(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2006 年11 月16 日 (16.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/121159 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/309577

(22) 国際出願日: 2006 年5 月12 日 (12.05.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-139396 2005 年5 月12 日 (12.05.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和▲醗▼酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 勝弘 (MORI, Katsuhiro). 中村 和靖 (NAKAMURA, Kazuyasu). 佐々木 由香 (SASAKI, Yuka). 太田 聡 (OHTA, So).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 明細書とは別に規則１３の２に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示.
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** HUMANIZED CDR-GRAFTED ANTIBODY SPECIFICALLY REACTING WITH CD10 AND ANTIBODY FRAGMENT OF THE SAME

(54) **発明の名称:** CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片

(57) **Abstract:** It is intended to provide a humanized CDR-grafted antibody specifically reacting with CD10 or an antibody fragment of the same; a DNA encoding a humanized CDR-grafted antibody or an antibody fragment of the same; a recombinant vector containing this DNA; and a transformant obtained by transferring this recombinant vector into a host cell. It is further intended to provide a drug and a remedy for CD10-related diseases which contain, as the active ingredient, a humanized CDR-grafted antibody specifically reacting with CD10 or an antibody fragment of the same.

(57) 要約: 本発明は、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体または該抗体断片、ヒト型CDR移植抗体または該抗体断片をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含有する組換え体ベクター、該組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株を提供する。また、本発明は、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体または該抗体断片を有効成分として含有する医薬およびＣＤ１０関連疾患の治療薬を提供する。

WO 2006/121159 A1

明 細 書

CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片

技術分野

[0001] 本発明は、CD10に対して特異的に反応するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は、該抗体およびその抗体断片を用いる医薬に関する。

背景技術

[0002] 血液学の分野では抗血清あるいはモノクローナル抗体を用いた解析により、早くから血球関連の分化抗原の研究が進められ、CD(Cluster of differentiation)分類として国際的に整理が進んできた。現在白血球を中心として様々な細胞に発現する数多くの抗原がCD分類されている(非特許文献1)。

また、モノクローナル抗体を用いた解析により、腫瘍関連抗原と呼ばれる腫瘍に特異的あるいは選択的に発現している抗原の生化学的解析や遺伝子のクローニング、機能解析が進められてきた。現在では、白血病、リンパ腫を中心とした造血器腫瘍においても腫瘍関連抗原の発現解析は血清診断及び病期進展のモニタリングに広く使用されている。

[0003] CD10は前述のような過程で見出された分子で、急性リンパ球性白血病(acute lymphoblastic leukemia;ALL)細胞表面に発現が認められ、common acute lymphoblastic leukemia antigen(CALLA)と呼ばれていた腫瘍関連抗原の一つの分子である(非特許文献2)。その後の研究により、ALLのほか、慢性骨髄性白血病(chronic myelocyte leukemia; CML)やバーキットリンパ腫等の非ホジキンリンパ腫等の造血器腫瘍にも発現していることが明らかになった。また、白血球では好中球、一部のB細胞にも発現が認められることが知られている(非特許文献3)。

[0004] 以前からの生化学的な解析により、CD10は分子量約100kDaの2型膜貫通型糖蛋白質であることがわかっていたが、さらに、分子生物学的手法を用いた解析により、これまでneutral endopeptidase (NEP、EC3.4.24.11)、enkephalinaseと呼ばれていた分子と同一であることが明らかになった。また、CD10はenkephalin、atrial natriuretic factorもしくはatrial natriuretic peptide(ANFまたはANP)、substans P等、種々のペプチ

ドホルモンの分解活性を持ち、それらの活性を調節している(非特許文献3、4)。また、B細胞の増殖・分化等に関与していることも報告された(非特許文献4)。

[0005] さらに最近、造血器腫瘍のみならず、肝癌、腎癌、移行上皮癌、前立腺癌、子宮内膜癌等の固形癌あるいはその間質組織にも発現していることが報告されている(非特許文献5、6、7)。

以上のことから、CD10を発現する細胞を患者体内から除去するための治療剤は、CD10が発現しているリンパ腫、白血病等の種々の癌、およびCD10が発現している細胞(B細胞、好中球)が介在する炎症性疾患の治療剤として有用であることが期待される。

[0006] これまでに、CD10に対する抗体は、J5抗体(非特許文献8)およびNL-1抗体(非特許文献9)などが報告されているが、これらの抗体はいずれもマウス抗体である。また、マウスミエローマ細胞X63Ag8.653を宿主産生細胞に用いたヒトCD10発現細胞に対して細胞傷害活性を示すヒトIgG1型の抗CD10キメラ抗体(非特許文献10、特許文献1～3)も報告されている。しかしながら、CD10に特異的に反応性を有するCDR移植抗体は知られていない。

[0007] 一般にヒト以外の動物の抗体をヒトに投与すると、異物として認識され、副作用を惹起することや(非特許文献11～14)、抗体の体内からの消失を速めることにより(非特許文献12、14、15)、抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている(非特許文献16、17)。

これらの問題点を解決するために遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体をヒト型CDR移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられている(非特許文献18)。ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、副作用が軽減され(非特許文献19)、治療効果が延長される(非特許文献20、21)。

非特許文献1:Expert Opin. Biol. Ther., 1, 375 (2001)

非特許文献2:J. Exp. Med., 168, 1247 (1988)

非特許文献3:Blood, 73, 62 (1989)

非特許文献4:Blood, 82, 1052 (1993)

非特許文献5:Anticancer Res., 17, 3233 (1997)

非特許文献6:Am. J. Pathol., 159, 1415 (2001)、

非特許文献7:Am. J. Clin. Pathol., 113, 374 (2000)]

非特許文献8:Blood, 58, 648 (1981)

非特許文献9:Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 79, 4386(1982)

非特許文献10:Cancer Res., 47, 999 (1987)

非特許文献11:J. Clin. Oncol., 2, 881 (1984)

非特許文献12:Blood, 65, 1349 (1985)

非特許文献13:J. Natl. Cancer Inst., 80, 932 (1988)

非特許文献14:Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1242 (1985)

非特許文献15:J. Nucl. Med., 26, 1011 (1985)

非特許文献16:J. Immunol., 135, 1530 (1985)

非特許文献17:Cancer Res., 46, 6489 (1986)

非特許文献18:Nature, 321, 522 (1986)

非特許文献19:Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 4220 (1989)

非特許文献20:Cancer Res., 56, 1118 (1996)

非特許文献21:Immunol., 85, 668 (1995)]

特許文献1:JP1966042

特許文献2:EP184187

特許文献3:US4935496

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体、該抗体を有効成分として含有するCD10関連疾患の治療薬を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の(1)～(17)に関する。

(1) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8で示されるアミノ酸配列、または配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、1番目のGlu、16番目のArg、18番目のLeu、42番目のGly、80番目のTyr、84番目のAsnおよび98番目のArgから選ばれ

る少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[0010] (2) 抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号10で示されるアミノ酸配列、または配列番号10で示されるアミノ酸配列のうち、9番目のAsp、10番目のSer、11番目のLeu、22番目のAsn、42番目のGly、43番目のGln、44番目のPro、47番目のLeu、48番目のLeu、61番目のAsp、71番目のAsp、72番目のPhe、73番目のThr、79番目のLeu、80番目のGlnおよび86番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[0011] (3) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8で示されるアミノ酸配列、または配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、1番目のGlu、16番目のArg、18番目のLeu、42番目のGly、80番目のTyr、84番目のAsnおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号10で示されるアミノ酸配列、または配列番号10で示されるアミノ酸配列のうち、9番目のAsp、10番目のSer、11番目のLeu、22番目のAsn、42番目のGly、43番目のGln、44番目のPro、47番目のLeu、48番目のLeu、61番目のAsp、71番目のAsp、72番目のPhe、73番目のThr、79番目のLeu、80番目のGlnおよび86番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(1)または(2)記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[0012] (4) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8、35または37で示されるアミノ酸配列のいずれかを含む、(1)または(3)に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(5) 抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号10、12または33で示されるアミノ酸配列のいずれかを含む、(2)～(4)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[0013] (6) 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8、35または37で示されるアミノ酸配列のいずれかを含み、かつ抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配

列番号10、12または33で示されるアミノ酸配列のいずれかを含む(3)～(5)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(7) 配列番号1で示されるアミノ酸配列の52～750番目に存在するエピトープに反応することを特徴とする、(1)～(6)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[0014] (8) FERM BP-10099から生産されるモノクローナル抗体が認識するエピトープに反応することを特徴とする、ヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(9) 抗体断片が、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、1本鎖抗体 (scFv)、2量体化可変領域 (V領域) 断片 (Diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片 (dsFv) および相補性決定領域 (CDR) を含むペプチドから選ばれる抗体断片である(1)～(8)のいずれか1項に記載の抗体断片。

[0015] (10) (1)～(9)のいずれか1項に記載されたヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と結合しているヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

(11) (1)～(10)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

[0016] (12) (11)記載のDNAを含有する組換え体ベクター。

(13) (12)記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(14) 形質転換株が、HV0LV9MS705(FERM BP-10099)である(13)記載の形質転換株。

[0017] (15) (13)または(14)記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に(1)～(9)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とするヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片の製造方法。

(16) (1)～(9)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を有効成分として含有する医薬。

[0018] (17) (1)～(9)のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を有効成分として含有するCD10関連疾患の治療薬。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、CD10に特異的に結合するヒト型CDR移植抗体が提供される。本発明の抗体は、ヒトに対する治療薬として用いることができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]は、プラスミドpCRHV0の構築を示した図である。

[図2]は、プラスミドpCRHV2の構築を示した図である。

[図3]は、プラスミドpCRLV0の構築を示した図である。

[図4]は、プラスミドpCRLV9の構築を示した図である。

[図5]は、抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061chimeraHLV0の構築を示した図である。

[図6]は、抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HVOLV0の構築を示した図である。

[図7]は、抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HVOLV9の構築を示した図である。

[図8]は、抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV2LV9の構築を示した図である。

[図9]は、精製したMS705/HV0LV9抗体および、MS705/HV2LV9のヒト非ホジキンリンパ腫細胞株であるDaudi細胞またはRaji細胞に対するADCC活性を示した図である。横軸に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度におけるADCC活性(%)をそれぞれ示す。Aは標的細胞にDaudi細胞を、Bは標的細胞にRaji細胞を用いた結果をそれぞれ示す。

[図10]は、精製したMS705/HV0LV9抗体および、MS705/HV2LV9のヒト非ホジキンリンパ腫細胞株であるDaudi細胞に対するCDC活性を示した図である。横軸に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度におけるCDC活性(%)をそれぞれ示す。

[図11]は、横軸は移植後の日数、縦軸は体重をそれぞれ表したグラフである。×はコントロール群、■はMS705/KM3317 1 mg/kg投与群、○はMS705/HV2LV9 0.1 mg/kg投与群、△はMS705/HV2LV9 1 mg/kg投与群をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

[図12]は、横軸は移植後の日数、縦軸は生存率をそれぞれ表したグラフである。×はコントロール群、■はMS705/KM3317 1 mg/kg投与群、○はMS705/HV2LV9 0.1 mg/kg投与群、△はMS705/HV2LV9 1 mg/kg投与群をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0021] 本発明におけるCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体(抗CD10CDR移植抗体)およびその抗体断片 (以下、両者を総称して本発明の抗体と表記することもある)としては、抗体の重鎖(H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8で示されるアミノ酸配列、または配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、1番目のGlu、16番目のArg、18番目のLeu、42番目のGly、80番目のTyr、84番目のAsnおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片、抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域(V領域)が、配列番号10で示されるアミノ酸配列、または配列番号10で示されるアミノ酸配列のうち、9番目のAsp、10番目のSer、11番目のLeu、22番目のAsn、42番目のGly、43番目のGln、44番目のPro、47番目のLeu、48番目のLeu、61番目のAsp、71番目のAsp、72番目のPhe、73番目のThr、79番目のLeu、80番目のGlnおよび86番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片、抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8で示されるアミノ酸配列、または配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、1番目のGlu、16番目のArg、18番目のLeu、42番目のGly、80番目のTyr、84番目のAsnおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号10で示されるアミノ酸配列、または配列番号10で示されるアミノ酸配列のうち、9番目のAsp、10番目のSer、11番目のLeu、22番目のAsn、42番目のGly、43番目のGln、44番目のPro、47番目のLeu、48番目のLeu、61番目のAsp、71番目のAsp、72番目のPhe、73番目のThr、79番目のLeu、80番目のGlnおよび86番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、CD10に特異的に

反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片であればいずれでもよく、好ましくは、抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8、35または37で示されるアミノ酸配列のいずれかを含む、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片、抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域(V領域) が、配列番号10、12または33で示されるアミノ酸配列のいずれかを含む、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片、抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8、35または37で示されるアミノ酸配列のいずれかを含み、かつ抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号10、12または33で示されるアミノ酸配列のいずれかを含むCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片などがあげられる。

[0022] これらのアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつCD10と特異的に反応する抗体または抗体断片も本発明の範囲に包含される。

本発明のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてもよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

[0023] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群:ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、
シクロヘキシルアラニン

B群:アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノ

アジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群:アスパラギン、グルタミン

D群:リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群:プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群:セリン、スレオニン、ホモセリン

G群:フェニルアラニン、チロシン

また、本発明の抗体は、好ましくは、配列番号1に示されるアミノ酸配列の52～750番目に存在するエピトープに特異的に反応するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片、FERM BP-10099から生産されるモノクローナル抗体が認識するエピトープに反応することを特徴とする、ヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片があげられる。

[0024] ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいう。

本発明のヒト型CDR移植抗体は、CD10に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびH鎖C領域(以下、CLと表記する)をコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0025] ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列を選択方法としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、またはヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)などがあげられる。

[0026] 本発明の抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン(以下、hIgと表記する)に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのものが好適であり、さらにhIgGクラスに属するg1、g2、g3、g4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移

植抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。

[0027] 本発明の抗体断片としては、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、scFv、Diabody、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合（S-S結合）で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0028] 本発明のFabは、本発明のCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

$F(ab')_2$は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のS-S結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0029] 本発明の$F(ab')_2$は、本発明のCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはS-S結合させ、作製することができる。

Fab'は、上記$F(ab')_2$のヒンジ領域のS-S結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0030] 本発明のFab'は、本発明のCD10に特異的に反応する$F(ab')_2$を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のFab'をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0031] scFvは、1本のVHと1本のVLとを12残基以上の適当なペプチドリンカー（P）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のscFvは、本発明のCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0032] Diabodyは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性または異なる抗原に対する2特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のDiabodyは、例えば、CD10に特異的に反応する2価のDiabodyは、本発明のCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、3～10残基のポリペプチドリンカーを有するscFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することによりDiabodyを発現させ、製造することができる。

[0033] dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のS-S結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明のdsFvは、本発明のCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0034] CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。

複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることにより製造することができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、本発明のCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのCDRをコードするcDNAを構築し、該cDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生

物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

[0035] 本発明の抗体は、本発明の抗体に薬剤を化学的にあるいは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明の抗体の誘導体は、本発明のCD10に特異的に反応する抗体または抗体断片のH鎖或いはL鎖のN末端側或いはC末端側、抗体または抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体または抗体断片中の糖鎖に薬剤を化学的手法（抗体工学入門、金光修著、(株) 地人書館 (1994)）により結合させることにより製造することができる。

[0036] または、本発明のCD10に特異的に反応する抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質などの薬剤をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入するという遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

薬剤としては、化学療法剤、抗体医薬、サイトカインなどの免疫附活剤、放射性同位元素、イムノアジュバンドなどがあげられる。

[0037] さらに、抗体に結合させる薬剤は、プロドラッグの形態を取ってもよい。本発明におけるプロドラッグとは、腫瘍環境に存在する患者自身の酵素などによって化学的な修飾を受け、癌細胞を障害する作用を有する物質に変換される薬剤をいう。

化学療法剤としては、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤、キナーゼ阻害剤などのいかなる化学療法剤も包含される。化学療法剤としては、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ドキソルビシンリポ（ドキシル）、エピルビシン、ゲムシタビン（ゲムザール）、ダウノルビシン、ダウノルビシンリポ（ダウノゾーム）、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エト

ポシド、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル(タキソール)、ドセタキセル(タキソテア)、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、CPT-11、10-ヒドロキシ-7-エチル-カンプトテシン(SN38)、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルビシン、メスナ、イリノテカン、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコーチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、UFT、オキザロプラチン、ゲフィチニブ(イレッサ)、イマチニブ(STI571)、エルロチニブ、Flt3阻害剤、VEGFR阻害剤、FGFR阻害剤、ラディシコール、17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール-トランスレチノイン酸、サリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D-ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリビン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン(ターグレチン)、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール(アリミデックス)、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、ゲムツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、131トシツテマブ、タルグレチン、ONTAK、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミンおよびメトトレキセート、などがあげられる。

[0038] 化学療法剤と抗体とを結合させる方法としては、グルタールアルデヒドを介して化学療法剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介して化学療法剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法等があげられる。

抗体医薬としては、癌細胞を直接障害する腫瘍細胞に発現する抗原に対する抗体、あるいは腫瘍細胞の増殖や転移など、腫瘍の病態形成に関わる抗原に対する抗体のほかに、抗体を投与する生体内の免疫を調節する抗体、抗体を投与する生体内の血管新生を阻害する抗体などがあげられる。

[0039] 癌細胞を直接障害する腫瘍細胞に発現する抗原としては、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7.1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7.2)、HLA-Class IIなどがあげられる。

抗体を投与する生体内の免疫を調節する抗体の抗原としては、CD4、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子(CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3、B7-H4)、B7ファミリー分子のリガンド(CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、BTLA)、OX-40、OX-40リガンド、CD137、TNF受容体ファミリー分子(DR4、DR5、TNFR1、TNFR2)、TRAILファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー(TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4)、RANK、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体4、サイトカイン(IL-1α、IL-1β、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、TGFβ、TNFα等)、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン(SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、CTACK等)、これらのケモカインの受容体が好ましい。

[0040] 抗体を投与する生体内の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、VEGF、Angiopoietin、FGF、EGF、PDGF、IGF、EPO、TGFβ、IGF、IL-8、Ephilin、SDF-1などがあげられる。

免疫附活剤としては、NK細胞、マクロファージ、好中球などの細胞を亢進するサイトカインであればいかなるものでもよいが、具体例としては、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、インターロイキン-2、インターロイキン-12、インターロイキン-15、インターロイキン-18、インターロイキン-23、顆粒球刺激因子(G-CSF)、顆粒球・マクロファージ刺激因子(GM-CSF)、マクロファージ刺激因子(M-CSF)などがあげられる。また、免疫附活剤として知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、β(1→3)グルカン(レンチナン、シゾフィラン)、αガラクトシルセラミド(KRN7000)、菌体粉末(ピシバニール、BCG)、菌体抽出物(クレスチン)が

あげられる。 放射性同位元素としては、^{131}I、^{125}I、^{90}Y、^{64}Cu、^{199}Tc、^{77}Lu、^{211}At等があげられる。放射性同位元素は、クロラミンT法等によって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、methylbenzyldiethylene- triaminepentaacetic acid (MX-DTPA)などがあげられる。

[0041] また本発明の抗体は、1つ以上の他の薬剤または放射線照射と組み合わせて投与してもよい。他の薬剤としては、上述の化学療法剤、抗体医薬、サイトカインなどの免疫附活剤等が含まれる。 放射線照射としては、X線、γ線などの光子(電磁波)照射、電子線、陽子線、重粒子線などの粒子線照射などが含まれる。

組み合わせて投与する方法としては、本発明の抗体との同時投与でもよいし、また、本発明の抗体の投与と前後して投与しても構わない。

[0042] 以下に、本発明のCD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体およびその抗体断片の作製方法、活性評価方法およびそれらの使用方法について説明する。

1. ヒト型CDR移植抗体の作製

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

[0043] ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体のg1サブクラスのCHおよびκクラスのCLなどがあげられる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAとしてはエキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることができ、また、cDNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 (Cytotechnol., 3, 133 (1990))、pAGE103 (J. Biochem., 101, 1307 (1987))、pHSG274 (Gene, 27, 223 (1984))、pKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1527 (1981))、pSG1bd2-4 (Cytotechnol., 4, 173 (1990))、pSE1UK1Sed1-3 (Cytotechnol., 13, 79 (1993)) などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用

いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーター (J. Biochem., 101, 1307 (1987)、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR (Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987))、免疫グロブリンH鎖のプロモーター (Cell, 41, 479 (1985)) とエンハンサー (Cell,33, 717 (1983)) などがあげられる。

[0044] ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (タンデム型) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい (J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994))。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (WO97/10354)、pEE18 (Hybridoma, 17, 559 (1998)) などがあげられる。

[0045] 構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは、以下の様にして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられるが、それらの中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列と少なくとも60%以上とできるだけ高い相同性を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

[0046] 次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配

列に見られるコドンの使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, U S Dept. Health and Human Services, 1991) や目的のヒト以外の動物の抗体の塩基配列を考慮して塩基配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配列に基づき、100～200塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから、VH、VLとも4本もしくは6本程度の合成DNAを設計することが好ましい。また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR反応後、増幅産物をp Bluescript II SK(-) (Stratagene社製) などのプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドを取得する。

[0047] (3) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991))。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLでは、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDR移植に伴い、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうからと考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基やCDRのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991))。ヒト型CDR移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析 (J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)) あるいはコンピューターモデリング (Prot

ein Engineering, 7, 1501 (1994)) などによる抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討するなどの種々の試行錯誤が必要である。

[0048] ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAを用いてPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

(4) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項1の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAの上流に、本項1の (2) および (3) で構築したヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項1の (2) および (3) でヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAの上流にそれらが適切な形で発現する様にクローニングすることができる。

[0049] (5) ヒト型CDR移植抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、本項1の(4)に記載のヒト型CDR移植抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト型CDR移植抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト型CDR移植抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、COS-7細胞 (ATCC CRL1651) が一般に用いられる (Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991))。COS-7細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法 (Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991))、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84,7413 (1987))などがあげられる。

[0050] 発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト型CDR移植抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法 (ELISA;Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) などにより測定できる。

(6) ヒト型CDR移植抗体の安定発現

本項1の (4) に記載のヒト型CDR移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト型CDR移植抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法(Cytotechnology, 3 ,133 (1990)) などがあげられる。

[0051] ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト型CDR移植抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞 (ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) が欠損したCHO細胞 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 77, 4216 (1980))、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞 (YB2/0細胞;ATCC CRL1662) などがあげられる。

[0052] 発現ベクターの導入後、ヒト型CDR移植抗体を安定に発現する形質転換株は、G418 sulfate (G418;SIGMA社製) などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる (J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994))。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地 (日水製薬社製)、GIT培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302培地 (JRH社製)、IMDM培地 (GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地 (GIBCO BRL社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (FBS) などの各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト型CDR移植抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性はELISAなどにより測定できる。また、形質転換株は、dhfr増幅系などを利用してヒト型CDR移植抗体の発現量を上昇させることができる (J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994))。

[0053] ヒト型CDR移植抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laborato

ry, Chapter 8 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996))。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE;Nature, 227, 680 (1970)) やウエスタンブロッティング法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) などで測定することができる。

[0054] 2. 抗体断片の作製

抗体断片は、本項1に記載のヒト化抗体を元に遺伝子工学的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。抗体断片としては、Fab、$F(ab')_2$、Fab'、scFv、Diabody、dsFv、CDRを含むペプチドなどがあげられる。

(1) Fabの作製

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテインA結合性を有するIgGサブクラスであれば、プロテインAカラムに通すことで、IgG分子やFc断片と分離し、均一なFabとして回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition (1995))。プロテインA結合性を持たないIgGサブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、Fabは低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition (1995))。また、Fabは、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することもできる。例えば、本項1の (2) および (3) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを、Fab発現用ベクターにクローニングし、Fab発現ベクターを作製することができる。Fab発現用ベクターとしては、Fab用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pIT106 (Science, 240, 1041 (1988)) などがあげられる。Fab発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にFabを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFabとすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、培養上清中に活性を持った

Fabが漏出する。リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一なFabを精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company (1992))。

[0055] (2) $F(ab')_2$の作製

$F(ab')_2$は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Fabと同様の精製操作により、均一な$F(ab')_2$として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press (1995))。また、本項2の (3) に記載のFab'をo-PDMやビスマレイミドヘキサン等のようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、DTNBで処理し、S-S結合させる方法によっても作製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

[0056] (3) Fab'の作製

Fab'は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することができる。例えば、本項1の (2) および (3) に記載の抗体のV領域をコードするDNAを、Fab'発現用ベクターにクローニングし、Fab'発現ベクターを作製することができる。Fab'発現用ベクターとしては、Fab'用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pAK19 (Bio/Technology, 10, 163 (1992)) などがあげられる。Fab'発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にFab'を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるFab'とすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破砕し、菌体外へ回収させることができる。リフォールディング後あるいは菌の破砕液からは、プロテインGカラム等を用いることにより、均一なFab'を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

[0057] (4) scFvの作製

scFvは遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌を用いて作製することができる。例えば、本項1の (2) および (3) に記載の抗体のVHおよびVLをコードするDNAを、12残基以上のアミノ酸配列からなるポリペプチドリンカーをコードするDNAを介して連

結し、scFvをコードするDNAを作製する。作製したDNAをscFv発現用ベクターにクローニングし、scFv発現ベクターを作製することができる。scFv発現用ベクターとしては、scFvのDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Pharmacia社製)、Phfa (Hum. Antibody Hybridoma, 5, 48 (1994)) などがあげられる。scFv発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面にscFvがファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、scFv発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズマ層にscFvを生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるscFvとすることができ、また、ペリプラズマ層に発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーション等の処理により菌を破砕し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破砕液からは、陽イオン交換クロマトグラフィー等を用いることにより、均一なscFvを精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS (1996))。

[0058] (5) Diabodyの作製

Diabodyは、上記のscFvを作製する際のポリペプチドリンカーを3～10残基程度にすることで、作製することができる。1種類の抗体のVHおよびVLを用いた場合には、2価のDiabodyを、2種類の抗体のVHおよびVLを用いた場合は、2特異性を有するDiabodyを作製することができる (FEBS Letters, 453, 164 (1999)、Int. J. Cancer, 77, 763 (1998))。

[0059] (6) dsFvの作製

dsFvは、大腸菌を用いて遺伝子工学的に作製することができる。まず、本項1の (2) および (3) に記載の抗体のVHおよびVLをコードするDNAの適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換されたDNAを作製する。作製した各DNAをdsFv発現用ベクターにクローニングし、VHおよびVLの発現ベクターを作製することができる。dsFv発現用ベクターとしては、dsFv用のDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pULI9 (Protein Engineering, 7, 697 (1994)) などがあげられる。VHおよびVLの発現ベクターを適当な大腸菌に

導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にVHおよびVLを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からVHおよびVLを得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のあるdsFvとすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、さらに精製することができる (Protein Engineering, 7, 697 (1994))。

[0060] (7) CDRペプチドの作製

CDRを含むペプチドは、Fmoc法あるいはtBoc法等の化学合成法によって作製することができる。また、CDRを含むペプチドをコードするDNAを作製し、作製したDNAを適当な発現用ベクターにクローニングし、CDRペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、CDRを含むペプチドをコードするDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pLEX (Invitrogen社製)、pAX4a+ (Invitrogen社製) などがあげられる。発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズマ層にCDRを含むペプチドを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズマ層からCDRを含むペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過等により、精製することができる (Protein Engineering, 7, 697 (1994))。

[0061] 3. 本発明の抗体の活性評価

精製した本発明の抗体の抗原との結合性、CD10発現細胞に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法 (Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993))、BIAcore™ 等を用いた表面プラズモン共鳴等により測定できる。抗原陽性培養細胞に対する細胞障害活性は、補体依存性細胞障害活性(以下、CDC活性と略記する)、抗体依存性細胞障害活性(以下、ADCC活性と略記する)等を測定し、評価する事が出来る (Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993))。産生サイトカイン量の変化はELISA法及び蛍光抗体法等により測定できる。

[0062] 4. ヒト型CDR移植抗体または抗体断片の使用方法

本発明の抗体は、CD10と特異的に結合するため、CD10が関与する疾患の治療において有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体やキメラ抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来するため、ヒト体内において高い効果を示し、かつ、免疫

原性が低く、その効果が長期間に渡り持続することが期待される。

[0063] また、抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖が、該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体またはその抗体断片とすることにより、抗体または抗体断片のADCC活性を増強させることができる。高いADCC活性を有する抗体は、癌をはじめとする各種CD10発現細胞関連疾患の予防および治療において有用である。

[0064] CD10が関与する疾患としては、癌疾患、炎症性疾患、または自己免疫疾患などがあげられる。癌疾患としては、血液癌、リンパ腫、多発性骨髄腫、腎癌、前立腺癌、肺癌、胃癌、肝癌、子宮内膜癌、膵癌、悪性黒色腫などがあげられる。

血液癌としては、白血病などがあげられ、特に急性リンパ性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)などがあげられる。

[0065] リンパ腫としては、非ホジキンリンパ腫などがあげられる。

炎症性疾患としては、成人呼吸促進症候群(ARDS)、嚢胞性線維症、肝炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、虚血再還流傷害などがあげられる。

自己免疫疾患としては、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群等などがあげられる。

[0066] 上述のCD10が関連する疾患は、患者の体内においてCD10が発現している細胞が異常に増加または減少することにより病態が進行している。したがって、本発明の抗体を有効成分とする医薬を用いることにより、これらのCD10が関与する疾患を治療することができる。

本発明の抗体は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

[0067] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

[0068] 経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

[0069] カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

[0070] 非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は本発明の抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体または抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

[0071] 担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。本発明の抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり0.01mg/kg～20mg/kgである。

[0072] 以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例 1

[0073] マウス抗CD10抗体NL-1の可変領域遺伝子のクローニング

1. 抗CD10抗体NL-1のV領域をコードするcDNAの単離、解析

(a)抗CD10抗体NL-1産生ハイブリドーマからのmRNAの調製

抗CD10抗体NL-1産生ハイブリドーマ細胞NL-1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4386(1982)]の5×10^7個より、mRNAの調製キットであるFast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、NL-1由来のmRNAを調製した。

[0074] (b)抗CD10抗体NL-1のH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

上記(a)項で取得したNL-1のmRNAの5μgから、TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Amersham-Pharmacia社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、両端にEcoRI-NotIアダプター配列を有するcDNAを合成した。合成したcDNAの全量を20μLの滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動に供し、IgGクラス抗体のH鎖に対応する約1.5kbのcDNA断片とκクラスのL鎖に対応する約1kbのcDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて回収した。

[0075] 次に、λZAPII Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit (Stratagene社製)を用いて、各cDNA断片0.1μgと、キットに添付されているλZAPIIベクターの1μgを、添付の使用説明書に従って連結した。それぞれの該反応液の2.5μLをGigapack III Gold Packaging Extracts (Stratagene社製)を用いて、添付の使用説明書に従って、λファージにパッケージングし、NL-1のH鎖cDNAライブラリーとして5×10^4個、L鎖cDNAライブラリーとして4×10^4個のファージクローンを取得した。次に、各々のファージを常法[Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, (1989)]に従い、ナイロンメンブレンフィルターHybondN+ (Amersham Pharmacia社製)上に固定した。

[0076] (c)抗CD10抗体NL-1のH鎖およびL鎖のcDNAのクローニング

上記(b)項で作製したNL-1のH鎖cDNAライブラリー、L鎖cDNAライブリーのナイロンメンブレンフィルターを、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham Pharmacia社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体のC領域のcDNAをプローブとして用いた。H鎖はマウスCγ2acDNAの断片[Nature, 283, 7

86 (1980)]、L鎖はマウスCκcDNAの断片[Cell, 22, 197 (1980)]をそれぞれ用いた。プローブに強く結合したファージクローンをH鎖、L鎖各10クローン取得した。次に、λZAPII Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit (Stratagene社製)の使用説明書に従って、in vivo excision法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。このようにして得られた各プラスミドに含まれるcDNAの塩基配列をBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製)を用いて、添付の使用説明書に従って反応後、同社の塩基配列自動分析装置ABI PRISM 377により塩基配列を解析し、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する完全長の機能的なH鎖cDNAを含むプラスミドおよびL鎖cDNAを含むプラスミドが得られたことを確認した。

[0077] (d)抗CD10抗体NL-1のV領域のアミノ酸配列の解析

H鎖cDNAを含むプラスミドpNL-1Hに含まれていたNL-1のVHの全塩基配列を配列番号29に、該配列から推定されるNL-1のVHの全アミノ酸配列を配列番号30に、プラスミドpNL-1Lに含まれていたNL-1のVLの全塩基配列を配列番号31に、該配列から推定されるNL-1のVLの全アミノ酸配列を配列番号32にそれぞれ示した。

[0078] 配列番号30および32に表されるNL-1のVHおよびVLアミノ酸配列を既知の抗体の配列データ[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較し、さらに精製した抗CD10抗体NL-1のVHおよびVLのN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーPPSQ-10 (Shimadzu社製)を用いて解析した結果と比較した。その結果、単離した各々のcDNAは分泌シグナル配列を含む抗CD10抗体NL-1のH鎖およびL鎖をコードする完全長cDNAであった。

実施例 2

[0079] CD10に特異的に結合するヒト型CDR移植抗体の作製

1. CD10に特異的に結合するヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAの設計

(1) CD10に特異的に結合するヒト型CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列の設計

まず、CD10に特異的に結合するヒト型CDR移植抗体 (以下、抗CD10CDR移植抗体と称す) のVHのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

[0080] 配列番号2、3および4に示したVHのCDR1、2および3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。BLASTP法[Nucleic Acid Res., 25, 3389 (1997)] により、NL-1と相同性の高いヒト抗体を既存の蛋白質のアミノ酸配列データベース中より検索した。相同性スコアと実際のアミノ酸配列の相同性を比較したところ、SWISSPROTデータベースアクセッションナンバーAAA69734に記載のIg Heavy chain[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1691, 6146 (1990)]が87.4%を示し、最も相同性の高いヒト抗体であったため、この抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。ただしデータベース上のクローンAAA69734のN末端1番目のアミノ酸はヒト抗体の配列では出現頻度の低いグルタミン;Gln であった。そこで、1番目のアミノ酸については、任意のヒト抗体の配列[Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]においても高頻度に認められるグルタミン酸;Gluに置換した。

[0081] 以上のようにして決定したヒト抗体のFRのアミノ酸配列の適切な位置に配列番号2、3および4に示した抗CD10マウス抗体NL-1のVHのCDR1、2および3のアミノ酸配列を移植し、配列番号8に示される抗CD10 CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV0を設計した。該アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を配列番号9に示した。

(2) 抗CD10CDR移植抗体のVLのアミノ酸の設計

次に、抗CD10CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列を以下の様にして設計した。配列番号5、6および7に示した抗CD10マウス抗体NL-1のVLのCDR1、2および3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性から4種類のサブグループ(HSG I～IV) に分類し、更に、それら各サブグループ毎に共通配列を報告している[Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]。そこで、ヒト抗体のVLの4種類のサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列のうち、NL-1のVLのFRのアミノ酸配列と最も高い相同性を有するFRのアミノ酸配列を選択した。

[0082] 第1表には、ヒト抗体のVLの各サブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列とNL-1のVLのFRのアミノ酸配列との間の相同性の検索結果を示した。第1表に示した様に

、NL-1のVLのFRのアミノ酸配列はサブグループIVと最も高い相同性を有していた。

第1表

ヒト抗体のVLのサブグループの共通配列のFRのアミノ酸配列と抗CD10マウス抗体NL-1のVLのFRのアミノ酸配列との間の相同性

HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
66.25%	61.25%	65.00%	67.50%

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIVの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に配列番号5、6および7に示した抗CD10マウス抗体NL-1のVLのCDR1、2および3のアミノ酸配列を移植し、配列番号10に示される抗CD10CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV0を設計した。該アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を配列番号11に示した。

[0083] (3) 抗CD10CDR移植抗体のVLの改変

上記で設計した抗CD10CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV0およびVLのアミノ酸配列LV0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗CD10マウス抗体NL-1のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般にヒト型CDR移植抗体では、マウス抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは抗原との結合活性が低下してしまうことが多い。そこで、抗原との結合活性の低下を回避するため、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、抗原との結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基をCDRのアミノ酸配列とともに移植するために、抗原との結合活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を同定することを検討した。

[0084] 抗CD10マウス抗体NL-1のアミノ酸配列と該マウス抗体のCDRの移植先として選択したヒト抗体とのアミノ酸配列の相同性が低いVLから、以下のように改変を行った。

まず、上記で設計した抗CD10CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV0およびVLのアミノ酸配列LV0よりなる抗体V領域 HV0LV0の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェアAbM (Oxford Molecular社製) を、三次元構造の表示についてはソフトウェアRasMol (Glaxo社製) を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗CD10マウス抗体

NL-1のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。

[0085] その結果HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の抗原との結合活性に影響を与えると考えられる残基として、LV0の22番目のAsn、44番目のPro、47番目のLeu、48番目のLeu、61番目のAsp、71番目のAsp、72番目のPhe、73番目のThrおよび86番目のValを選択した。これらの選択したアミノ酸残基のすべてをマウス抗体NL-1に見られるアミノ残基へ改変した配列番号12に示されるヒト型CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV9を設計した。該アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を配列番号13に示した。

[0086] (4) 抗CD10CDR移植抗体のVHの改変

次にVHにおける抗原との結合活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を同定した。

まず、前記(3)記載の方法を用いて、三次元構造を表示させ、抗CD10マウス抗体NL-1のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。

[0087] その結果HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の抗原との結合活性に影響を与えると考えられる残基として、HV0の1番目のGlu、16番目のArg、18番目のLeu、42番目のGly、80番目のTyr、84番目のAsnおよび98番目のArgを選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち42番目のGly、98番目のArgをマウス抗体NL-1に見られるアミノ残基へ改変した配列番号37に示されるヒト型CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV2を設計した。該アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を配列番号38に示した。

[0088] 2. 抗CD10CDR移植抗体のVHをコードするcDNAの構築

本実施例1第1項 (1) で設計した抗CD10CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV0をコードするcDNAを、PCR法を用いて以下のようにして構築した。構築の過程は図1に示した。以下の記載において、合成オリゴヌクレオチドおよびPCR用プライマーは、ファスマック社製の合成オリゴヌクレオチドおよびPCR用プライマーを使用した。

[0089] まず、設計したアミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度[Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human

Services(1991)]を考慮し、対応する遺伝子コドンを決定した。

変換した遺伝子コドンの5'末端側に、配列番号43記載のH鎖の5'非翻訳領域および分泌シグナル配列をコードする塩基配列を繋げて完全な抗体V領域のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を設計し、更に5'末端と3'末端にヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列を付加した。設計した塩基配列を5'末端側から120から150塩基ずつの計4本の塩基配列に分け（隣り合う塩基配列は、その末端に約20塩基の重複配列を有する)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順にして、配列番号14、15、16および17にそれぞれ示される塩基配列を有する4本の合成オリゴヌクレオチドを合成した。

[0090] 該合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ最終濃度が0.02μMとなるように0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに1μM HV0-FW primer（配列番号18)、1μM HV0-RV primer（配列番号19）および2.5単位のKOD polymerase（東洋紡績社製）を用いて、合計50μLとし、PCR反応を行った。反応条件は94℃間、55℃で30秒間、74℃で30秒間のサイクルを30サイクル、その後74℃で10分間を1サイクルで行った。PCR後、該反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、QIAEXII Gel extraction kit（キアゲン社製）を用いて約0.47KbpのPCR産物を回収した。回収したPCR産物をZero Blunt PCR Cloning Kit（Invitrogen社製）を用いて添付の使用説明書に従って、プラスミドpCR-Bluntに挿入した。得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドを調製し、プラスミドに挿入されたPCR断片の塩基配列をBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Applied Biosystems社製）を用いて、添付の使用説明書に従って反応後、同社の塩基配列自動分析装置ABI PRISM 377により塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有するプラスミドpCRHV0が取得できたことを確認した。

[0091] 次に本実施例の第1項（4）で設計した抗CD10CDR移植抗体のVHのアミノ酸配列HV2をコードするcDNAを上記と同様にして構築した。構築の過程は図2に示した。ただし、合成オリゴヌクレオチドとしては、配列番号14、39、40および41にそれぞれ示される塩基配列を有する4本の合成オリゴヌクレオチドを使用した。最終的に塩基配

列を解析し、目的の塩基配列を有するプラスミドpCRHV2が取得できたことを確認した。

[0092] 3. 抗CD10CDR移植抗体のVLをコードするcDNAの構築

本実施例の第1項 (2) で設計した抗CD10CDR移植抗体のVLのアミノ酸配列LV0をコードするcDNAを以下のようにして構築した。構築の過程は図3に示した。5'非翻訳領域および分泌シグナル配列には、配列番号42に記載の塩基配列を用いた。

まず、配列番号20、21、22および23にそれぞれ示される塩基配列を有する4本の合成オリゴヌクレオチドを上記第2項と同様にして設計後、合成した。該合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ最終濃度が0.02μMとなる様に0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウムを含む反応液に加え、さらに1μM LV0-FW primer(配列番号24)、1μM LV0-RV primer(配列番号25)および2.5単位のKOD polymerase (東洋紡績社製) を用いて、合計50μLとし、PCRを行った。反応条件は94℃で30秒間、55℃で30秒間、74℃で30秒間のサイクルを30サイクル、その後74℃で10分間を1サイクルで行った。該反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、QIAEXII Gel extraction kit(キアゲン社製)を用いて約0.44KbpのPCR産物を回収した。回収したPCR産物をZero Blunt PCR Cloning Kit(Invitrogen社製)を用いて添付の使用説明書に従って、プラスミドpCR-Bluntに挿入した。得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドを調製し、プラスミドに挿入されたPCR断片の塩基配列をBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Applied Biosystems社製)を用いて、添付の使用説明書に従って反応後、同社の塩基配列自動分析装置ABI PRISM 377により塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有するプラスミドpCRLV0が取得できたことを確認した。

[0093] 次に、本実施例の第1項 (3) で設計したLV9をコードするcDNAを上記と同様にして構築した。構築の過程は図4に示した。ただし、合成オリゴヌクレオチドとしては、配列番号20、26、27および28にそれぞれ示される塩基配列を有する4本の合成オリゴヌクレオチド、LV0-FW primer (配列番号24)および1μM LV0-RV primer (配列番号25)を使用した。最終的に塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有するプラスミドpCRLV9が取得できたことを確認した。

[0094] 4. 抗CD10CDR移植抗体発現ベクターの構築

実施例1の第2項記載の抗CD10キメラ抗体発現ベクター、上記第2項で得られたプラスミドpCRHV0 および上記第3項で得られたプラスミドpCRLV0を用いて、抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061chimeraHLV0およびpKANTEX3061HV0LV0を以下のようにして構築した。構築の過程はそれぞれ図5および図6に示した。

[0095] プラスミドpCRLV0を制限酵素BsiWI (New England Biolabs社製) および制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約0.44kbのBsiWI-EcoRI断片を回収した。

一方、抗CD10キメラ抗体発現ベクターを制限酵素BsiWI (New England Biolabs社製) および制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約13.2kbのBsiWI-EcoRI断片を回収した。

[0096] 回収したプラスミドpCRLV0由来BsiWI-EcoRI断片と抗CD10キメラ抗体発現ベクター由来のBsiWI-EcoRI断片をLigation High (東洋紡社製)を用いて添付の説明書に従って連結した。得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株 (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドを調製し、プラスミドの塩基配列をBigDyeTerminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社製)を用いて、添付の使用説明書に従って反応後、同社の塩基配列自動分析装置ABI PRISM 377により塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061chimeraHLV0が取得できたことを確認した。

[0097] 次に、プラスミドpCRHV0を制限酵素ApaI (宝酒造社製) および制限酵素NotI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約0.47kbのApaI-NotI断片を回収した。

一方、上記で得られたプラスミドpKANTEX3061chimeraHLV0を制限酵素ApaI (宝酒造社製) および制限酵素NotI (宝酒造社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約13.2kbのApaI-NotI断片を回収した。

[0098] 回収したプラスミドpCRHV0由来のApaI-NotI断片とプラスミドpKANTEX3061chimeraHLV0由来のApaI-NotI断片をLigation High (東洋紡社製)を用いて添付の説明書

に従って連結した。得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドを調製し、プラスミドの塩基配列をBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Applied Biosystems社製）を用いて、添付の使用説明書に従って反応後、同社の塩基配列自動分析装置ABI PRISM 377により塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV0LV0が取得できたことを確認した。

[0099] 次に、上記で得られた抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV0LV0およびプラスミドpCRLV9を用いて、抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV0LV9を構築した。構築の過程は図7に示した。

抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV0LV0を制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素BsiWI（宝酒造社製）で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約13.2kbのEcoRI-BsiWI断片を回収した。

[0100] 一方、プラスミドpCRLV9を制限酵素EcoRI（宝酒造社製）および制限酵素BsiWI（宝酒造社製）で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約0.47kbのEcoRI-BsiWI断片を回収した。

回収した抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV0LV0由来のApaI-NotI断片およびプラスミドpCRHV9由来のApaI-NotI断片をLigation High（東洋紡社製）を用いて添付の説明書に従って連結した。得られた組換えDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドを調製し、プラスミドの塩基配列をBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Applied Biosystems社製）を用いて、添付の使用説明書に従って反応後、同社の塩基配列自動分析装置ABI PRISM 377により塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する抗CD10CDR移植抗体ベクターpKANTEX3061HV0LV9が取得できたことを確認した。

[0101] 次に、上記で得られた抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV0LV9およびプラスミドpCRHV2を用いて、抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV2LV9を構築した。構築の過程は図8に示した。

一方、プラスミドpCRHV2を制限酵素NotI（宝酒造社製）および制限酵素ApaI（宝酒造社製）で消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約0.47kbのNotI-ApaI断片を回収した。

[0102] 回収した抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV0LV9由来のApaI-NotI断片およびプラスミドpCRHV9由来のApaI-NotI断片をLigation High（東洋紡社製）を用いて添付の説明書に従って連結した。得られた組換えDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換株のクローンより各プラスミドを調製し、プラスミドの塩基配列をBigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Applied Biosystems社製）を用いて、添付の使用説明書に従って反応後、同社の塩基配列自動分析装置ABI PRISM 377により塩基配列を解析し、目的の塩基配列を有する抗CD10CDR移植抗体ベクターpKANTEX3061HV2LV9が取得できたことを確認した。

[0103] 5. 動物細胞を用いた抗CD10CDR移植抗体の安定発現および抗体の精製

本実施例の第4項で作製した3種の抗CD10CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX3061HV0LV0、pKANTEX3061HV0LV9、およびpKANTEX3061HV2LV9を使用し、FUT8遺伝子ダブルノックアウトCHO細胞を宿主細胞として、それぞれ抗CD10CDR移植抗体の安定発現株を取得した。FUT8遺伝子ダブルノックアウトCHO細胞の製造は、WO03/85107記載の方法に従った。

[0104] 以下、FUT8遺伝子ダブルノックアウトCHO細胞を宿主として取得した形質転換株は、抗CD10CDR移植抗体発現プラスミドpKANTEX3061HV0LV0を導入して得られた形質転換株をHV0LV0MS705株と、抗CD10CDR移植抗体発現プラスミドpKANTEX3061HV0LV9を導入して得られた形質転換株をHV0LV9MS705株と、それぞれ称する。抗CD10CDR移植抗体発現プラスミドpKANTEX3061HV2LV9を導入して得られた形質転換株をHV2LV9MS705株と称する。

[0105] 上記の各形質転換株を、G418を500μg/mLの濃度で含む基本培地（10% ウシ胎児透析血清[Invitrogen社製]]）および50μg/mL Gentamycin（ナカライテスク社製）および1×HT supplement（Invitrogen社製）を添加したIscove's Modified Dulbecco's Medium(Invitrogen社製)に懸濁し、30mLを182cm^{2}フラスコ（グライナー製）に播種し

て5% CO_2インキュベーター内で37℃、数日間培養した。細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養液を除去し、25mLのPBSで細胞を洗浄後、EXCELL301培地(JRH バイオサイエンス社製)30mLを注入した。5% CO_2インキュベーター内で37℃、7日間培養後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4℃の条件で5分間の遠心分離を行って培養上清を回収した後、培養上清は0.22μm孔径MillexGVフィルター(ミリポア社製)を用いて濾過滅菌した。上述の方法により取得した培養上清よりMab Select(アマシャム・バイオサイエンス社製)カラムを用いて添付の説明書に従い、各抗CD10CDR移植抗体を精製した。以下、HV0LV0MS705株より得られた抗CD10CDR移植抗体をMS705/HV0LV0抗体、HV0LV9MS705株より得られた抗CD10CDR移植抗体をMS705/HV0LV9抗体、HV2LV9MS705株より得られた抗CD10CDR移植抗体をMS705/HV2LV9抗体、とそれぞれ称する。抗CD10CDR移植抗体を生産する形質転換株であるHV0LV9MS705株は、平成16年8月17日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)にFERM BP-10099として寄託されている。

実施例 3

[0106] 抗CD10CDR移植抗体の生物活性の測定

1.抗CD10CDR移植抗体のCD10に対する結合活性の測定 (ELISA法)

実施例2で取得された各種抗CD10CDR移植抗体を以下に記載の方法で測定した。

抗原は、CD10高発現であるヒト肺小細胞癌細胞株SBC-3細胞(JCRB0818)から調製した膜画分を用いた。膜画分は1mM EDTAと250mM Sucroseを含む20mM HEPES(pH7.4)緩衝液に懸濁した状態でホモゲナイザーにより細胞を破砕し、8000×gの低速で遠心分離することで細胞内顆粒や未破砕の細胞を沈殿させて取り除き、80000×gの高速で遠心分離することで目的の細胞膜を分離した。分離した膜画分は、Triton-X100を0.1%の濃度で含むPBSに溶解して、蛋白を定量した後、10μg/mLとし、96穴のELISA用プレート(グライナー社製)に50μL/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSA-PBSを100μL/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、各ウェルをTween-PB

Sで洗浄後、実施例2の第3項で調製したDG44/CD10抗体またはMS705/CD10抗体の各種希釈溶液を50μL/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液を二次抗体溶液として、それぞれ50μL/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50μL/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

[0107] その結果、いずれの抗CD10CDR移植抗体においても抗体濃度依存的な抗原に対する結合活性が認められた。

2. 抗CD10CDR移植抗体のADCC活性

実施例2で取得した精製抗CD10CDR移植抗体のADCC活性を、以下に記載の方法で測定した。ただし、標的細胞には、Raji細胞(JCRB9012)およびDaudi細胞(JCRB9071)を用い、エフェクター細胞溶液の調製にはPolymorphprep(NYCOMED 社製)を用いた。

[0108] (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FCS(10) 培地(FCSを10%含むRPMI1640培地(GIBCO BRL社製))で培養したRaji細胞(JCRB9012)およびDaudi細胞(JCRB9071)を遠心分離操作及び懸濁によりADCC活性測定用培地[10%透析血清を含むRPMI1640培地(GIBCO BRL社製)]で洗浄した後、ADCC活性測定用培地によって、2×10^5細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

[0109] (2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mLを採取し、ヘパリンナトリウム(清水製薬社製) 0.5mLを加え穏やかに混ぜた。これをPolymorphprep(NYCOMED 社製) を用いて使用説明書に従い、単核球層を分離した。ADCC活性測定用培地で3回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて7×10^6細胞/mLの濃度で懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

[0110] (3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート(Falcon社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の50μL (1×10^4細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を50μL (2.5×10^5細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は35:1と

なる) 添加した。更に、各種抗CD10キメラ抗体をADCC活性測定用培地で希釈し、各最終濃度0.001～1μg/mLとなるように加えて全量を150μLとし、37℃で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性を、CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay(Promega社製)を用いて、添付の説明書にしたがって吸光度データを取得することで測定した。標的細胞自然遊離の吸光度データは、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、また、エフェクター細胞と標的細胞混合自然遊離の吸光度は、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。標的細胞全遊離の吸光度データは、抗体溶液、エフェクター細胞溶液の代わりに培地を用い、反応終了45分前に15μLの9% Triton X-100溶液を添加し、上記と同様の操作を行うことで取得した。ADCC活性は次式により求めた。

(式)

ADCC活性(%)＝{(各サンプル濃度での吸光度-エフェクター細胞と標的細胞混合自然遊離の吸光度)/(標的細胞全遊離の吸光度-標的細胞自然遊離の吸光度)}×100

さらに、上記数式で得られた値から、更に抗体非添加時のバックグランドを差し引いた値を算出し、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)とした。

[0111] 結果を図9に示す。抗CD10CDR移植抗体MS705/HV0LV9抗体およびMS705/HV2LV9抗体は標的細胞に対してADCC活性が認められた。

(4) CDC活性の測定

a) 標的細胞溶液の調製

MI1640-FCS(10) 培地(FCSを10%含むRPMI1640培地(GIBCO BRL社製))で培養したバーキットリンパ腫細胞株Daudi(JCRB9071)を遠心分離操作及び懸濁によりCDC活性測定用培地(1.4%ウシ血清アルブミン(GIBCO BRL社製)を含むRPMI1640培地)で洗浄した後、CDC活性測定用培地によって、1×10^6細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

[0112] b)ヒト補体溶液の調製

ヒト血清凍結乾燥品SERA, COMPLEMENT(SIGMA社製)に、脱イオン水を1 mL添

加して溶解した後、等量のCDC活性測定用培地を加えて2倍希釈し、ヒト補体溶液とした。

c)CDC活性の測定

96ウェル平底プレート(SUMILON社製)の各ウェルに、上記a)で調製した標的細胞溶液50μL(5×10^4細胞/ウェル)を分注した。次いで各種抗体溶液をCDC活性測定用培地で希釈し、各最終濃度0.001～10μg/mLとなるように50μL加えた。更にb)で調製した補体溶液を50 μL添加して全量を150μLとし、37℃で2時間反応させた。また、補体溶液50μL、CDC活性測定用培地100μLを加えたウェル(Blank)、および標的細胞溶液、補体溶液、CDC活性測定用培地を各50 μLずつ加えたウェル(Total)を作製した。反応後、各ウェルに細胞増殖試薬WST-1(Roche社製)を15 μLずつ添加して攪拌し、37℃で4時間反応させ、吸光度450nmを測定した。CDC活性は次式により求めた。

(式)

細胞傷害活性(%)=〔1－(Sample吸光度－Blank吸光度)/(Total吸光度－Blank吸光度)〕×100

図10に、MS705/HV0LV9抗CD10CDR移植抗体、MS705/HV2LV9抗CD10CDR移植抗体およびMS705/KM3317抗CD10ヒト型キメラ抗体のDaudi細胞に対する活性を示した。MS705/HV0LV9抗CD10CDR移植抗体および MS705/HV2LV9抗CD10CDR移植抗体は、MS705/KM3317抗CD10ヒト型キメラ抗体と同等のCDC活性を示した。

実施例 4

[0113] 抗CD10キメラ抗体KM3317およびヒト化抗体KM8317のin vivo薬効試験

B細胞急性リンパ性白血病(B-ALL細胞)をターゲットとして、抗CD10キメラ抗体MS705/KM3317およびCDR移植ヒト化抗体MS705/HV2LV9のin vivo薬効試験を、マウスゼノグラフト延命モデルの系で実施した。移植前日にSCIDマウス(日本クレア、雌、7週齢)の体重を測定し、コントロール群、抗体投与群MS705/KM3317-1 mg/kg、MS705/HV2LV9-0.1 mg/kg、1 mg/kgの計4群(1群7匹)に群分けした。

In vitroで培養したCD10陽性B-ALL細胞NALM-6(東北大学加齢研)を5×10^7個/mLでPBS(Gibco BRL)に懸濁し、マウスの尾静脈内に100 μLずつ移植した(5×10^6

個/mouse)。その同日から、抗体投与群はPBS(Gibco BRL)で希釈調製した各抗体溶液を、コントロール群はPBSのみを100 μLずつ尾静脈内投与した。投与は1週間に2回、計8回行い、移植日を0日目としてその後の体重と生存日数を測定した。

各群の体重と生存率の経日的推移を図11および図12に示す。コントロール群のみ、移植後20日目から体重減少が認められ、40日前後には生存率が0%となった。一方、抗体投与群はいずれも、試験終了日の121日目まで体重および生存率に変化は認められなかった。延命評価の指標とされるIncreased Life Span(ILS)%を算出した結果、抗体投与群は221%となり、B-ALLに対するCD10抗体の顕著な延命効果が示された。また、キメラ抗体とヒト化抗体は同等の抗腫瘍効果を有することが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0114] 本発明は、CD10に特異的に結合するヒト型CDR移植抗体が提供することができる。本発明の抗体は、ヒトに対する治療薬として用いることができる。

配列表フリーテキスト

[0115] 配列番号8－人工配列の説明:抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号9－人工配列の説明:合成DNA

配列番号10－人工配列の説明:抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号11－人工配列の説明:合成DNA

配列番号12－人工配列の説明:抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号13－人工配列の説明:合成DNA

配列番号14－人工配列の説明:合成DNA

配列番号15－人工配列の説明:合成DNA

配列番号16－人工配列の説明:合成DNA

配列番号17－人工配列の説明:合成DNA

配列番号18－人工配列の説明:合成DNA

配列番号19－人工配列の説明:合成DNA

配列番号20－人工配列の説明:合成DNA

配列番号21－人工配列の説明:合成DNA

配列番号22－人工配列の説明：合成DNA

配列番号23－人工配列の説明：合成DNA

配列番号24－人工配列の説明：合成DNA

配列番号25－人工配列の説明：合成DNA

配列番号26－人工配列の説明：合成DNA

配列番号27－人工配列の説明：合成DNA

配列番号28－人工配列の説明：合成DNA

配列番号33－人工配列の説明：抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号34－人工配列の説明：合成DNA

配列番号35－人工配列の説明：抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号36－人工配列の説明：合成DNA

配列番号37－人工配列の説明：抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列

配列番号38－人工配列の説明：合成DNA

配列番号39－人工配列の説明：合成DNA

配列番号40－人工配列の説明：合成DNA

配列番号41－人工配列の説明：合成DNA

配列番号42－人工配列の説明：合成DNA

配列番号43－人工配列の説明：合成DNA

請求の範囲

[1] 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8で示されるアミノ酸配列、または配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、1番目のGlu、16番目のArg、18番目のLeu、42番目のGly、80番目のTyr、84番目のAsnおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[2] 抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号10で示されるアミノ酸配列、または配列番号10で示されるアミノ酸配列のうち、9番目のAsp、10番目のSer、11番目のLeu、22番目のAsn、42番目のGly、43番目のGln、44番目のPro、47番目のLeu、48番目のLeu、61番目のAsp、71番目のAsp、72番目のPhe、73番目のThr、79番目のLeu、80番目のGlnおよび86番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、CD10に特異的に反応するヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[3] 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8で示されるアミノ酸配列、または配列番号8で示されるアミノ酸配列のうち、1番目のGlu、16番目のArg、18番目のLeu、42番目のGly 、80番目のTyr、84番目のAsnおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ抗体の軽鎖 (L鎖)可変領域 (V領域) が、配列番号10で示されるアミノ酸配列、または配列番号10で示されるアミノ酸配列のうち、9番目のAsp、10番目のSer、11番目のLeu、22番目のAsn、42番目のGly、43番目のGln、44番目のPro、47番目のLeu、48番目のLeu、61番目のAsp、71番目のAsp、72番目のPhe、73番目のThr、79番目のLeu、80番目のGlnおよび86番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項1または2記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[4] 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8、35または37で示されるアミノ酸配列のいずれかを含む、請求項1または3に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[5] 抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号10、12または33で示されるアミ

ノ酸配列のいずれかを含む、請求項2～4のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[6] 抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号8、35または37で示されるアミノ酸配列のいずれかを含み、かつ抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号10、12または33で示されるアミノ酸配列のいずれかを含む請求項3～5のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[7] 配列番号1で示されるアミノ酸配列の52～750番目に存在するエピトープに反応することを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[8] FERM BP-10099から生産されるモノクローナル抗体が認識するエピトープに反応することを特徴とする、ヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[9] 抗体断片が、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、1本鎖抗体 (scFv)、2量体化可変領域 (V領域) 断片 (Diabody)、ジスルフィド安定化V領域断片 (dsFv) および相補性決定領域 (CDR) を含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体断片。

[10] 請求項1～9のいずれか1項に記載されたヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片が、放射性同位元素、蛋白質または薬剤と結合しているヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片。

[11] 請求項1～9のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片をコードするDNA。

[12] 請求項11記載のDNAを含有する組換え体ベクター。

[13] 請求項12記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

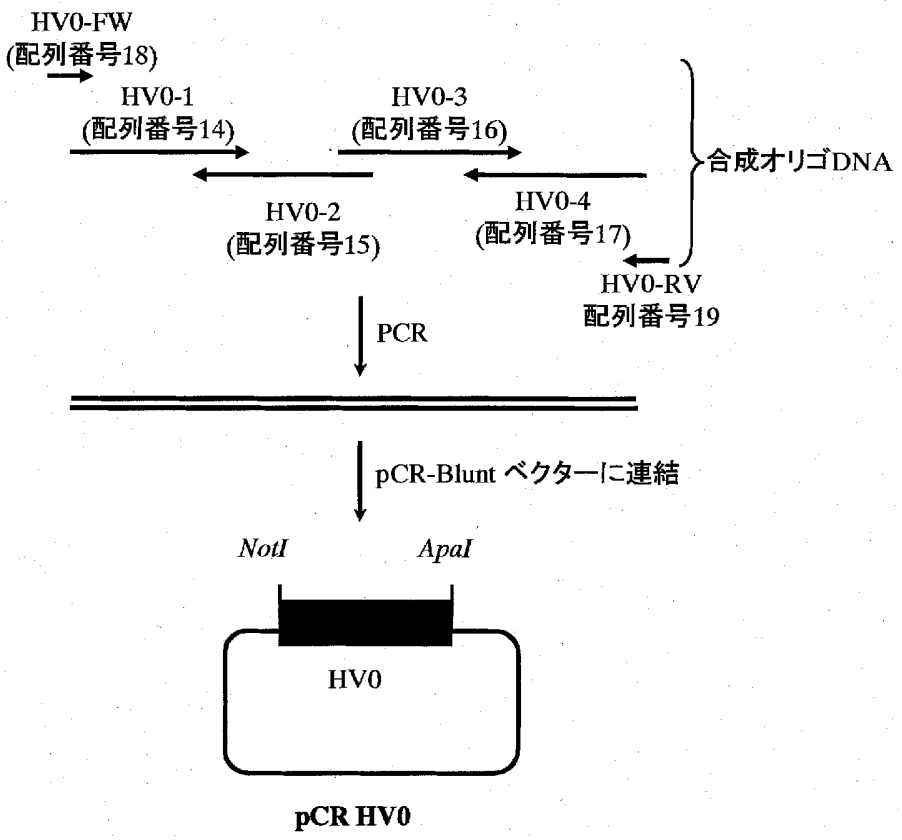
[14] 形質転換株が、HV0LV9MS705(FERM BP-10099)である請求項13記載の形質転換株。

[15] 請求項13または14記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項1～9のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とするヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片の製造方法。

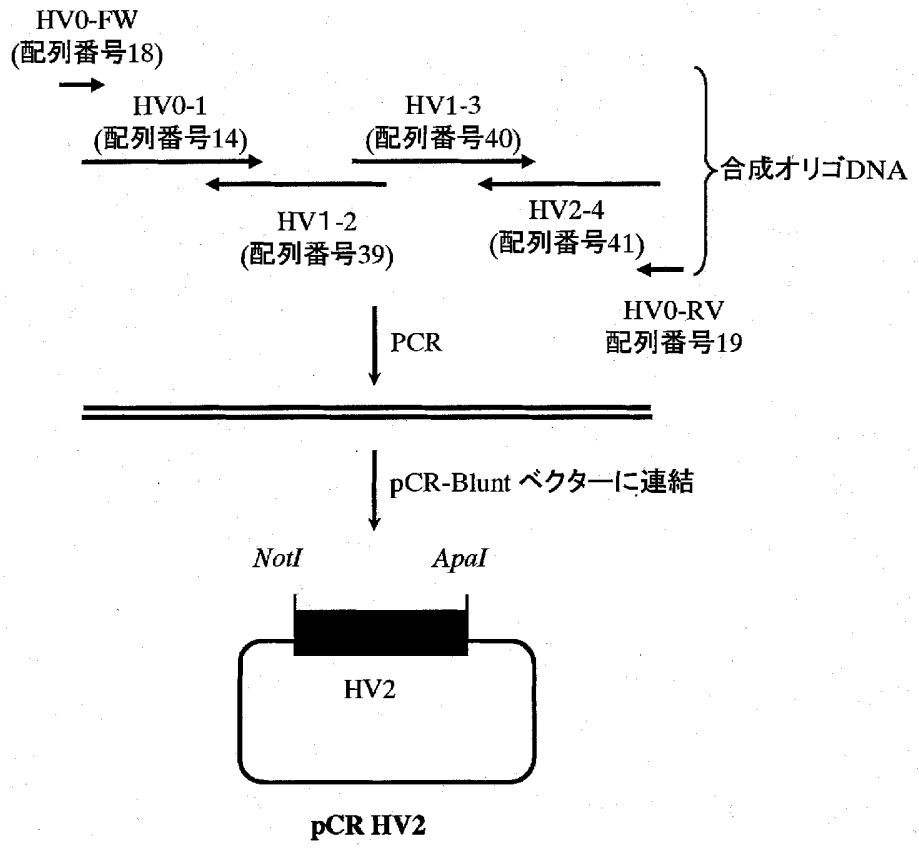
[16] 請求項1～9のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を有効成分として含有する医薬。

[17] 請求項1～9のいずれか1項に記載のヒト型CDR移植抗体またはその抗体断片を有効成分として含有するCD10関連疾患の治療薬。

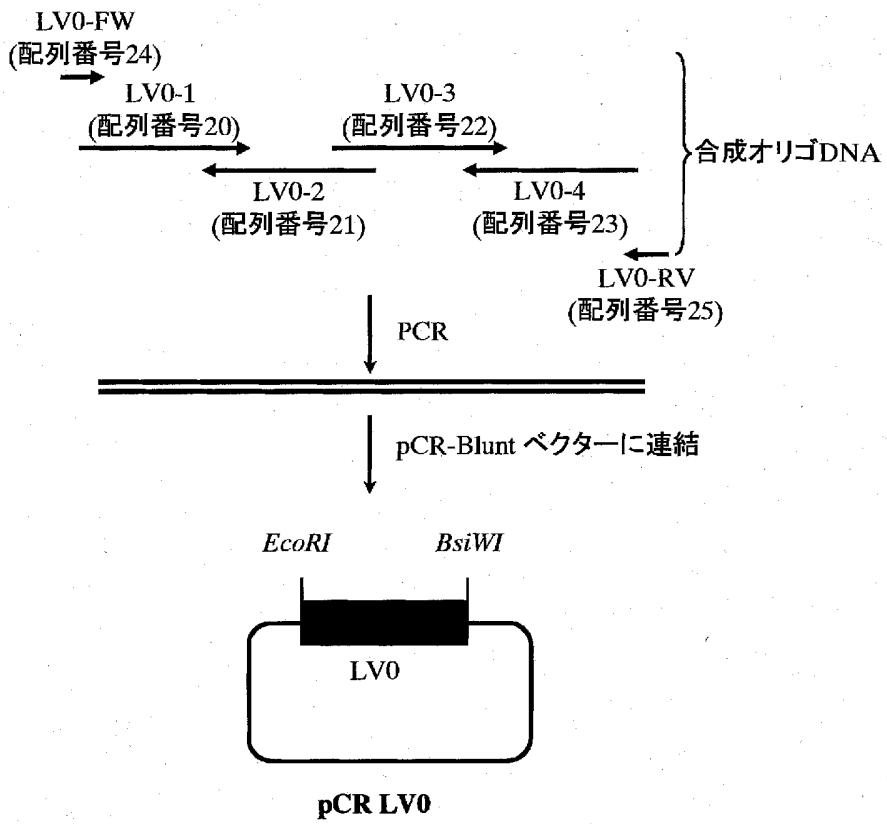
[図1]


HV0-FW
(配列番号18)
HV0-1
(配列番号14)
HV0-3
(配列番号16)
合成オリゴDNA
HV0-2
(配列番号15)
HV0-4
(配列番号17)
HV0-RV
配列番号19
PCR
pCR-Blunt ベクターに連結
NotI
ApaI
HV0
pCR HV0

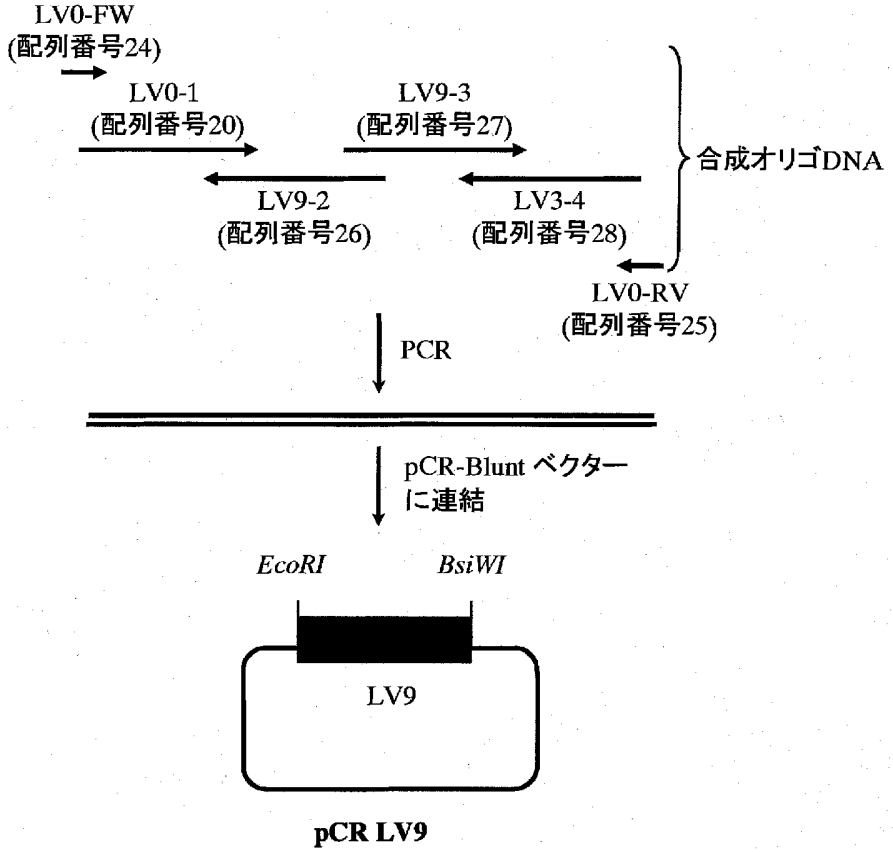
[図2]


HV0-FW
(配列番号18)
HV0-1
(配列番号14)
HV1-3
(配列番号40)
合成オリゴDNA
HV1-2
(配列番号39)
HV2-4
(配列番号41)
HV0-RV
配列番号19
PCR
pCR-Blunt ベクターに連結
NotI
ApaI
HV2
pCR HV2

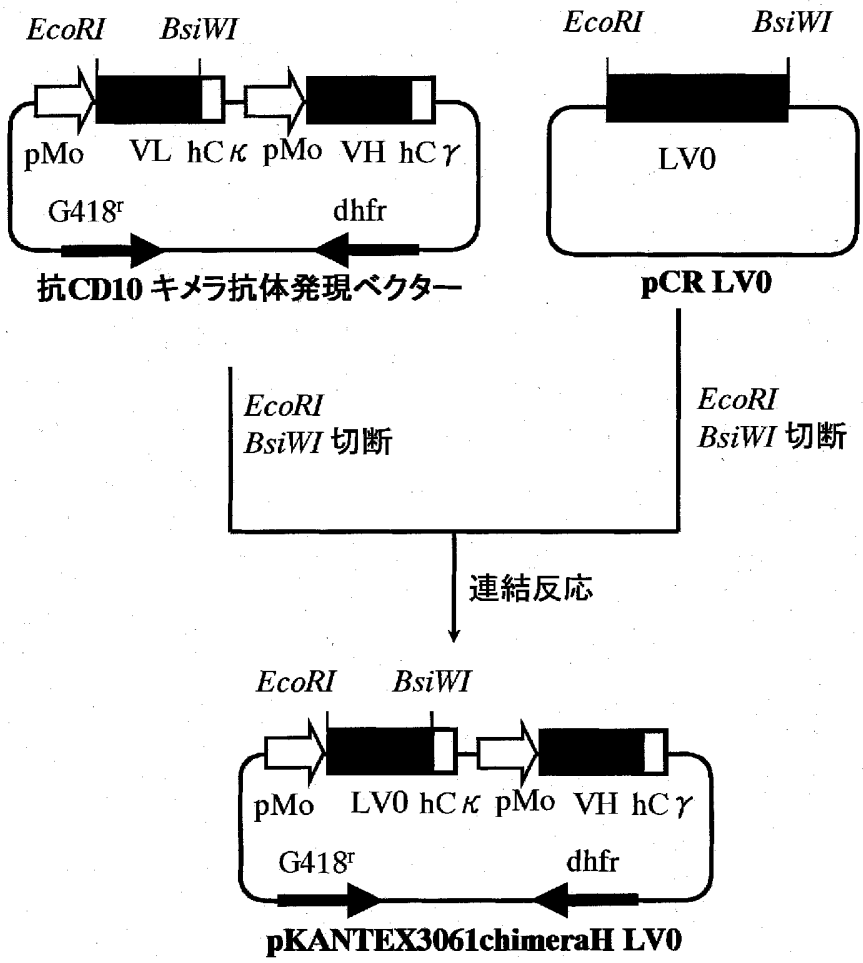
[図3]


LV0-FW
(配列番号24)
LV0-1
(配列番号20)
LV0-3
(配列番号22)
合成オリゴDNA
LV0-2
(配列番号21)
LV0-4
(配列番号23)
LV0-RV
(配列番号25)
PCR
pCR-Blunt ベクターに連結
EcoRI
BsiWI
LV0
pCR LV0

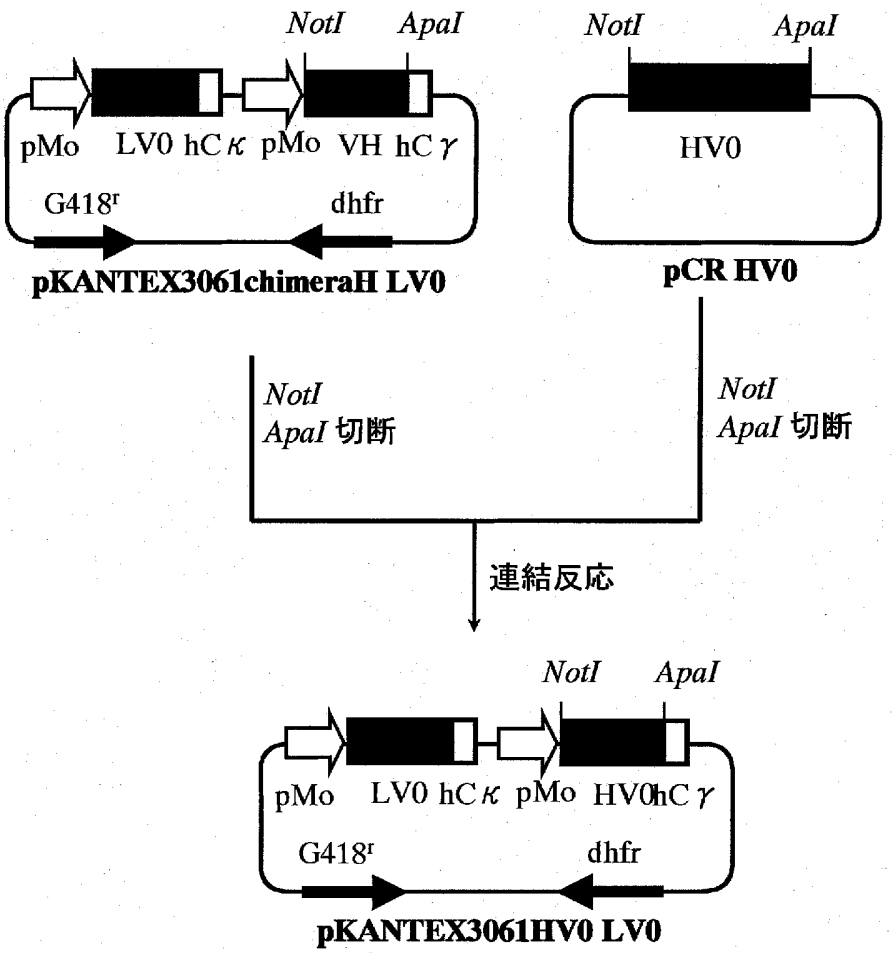
[図4]


LV0-FW
(配列番号24)
LV0-1
(配列番号20)
LV9-3
(配列番号27)
合成オリゴDNA
LV9-2
(配列番号26)
LV3-4
(配列番号28)
LV0-RV
(配列番号25)
PCR
pCR-Blunt ベクター
に連結
EcoRI
BsiWI
LV9
pCR LV9

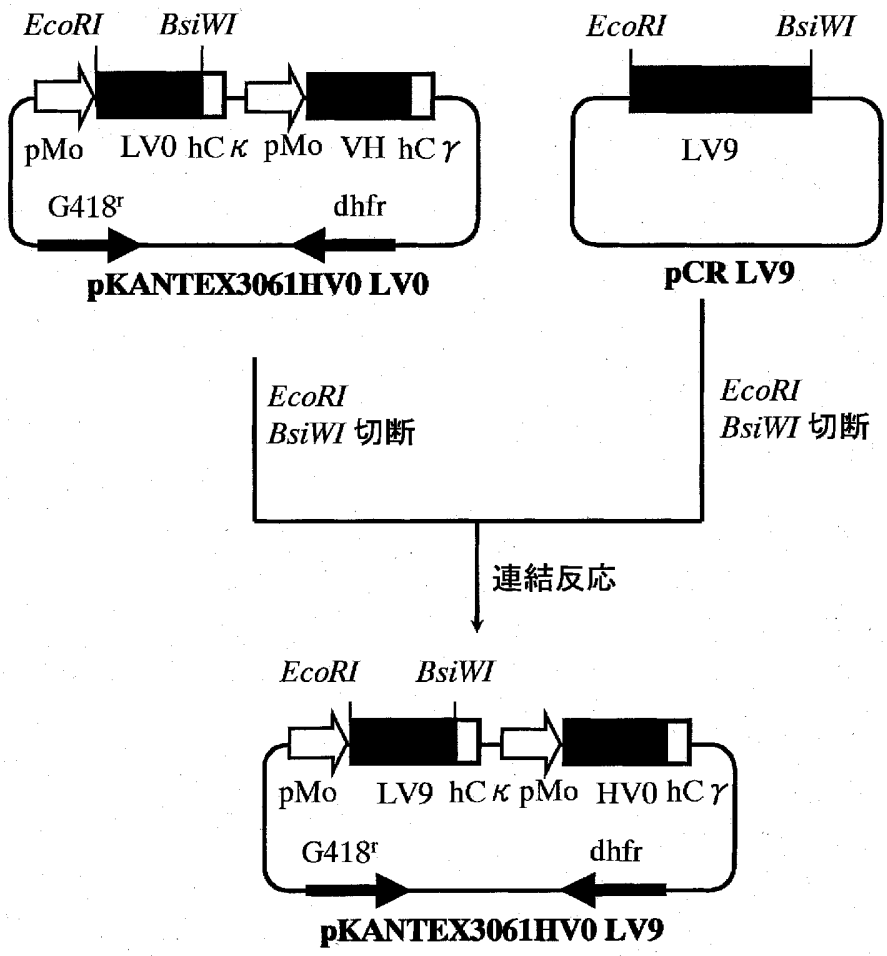
[図5]


EcoRI
BsiWI
pMo
VL
hCκ
pMo
VH
hCγ
G418r
dhfr
抗CD10 キメラ抗体発現ベクター
EcoRI
BsiWI
LV0
pCR LV0
EcoRI
BsiWI 切断
EcoRI
BsiWI 切断
連結反応
EcoRI
BsiWI
pMo
LV0
hCκ
pMo
VH
hCγ
G418r
dhfr
pKANTEX3061chimeraH LV0

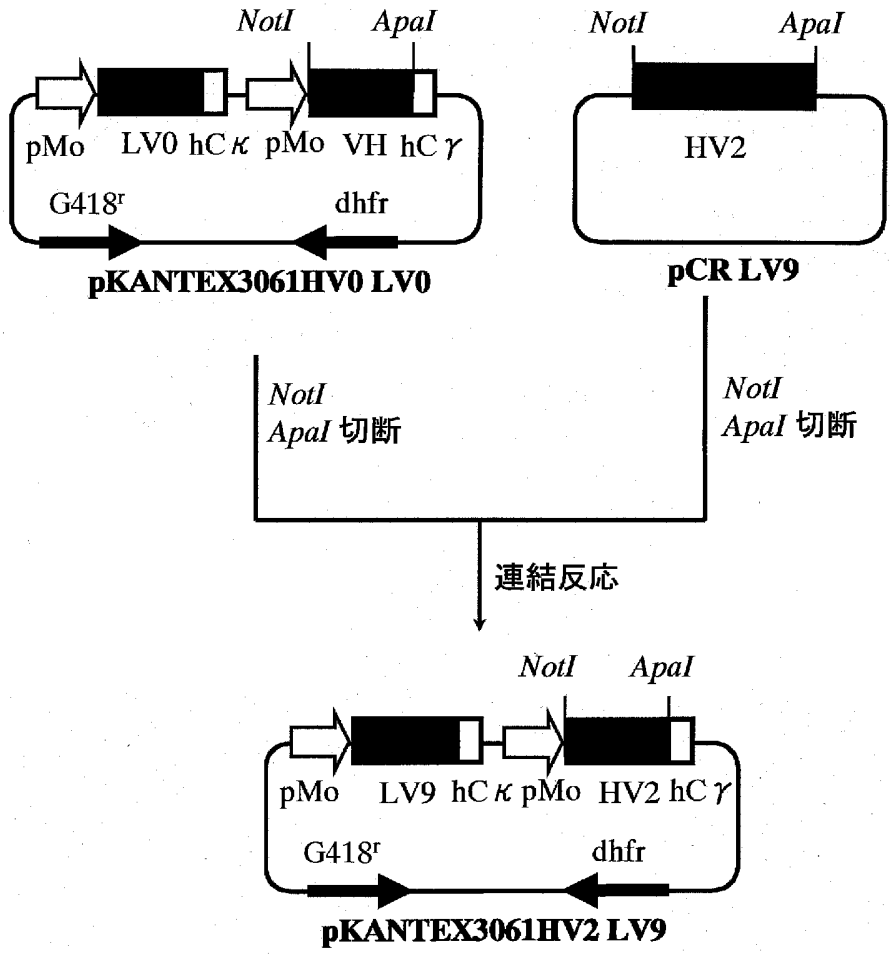
[図6]


NotI
ApaI
pMo
LV0 hCκ
pMo
VH hCγ
G418r
dhfr
pKANTEX3061chimeraH LV0
NotI
ApaI
HV0
pCR HV0
NotI
ApaI 切断
NotI
ApaI 切断
連結反応
NotI
ApaI
pMo
LV0 hCκ
pMo
HV0hCγ
G418r
dhfr
pKANTEX3061HV0 LV0

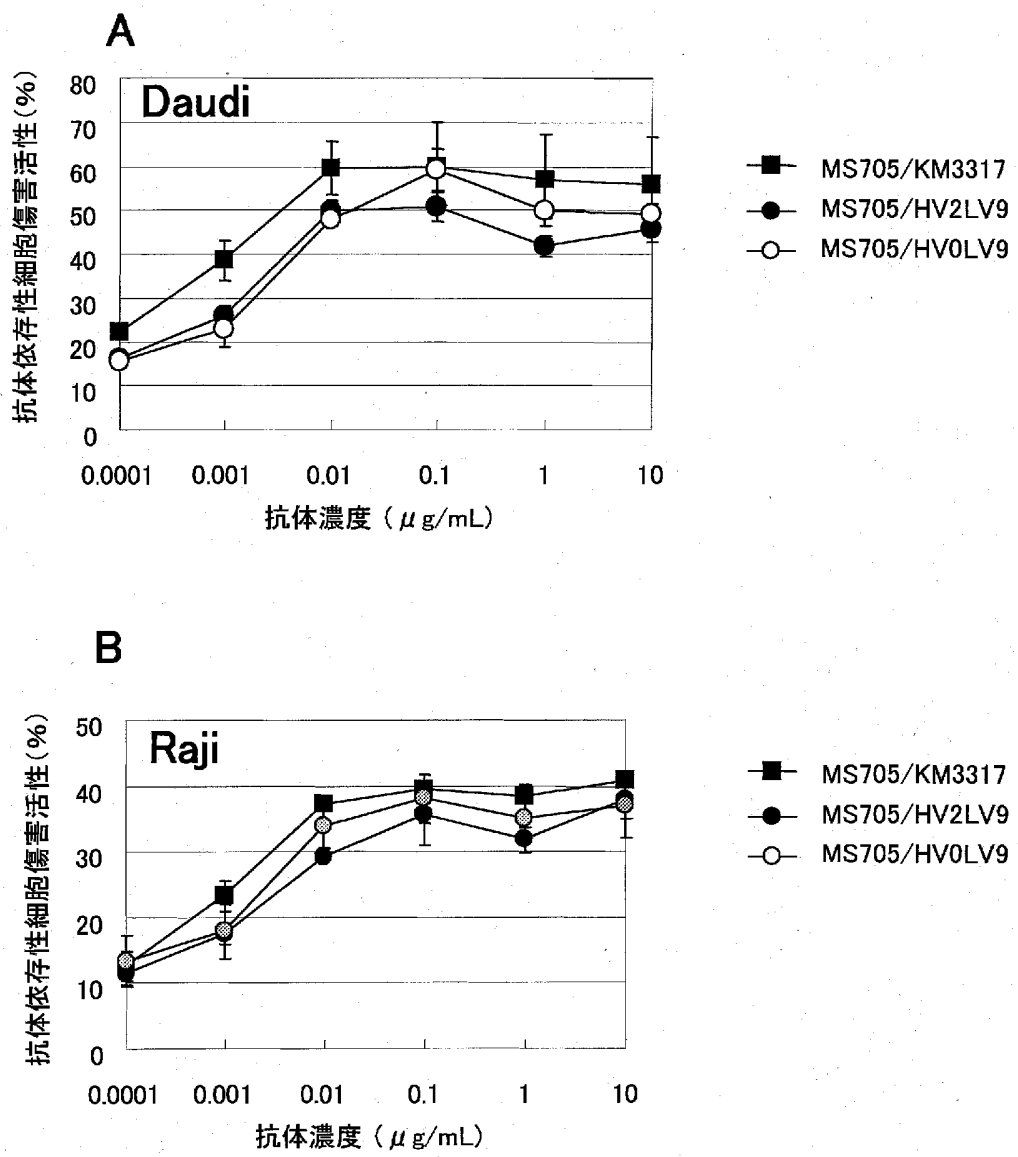
[図7]


EcoRI
BsiWI
pMo
LV0 hCκ
pMo
VH hCγ
G418r
dhfr
pKANTEX3061HV0 LV0
EcoRI
BsiWI
LV9
pCR LV9
EcoRI
BsiWI 切断
EcoRI
BsiWI 切断
連結反応
EcoRI
BsiWI
pMo
LV9 hCκ
pMo
HV0 hCγ
G418r
dhfr
pKANTEX3061HV0 LV9

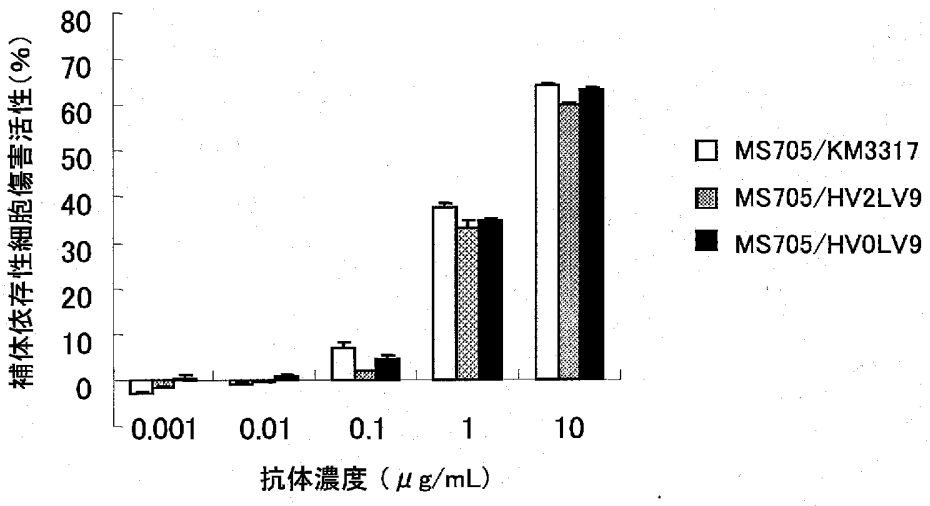
[図8]


NotI
ApaI
pMo
LV0 hCκ
pMo
VH hCγ
G418r
dhfr
pKANTEX3061HV0 LV0
NotI
ApaI
HV2
pCR LV9
NotI
ApaI 切断
NotI
ApaI 切断
連結反応
NotI
ApaI
pMo
LV9 hCκ
pMo
HV2 hCγ
G418r
dhfr
pKANTEX3061HV2 LV9

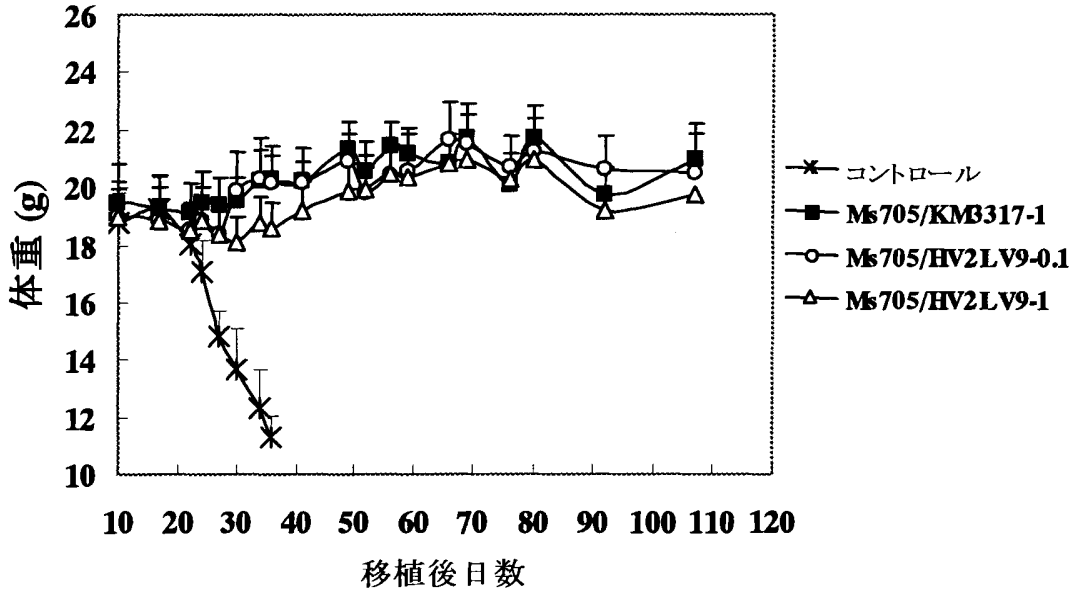
[図9]


A
Daudi
抗体依存性細胞傷害活性(%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度（μg/mL）
MS705/KM3317
MS705/HV2LV9
MS705/HV0LV9
B
Raji
抗体依存性細胞傷害活性(%)
50
40
30
20
10
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度（μg/mL）
MS705/KM3317
MS705/HV2LV9
MS705/HV0LV9

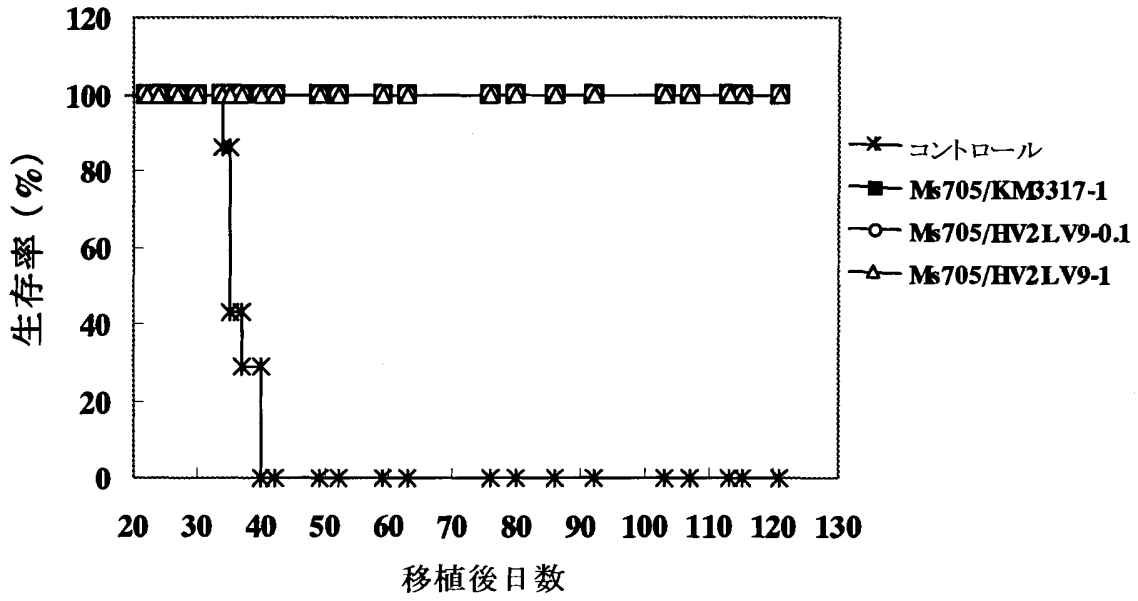
[図10]


補体依存性細胞傷害活性(%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度（μg/mL）
MS705/KM3317
MS705/HV2LV9
MS705/HV0LV9

[図11]


体重 (g)
移植後日数
コントロール
Ms705/KM3317-1
Ms705/HV2LV9-0.1
Ms705/HV2LV9-1

[図12]


生存率 (%)
移植後日数
コントロール
Ms705/KM3317-1
Ms705/HV2LV9-0.1
Ms705/HV2LV9-1

0-1 0-1-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	
0-2	国際出願番号	PCT/JP2006/309577
0-3	出願人又は代理人の書類記号	1778

1 1-1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。 段落番号	0105
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東１丁目１番地１ 中央第６
1-3-3	寄託の日付	2004年 08月 17日 (17.08.2004)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-10099
1-4	追加の表示	ヨーロッパ特許条約施行規則２８（３）の規定に基づき、微生物が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能とすることを出願人は希望する（Ｒｕｌｅ ２８（４）ＥＰＣ）
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309577

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01), ***A61K39/395***(2006.01), ***A61P35/02***(2006.01), ***C07K16/30***(2006.01), ***C12N5/10***(2006.01), ***C12P21/08***(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09(2006.01), ***A61K39/395***(2006.01), ***A61P35/02***(2006.01), ***C07K16/30***(2006.01), ***C12N5/10***(2006.01), ***C12P21/08***(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, Science Direct, JSTPlus(JDream2), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database, Ichushi WEB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 63-36796 A (Teijin Ltd.), 17 February, 1988 (17.02.88), Full text & EP 255694 A	1-17
Y	KUDO A. et al., The antibody molecule to common acute lymphocytic leukemia (cALL) antigen used the identical or closely related VH gene segment as that of MOPC-21 immunoglobulin heavy chain, J.Immunol., 1985, Vol.135, pages 642 to 645	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 May, 2006 (24.05.06)	30 May, 2006 (30.05.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/309577

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UEDA, R. et al., Serological analysis of cell surface antigens of null cell acute lympho cytic leukemia by mouse monoclonal antibodies, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1982, Vol.79, pages 4386 to 4390	1-17
Y	JP 4-506458 A (Celltech Ltd.), 12 November, 1992 (12.11.92), Full text & WO 91/09968 A & EP 460171 A	1-17
Y	WO 2003/002608 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 09 January, 2003 (09.01.03), Full text & EP 1422243 A1 & US 2004/0253234 A1	1-17
Y	QUEEN C. et al., A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1989, Vol.86, pages 10029 to 10033	1-17
Y	TEMPEST P.R. et al., Efficient generation of a reshaped human mAb specific for the alpha toxin of Clostridium perfringens, Protein Eng., 1994, Vol.7, pages 1501 to 1507	1-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３０９５７７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　*C12N15/09(2006.01), A61K39/395(2006.01), A61P35/02(2006.01), C07K16/30(2006.01), C12N5/10(2006.01), C12P21/08(2006.01)*

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　*C12N15/09(2006.01), A61K39/395(2006.01), A61P35/02(2006.01), C07K16/30(2006.01), C12N5/10(2006.01), C12P21/08(2006.01)*

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, Science Direct, JSTPlus(JDream2), 医学･薬学予稿集全文データベース, 医中誌 WEB

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	JP 63-36796 A (帝人株式会社) 1988.02.17, 全文 & EP 255694 A	1-17
Y	KUDO A. et al., The antibody molecule to common acute lymphocytic leukemia (cALL) antigen used the identical or closely related VH gene segment as that of MOPC-21 immunoglobulin heavy chain, J. Immunol., 1985, vol.135, p.642-645	1-17

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２４．０５．２００６	３０．０５．２００６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３２２７
坦ケ　隆幸
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	UEDA R. et al., Serological analysis of cell surface antigens of null cell acute lymphocytic leukemia by mouse monoclonal antibodies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol.79, p.4386-4390	1-17
Y	JP 4-506458 A (セルテック　リミテッド) 1992.11.12, 全文 & WO 91/09968 A & EP 460171 A	1-17
Y	WO 2003/002608 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003.01.09, 全文 & EP 1422243 A1 & US 2004/0253234 A1	1-17
Y	QUEEN C. et al., A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, vol.86, p.10029-10033	1-17
Y	TEMPEST P.R. et al., Efficient generation of a reshaped human mAb specific for the alpha toxin of Clostridium perfringens, Protein Eng., 1994, vol.7, p.1501-1507	1-17