTCAAGTCACCGTCACTACTGGGTCGTTAAATGTC  
[S][G V P D R F S G S G S G S G T D F T L K I]  
棒組み3 CDR 3

301 CAGACGTTGGCAGGACCCAGGTGAAATC  
336 GTCTGCAAGCCGGTCTGGTTCCACCTTGTAGTT  
[Q T][F G Q G T K V E I K]  
棒組み4

FIGURE 8

【図9】

1 ATGGGATGGAGCTGATCATCCTCTCTGGTATCACAGCTACAAGTGTCCACTCCAG  
1 TACCCCTACCTCGACATAGTAGGAGAGAACCATAGTTGTCGATGTCACAGGTGAGGGTC  
[M G W S C I I L F L V S T A T S V H S][Q]  
シグナルペプチド

61 GTCCAACTGCGAGCAGCTGGGGCTGAGCTTGTGAGGCTGGACTTCAGTGAAGCTGTCC  
120 61 CAGGGTTGACGTCGAGGACCCGACTCGAACACTTCGGACCCCTGAGTCACCTCGACAGG  
[V Q L Q Q P G A E L V K P G T S V K L S]  
棒組み1

121 TGCAAGGGTTATGGCTACACCTTACCAAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGAGGGCCT  
180 121 ACGGTCCAAATACCGATGTTGAGTGTGAGTCACTGACCCACTTCGCTCCGG  
[C K G Y G Y T F T][S Y W M H][W V K Q R P]  
CDR1

181 CGACAAGGCTTGTGAGTGGAGAGTTGATCTCTGAGAGTAAATCAACTAACAT  
240 181 CCTGTTCCGGACTCCTAGCCCTCTACTAGGAGGACTCTCATTTGATGTT  
[G Q G L E W I G][E I D P S E S N T Y N]  
棒組み2 CDR 2

241 CAAARATTCRAGGCGAACGGCACATTGACTGTAGACATTTCTCCAGCACACCCATCAG  
240 241 GTTTTTAAGTCCCGTACCGGTGACTGACATCTGTAAAGGGGTCGTCGGATGTC  
[Q K F K G][K A T L T V D I S S S T A Y M]  
棒組み3

301 CAGCTCAGCAGCTGACATCTGAGGACACTGCGGGTCACTATTGTCAGAACAGGGGGTTAC  
360 301 GTGGACTCGCTGGACTGTAGACTCCCTGAGAGGGCAGAGTAAACACCTTCCCGGAC  
[Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R][G G Y]  
棒組み4

361 GACGGATGGGACTATGCTATTGACTACTGGGTCAGGACCTCAGTCACCCCTCTCTCA  
420 361 CTGCGCTACCCCTGAGTACGATAACTGAGTACCCGAGTGGAGTCAGTGCAGAGGGAGT  
[D G W D Y A I D Y][W G Q G T S V T W S S]  
CDR 3

FIGURE 9

【図10】

1 ATGGAGTTGGCTGAGCTGGCTTTCTGGCTATTAAAGGTGTCAGTCAG  
60 1 TACCTCAAACCCGACTCGACCGAAAAAGAACACCGATAAAATTCACAGGTACAGTC  
[M E F G L S W L F L V A I L K G V Q C][Q]  
シグナルペプチド

61 GTGCAGCTCTGCACTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCTGGGCTCAGTGAAGGTTCC  
120 61 CACGTCGAAACAGTCAGACCCGACTCCACTCTTCGAGACCCGGAGTCACCTCCAAAGG  
[V Q L V Q S G A E V K P G A S V K V S]  
棒組み1

180 121 TGCAAGGCTCTGATCACCTTCACTAGCTAAGCTATGCTTGGGTCAGGCCAGGGCCC  
180 ACCTTCCGAGACCTATGTTGAGTGTGCACTGATCACCTAACCCACCGGTCGGGG  
[C K A S G Y T F T][S Y A M H][W V R Q A P]  
CDR 1

240 181 GGACAAGGCTTGTGAGTGGAGGCTGAGTCAACGGCTGGCAATGTAACACAAAATATCA  
240 CCTGTTCCGAACTCCTACCTACTAGGAGGACTCTCATTTGATGTT  
[G Q R L E W M G][W I N A N T K Y S]  
棒組み2 CDR 2

300 241 CAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCACCATTAACAGGACACATCCCGAGCACAGCTACATG  
360 301 GCTCTCAAGGCTGGACTCTAGCTAGTGAATGGCTCCCTGCTAGGGCCTGTCGGATGTC  
[Q K F Q G][R V T I T R D T S A S T A Y M]  
棒組み3

360 301 GAGCTGAGCGCCTGAGACTGAGACACCGCTGTCGTTACTCTGTCGAGAGGGAGTTAC  
360 CTCGACTCGCTGGACTCTAGACTCTGTCGGAGACACATAATGACACGGCTCTCCAAAGG  
[E L S S L T S E D T A V Y Y C A R][G G Y]  
棒組み4

420 361 TATGGGTCGGGGAGCAACTCTGGGGCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCCTCA  
414 ATACCAAGCCCTCGTGTGAGTACCCGGTCCCTTGGGACAGTGGCAGAGGGAGT  
[Y G S G S N Y][W G Q G T L V T W S S]  
CDR 3

FIGURE 10

【 図 1 1 】

FIG. 11

【図12】

FIG. 12

【图 13】

重鎖オリゴ		二本鎖断片
L1	5'- TTT CGG GAG GTG ATG TTG TGA CTC AAA GTC CAC TCT CCC TGC CTG CCA CTC CGG GAG AAC CAG CTT CTA TCT CTT GCA GGT CTA GTC AGA G	LA
L2	5'- ACT GGC CAG GCT TCT CCA CGG GGT ACC AAG ACA AAA AGG TGT CTC CAT AAC TCT TTG CAA GAC TCT GAC TGT AAC TGC AAG AGA TAG AAG CTG GTT C	LA
L3	5'- CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCT AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC ACT GGT TC	LB
L4	5'- ACT CGC GAG ATC TTG AGT GTG AAA TCT GTC CCT GAA CCA CTG CCA CTG AAC CTG TCT GGC ACC CCA GAA AAA ATC TTG GAA ATC	LB
L5	5'- TCT CGC GAG TAG AGG CTG AGG ACC TGG GAG TGT ATT ACT GCT TAC AAG GTA CCA ATC AGC CGT AAC C	LC
L6	5'- ATG GCG CGG CAT CAG CCC GTT TTA TTT CCA CCT TGG TCC CCT GTC CGA ACG TGT ACG GCT GAT GTG TAC CTT GTA AGC AGT AAT AC	LC
重鎖オリゴ		二本鎖断片
H1	5'- ATA AGC TTG GCC ATG AAA TGC ACC TGG GTC ATT CTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG CTC CAA CTA GTG CAA CGG TTA	HA
H2	5'- TAA CGG GTG CAC TAG TTG GAC CTG GGA GTG GAC ACT TGT AGC TGT TGA TAC CAA GAA GAG AAT GAC CCA GGT GCA TTT CAT GGC CAA GKT TAT	HA
H3	5'- CAA CTA GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTT AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC	HB
H4	5'- TAA CGG GAA CTC TAG ACC TTG GCC AGG CGG CTG CCT CAC CCA ATG CAT CCA TGA GCT GGT GAA GGT GTC GCC AGA ACC CTT GCA GGA C	HB
H5	5'- CGT CTA GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGA CGC GTCA	HC
H6	5'- TAA CGG GTG TGC TAG CGG AAA TGT CTA CAG TCA ATG TGA CGC DTC CCT CTC TGA ATT TTG GAT TGT AGT TAG TAT TAC T	HC
H7	5'- CGG CTA GCA GAG CCT ACA TGG AGCT CTA GCA GCC TGA GAT CTG AGG ACA CTG CGG TCT ACT ATT GTG CAA GAG GGG GTT ACG ACG GAT G	HD
H8	5'- TCA CGG CGG TGA CCA GGG TGC CTT GAC CCC AGT AGT CAA TAG CAT AGT CCC ATC CGT CCT AAC CCC CTC TTG CAC AAT AGT AGA C	HD
H9	5'- CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACG A	HE
H10	5'- TCA CGG GTT CGG GGA AGT AGT CCT TGA CCA GGC AGC CCA GGG CGG CTG TGC CCC CAG AGG TGC TCT TGG AGG AGG GTG CCA GGG G	HE

FIGURE 13

【図 1-4】

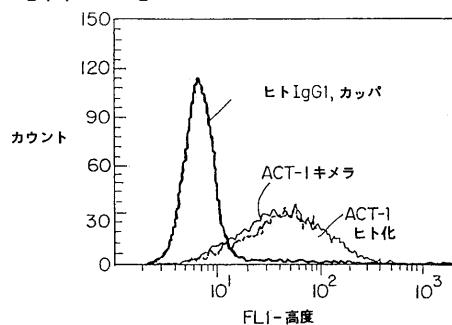


FIG. 14

【図 19】

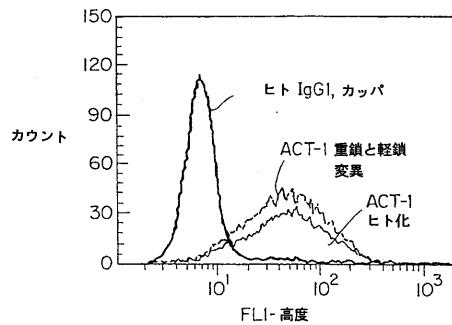


FIG. 19

【図 15】

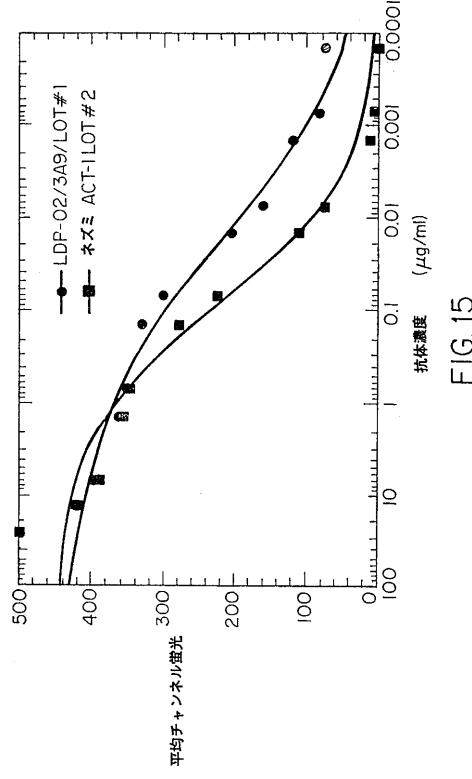


FIG. 15

【図 16】

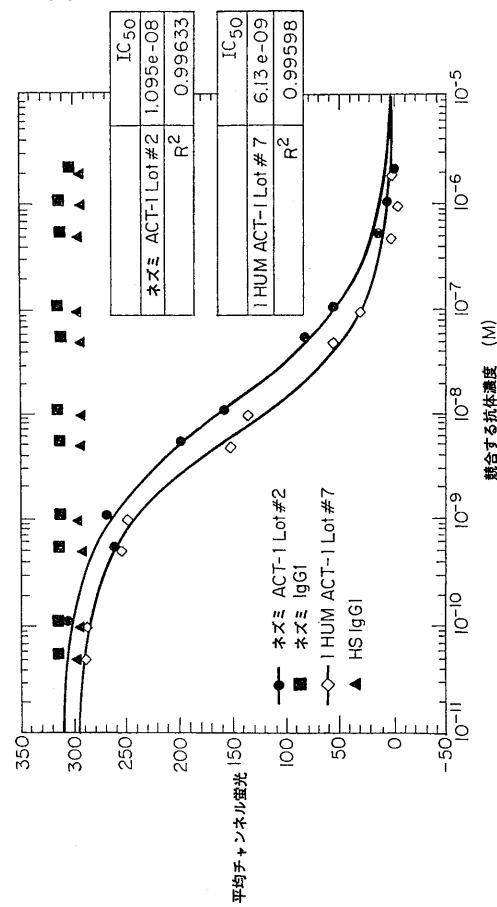


FIG. 16

【図 17】

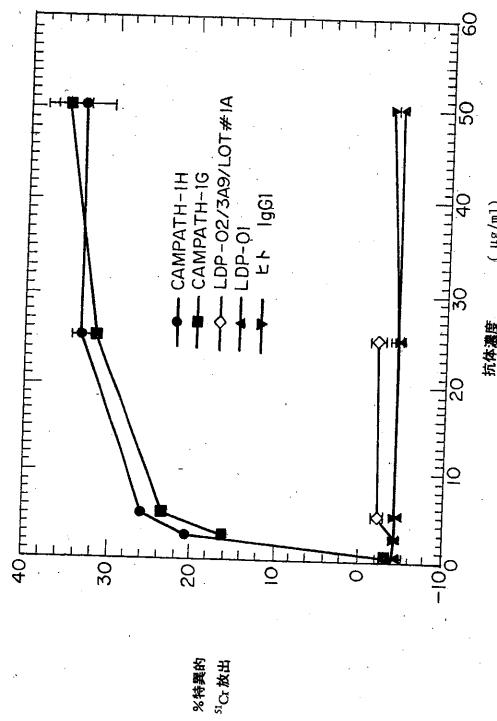


FIG. 17

【図 18 A】

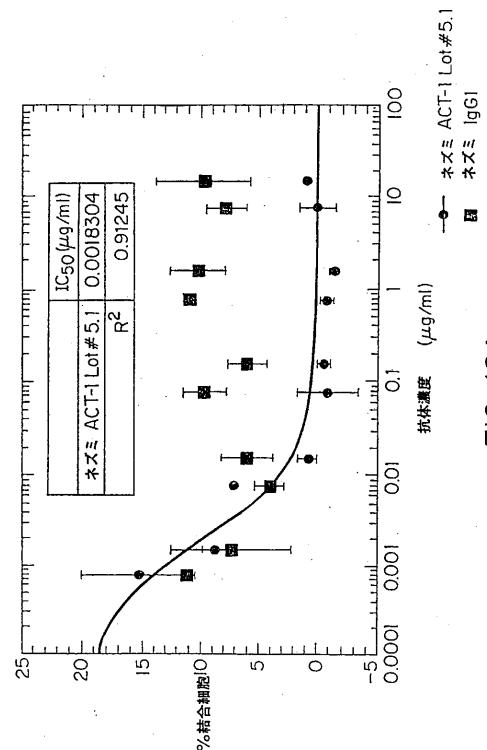


FIG. 18A

【図 18B】

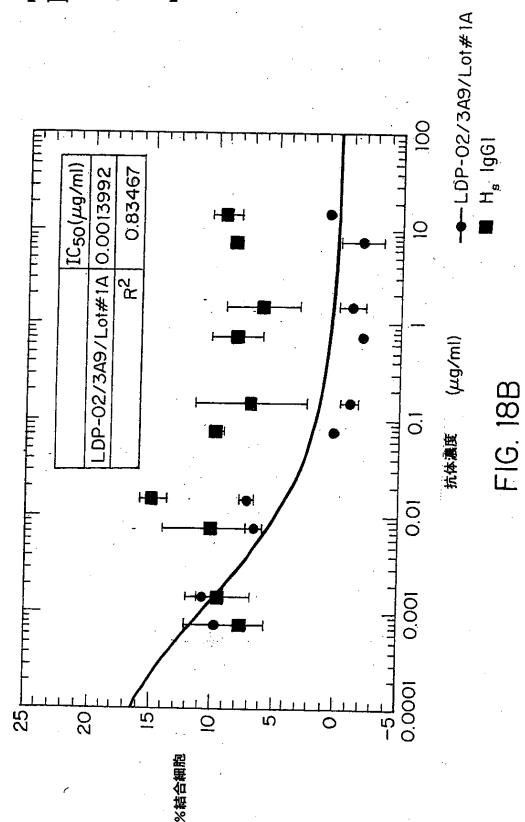


FIG. 18B

---

フロントページの続き

- (72)発明者 リングラー, ダグラス, ジェイ .  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02151 リヴィア, ナンバー 1008, オーシャン  
アヴェニュー 382
- (72)発明者 ジョーンズ, エス ., タラン  
英国 ハートフォードシャー ダブリュディー7 8エイジー, ラドレット, クライストチャーチ  
クレッセント 1
- (72)発明者 ニューマン, ウォルター  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02115 ボストン, ナンバー 3, ダーラム ストリー  
ト 3
- (72)発明者 サンダニヤ, ホセ  
英国 ミドルセックス イーエヌ1 1ティーイー エンフィールド, リンカーン ウェイ 22  
エイ
- (72)発明者 ベンディグ, マリー, エム .  
英国 ロンドン エヌ20 0エックスエル グレシャム アヴェニュー 26

審査官 富永 みどり

- (56)参考文献 国際公開第95/019790 (WO, A1)  
特表平04-502408 (JP, A)  
特開平06-303990 (JP, A)  
The Journal of Immunology, 1993年, Vol.151, No.11, p.6482-6489  
Protein Engineering, 1991年, Vol.4, No.7, p.773-783  
The Journal of Immunology, 1993年, Vol.151, p.717-729  
The Journal of Immunology, 1996年, Vol.156, 719-726

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
PubMed  
JSTPlus(JDreamII)