

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3926153号
(P3926153)

(45) 発行日 平成19年6月6日(2007.6.6)

(24) 登録日 平成19年3月9日(2007.3.9)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K	16/28
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K	19/00
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 B
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
請求項の数 45 (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-564247 (P2001-564247)	(73) 特許権者	000001029
(86) (22) 出願日	平成13年3月2日(2001.3.2)		協和醗酵工業株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2001/001656		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(87) 国際公開番号	W02001/064754	(74) 代理人	100105647
(87) 国際公開日	平成13年9月7日(2001.9.7)		弁理士 小栗 昌平
審査請求日	平成17年6月14日(2005.6.14)	(74) 代理人	100105474
(31) 優先権主張番号	特願2000-59508 (P2000-59508)		弁理士 本多 弘徳
(32) 優先日	平成12年3月3日(2000.3.3)	(74) 代理人	100108589
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 市川 利光
(31) 優先権主張番号	特願2000-401563 (P2000-401563)	(74) 代理人	100115107
(32) 優先日	平成12年12月28日(2000.12.28)		弁理士 高松 猛
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	設楽 研也
微生物の受託番号	FERM BP-7054		東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
早期審査対象出願			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子組換え抗体およびその抗体断片

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

形質転換体 F E R M B P - 7 0 5 4 により生産されるモノクローナル抗体 K M 2 7 6 0 により認識される、配列番号 1 7 で示されるアミノ酸配列の 2 ~ 2 9 番目に存在するエピトープに特異的に結合し、かつ C C R 4 発現細胞に対し細胞傷害活性を有し、ヒト C C R 4 の細胞外領域に対して特異的に反応する、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項2】

細胞外領域が、配列番号 1 7 で示されるアミノ酸配列の 1 ~ 3 9、9 8 ~ 1 1 2、1 7 6 ~ 2 0 6 および 2 7 1 ~ 2 8 4 番目からなる群から選ばれる細胞外領域である請求の範囲 1 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項3】

C C R 4 発現細胞に特異的に反応する請求の範囲 1 または 2 に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項4】

C C R 4 発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す請求の範囲 1 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項5】

細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性である請求の範囲 1 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項 6】

抗体依存性細胞傷害活性が T h 2 細胞のアポトーシスを誘導することによるものである、請求の範囲 5 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項 7】

T h 2 細胞を除去する作用を示す抗体である請求の範囲 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項 8】

T h 2 サイトカイン産生抑制活性を示す請求の範囲 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項 9】

T h 2 サイトカインが、I L - 4、I L - 5、または I L - 1 3 である請求の範囲 8 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

【請求項 10】

遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体またはヒト抗体から選ばれる請求の範囲 1 ~ 9 のいずれかに記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 11】

ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型 C D R 移植抗体である請求の範囲 10 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 12】

ヒト抗体 I g G 型に属する請求の範囲 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 13】

ヒト化抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (C D R) 1、C D R 2、C D R 3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む請求の範囲 10 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 14】

ヒト型キメラ抗体が、C C R 4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域と、ヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) と L 鎖 C 領域からなる請求の範囲 11 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 15】

ヒト型キメラ抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H 鎖 V 領域の相補性決定領域 (C D R) 1、C D R 2、C D R 3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む請求の範囲 11 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 16】

ヒト型キメラ抗体が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20 ~ 138 番目からなる H 鎖 V 領域、および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20 ~ 132 番目からなる L 鎖 V 領域を含む請求の範囲 11 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 17】

ヒト型キメラ抗体が、形質転換体 K M 2 7 6 0 (F E R M B P - 7 0 5 4) が生産する、抗体 H 鎖 C 領域がヒト I g G 1 サブクラスである、抗体 K M 2 7 6 0 である請求の範囲 11 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 18】

ヒト型 C D R 移植抗体が、C C R 4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (C D R) と、ヒト抗体の H 鎖および L 鎖の C 領域および V 領域フレームワーク領域からなる請求の範囲 11 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 19】

ヒト型 C D R 移植抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からな

10

20

30

40

50

る H 鎖 V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む請求の範囲 18 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 20】

請求の範囲 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片をコードする DNA。

【請求項 21】

請求の範囲 20 記載の DNA とタンデム型ヒト化抗体発現用ベクターを含む組換えベクター。

【請求項 22】

請求の範囲 21 記載の組換えベクターが宿主細胞に導入された形質転換体。

【請求項 23】

形質転換体が K M 2 7 6 0 (F E R M B P - 7 0 5 4) である請求の範囲 22 記載の形質転換体。

【請求項 24】

請求の範囲 22 または 23 記載の形質転換体を培養して培養液中に遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を生成・蓄積させ、該培養液から該抗体またはその抗体断片を回収する、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の製造方法。

【請求項 25】

ヒト抗体が、抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域を含む請求の範囲 10 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 26】

ヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域 (C D R) が、それぞれ C C R 4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の C D R のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む請求の範囲 25 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 27】

ヒト抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H 鎖 V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む請求の範囲 26 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 28】

ヒト抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域が、それぞれ C C R 4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む請求の範囲 25 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 29】

ヒト抗体が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20 ~ 138 番目からなる H 鎖 V 領域、または配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20 ~ 132 番目からなる L 鎖 V 領域を含む請求の範囲 28 記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 30】

ヒト抗体が、ヒト抗体ファージライブラリーまたはヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体である請求の範囲 25 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体。

【請求項 31】

抗体断片が、F a b、F a b'、F (a b')₂、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化 V 領域断片、または抗体の相補性決定領域 (C D R) を含むペプチドである請求の範囲 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

【請求項 32】

抗体断片が、抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域を含む請求の範囲 31 記載の抗体断片。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

抗体断片のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域(CDR)が、それぞれCCR4に特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む請求の範囲32記載の抗体断片。

【請求項34】

抗体断片が、それぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなるH鎖V領域のCDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列からなるL鎖V領域のCDR1、CDR2、CDR3を含む請求の範囲33記載の抗体断片。

【請求項35】

抗体断片のH鎖V領域およびL鎖V領域が、それぞれCCR4に特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む請求の範囲32記載の抗体断片。

10

【請求項36】

抗体断片が、配列番号15で示されるアミノ酸配列の20～138番目からなるH鎖V領域、および配列番号16で示されるアミノ酸配列の20～132番目からなるL鎖V領域を含む請求の範囲35記載の抗体断片。

【請求項37】

請求の範囲1～19、25～36のいずれか1項に記載された遺伝子組換え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化学的または遺伝子工学的に結合している遺伝子組換え抗体または抗体断片。

20

【請求項38】

請求の範囲1～19、25～37のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4を免疫学的に検出する方法。

【請求項39】

請求の範囲1～19、25～37のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

【請求項40】

請求の範囲1～19、25～37のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とするCCR4を細胞表面に発現した細胞の減少または除去剤。

【請求項41】

請求の範囲1～19、25～37のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とするTh2サイトカインの産生抑制剤。

30

【請求項42】

請求の範囲1～19、25～37のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする医薬。

【請求項43】

請求の範囲1～19、25～37のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とするTh2介在性免疫疾患の治療または診断剤。

【請求項44】

請求の範囲1～19、25～37のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする血液癌の治療剤。

40

【請求項45】

血液癌が白血病である請求の範囲44記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトのCCケモカイン受容体4(以下、CCR4と表記する)の細胞外領域に対して、特異的に反応する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は、細胞傷害活性、Th2細胞によるサイトカイン産生抑制活性を示し、特定の相補性決定領域(以下、CDRと表記する)を含むヒト化抗体、ヒト抗体等のCCR4に特異

50

的に反応する遺伝子組換え抗体およびその抗体断片に関する。さらに、本発明は、上記の抗体をコードするDNAに関する。さらに、本発明は、該DNAを含むベクターおよび該ベクターにより形質転換された形質転換体に関する。さらに、本発明は、該形質転換体を用いた上記の抗体の製造方法、ならびに該抗体を用いるアレルギー性疾患を始めとするTh2介在性免疫疾患の治療または診断剤等の医薬に関する。さらに、本発明は、該抗体を用いる白血病のような血液癌を始めとする癌疾患の治療または診断剤等の医薬に関する。

【背景技術】

【0002】

気管支喘息を始めとするアレルギー疾患には好酸球や肥満細胞、IgEなど様々な因子が関与している。好酸球は炎症局所に浸潤し、脱顆粒によりMBP (major basic protein) 等の細胞傷害性塩基性蛋白質を放出して周囲の組織傷害を誘発する。肥満細胞はB細胞から産生されたIgEと抗原との免疫複合体と結合することでヒスタミンを放出し、即時型アレルギー反応を誘発する。これらをコントロールしているのはサイトカイン・ケモカイン等の生体機能分子であり、細胞間の情報伝達を担っている。好酸球はIL-5によって分化誘導・寿命延長を受け、さらに脱顆粒が誘発される。IgEはIL-4によって活性化されたB細胞から産生され、抗原との免疫複合体となり肥満細胞の脱顆粒を促す。また肥満細胞からもIL-4、IL-13などが産生され、B細胞からのIgE産生に寄与することが判明しており、アレルギーの増強ループの存在が確認されている (Am. J. Respir. Crit. Care Med., 152, 2059 (1995)、Immunol. Today, 15, 19 (1994))。このように炎症性細胞間には巧妙なサイトカイン・ケモカインネットワークが存在し、複雑にバランスを保っている。

【0003】

これらサイトカイン・ケモカインを産生するのは、細胞表面にCD4を発現しているヘルパーT細胞 (以下、CD4+Th細胞と表記する) である。実際に、気管支喘息患者の気道炎症局所にはヘルパーT細胞の浸潤が顕著に見られること、そのうちのかなりのT細胞は活性化していること、喘息の重症度や気道過敏性の程度と活性化T細胞数とが相関すること、さらに末梢血中にも活性化T細胞が増加していることなどが明らかにされている (Am. Rev. Respir. Dis., 145, S22 (1992))。

ヘルパーT細胞は、産生されるサイトカインによってTh1細胞とTh2細胞に分類される (Annu. Rev. Immunol., 7, 145 (1989))。Th2が産生するサイトカインとして、IL-4、IL-5およびIL-13などがあげられる。

【0004】

アトピー性疾患患者より分離した抗原特異的T細胞クローンは、イン・ビトロ (in vitro) で刺激するとTh2サイトカインを放出し (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 88, 4538 (1991))、喘息患者の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: 以下BALと表記する) や気道粘膜にはTh2細胞が存在することも判明している (N. Engl. J. Med., 326, 298 (1992)、Eur. J. Immunol., 23, 1445 (1993))。アレルギー性炎症動物モデルでのBAL中細胞のmRNA発現を調べると、Th2サイトカインであるIL-4、IL-5が上昇している (Clin. Immunol. Immunopathol., 75, 75 (1995))。さらに、マウスに誘導したTh2細胞を静脈内および鼻腔内に投与した場合、肺に抗原特異的な喘息様炎症症状が誘導され (J. Exp. Med., 186, 1737 (1997)、J. Immunol., 160, 1378 (1998))、好酸球増多症を引き起こす (J. Immunol., 161, 3128 (1998))。喘息患者の気道粘膜組織、アトピー性皮膚炎患者の病変部においてはIL-5の発現が認められ (J. Clin. Invest., 87, 1541 (1991)、J. Exp. Med., 173, 775 (1991))、通年性鼻アレルギー患者粘膜のIL-13の発現強度と血清総IgE値、抗原特異的IgE値とはよく相関する (治療学, 32, 19 (1998))。

10

20

30

40

50

【0005】

ケモカインは、白血球遊走および白血球活性化作用を有する塩基性のヘパリン結合性蛋白質の総称であり、一次構造上で保存されたシステイン残基の位置によって、CXC、CC、C、およびCX₃Cのサブファミリーに分類される。現在までに16種類のケモカイン受容体が同定されており(Curr. Opin., Immunol., 11, 626(1999))、また、各種ケモカイン受容体の発現は、Th1細胞、Th2細胞などの各白血球表面で異なることが示されている(細胞工学, 17, 1022(1998))。

【0006】

ヒトCCR4は、ヒト未熟好塩基球細胞株KU-812からK5-5としてクローニングされた、G蛋白質共役型の7回膜貫通型受容体であり、配列番号17で示されるアミノ酸配列を有する。CCR4の膜貫通領域は40~67番目、78~97番目、113~133番目、151~175番目、207~226番目、243~270番目、285~308番目と推定されるので、細胞外領域は、アミノ酸配列1~39番目、98~112番目、176~206番目、271~284番目であり、細胞内領域は68~77番目、134~150番目、227~242番目、309~360番目であると推定される(J. Biol. Chem., 270, 19495(1995))。クローニング当時はCCR4のリガンドがMIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α)、RANTES(regulated on activation normal T-cell expressed and secreted)、またはMCP-1(monocyte chemotactic protein)であると報告されていた(Biochem. Biophys. Res. Commun., 218, 337(1996)、WO96/23068)。しかし、その後刺激したヒト末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells(以下、PBMCと表記する))や胸腺細胞から産生されるTARC(thymus and activation-regulated chemokine)(J. Biol. Chem., 271, 21514(1996))がCCR4に特異的に結合することが判明した(J. Biol. Chem., 272, 15036(1997))。さらに、マクロファージから単離されたMDC(macrophage-derived chemokine)(J. Exp. Med., 185, 1595(1997))、別名STCP-1(stimulated T cell chemotactic protein-1)(J. Biol. Chem., 272, 25229(1997))がTARCよりも強くCCR4に結合することも報告されている(J. Biol. Chem., 273, 1764(1998))。

【0007】

サイトカイン・ケモカイン産生能を持つCD4+Th細胞にCCR4が発現していることが示され(J. Biol. Chem., 272, 15036(1997))、さらにCD4+Th細胞の中でもTh2細胞に選択的に発現していることが報告された(J. Exp. Med., 187, 129(1998)、J. Immunol., 161, 5111(1998))。さらに、エフェクター/メモリーT細胞(CD4+/CD45RO+)集団中にCCR4+細胞が確認され、CCR4+細胞を刺激するとIL-4、IL-5を産生するがIFN- γ は産生されない(Int. Immunol., 11, 81(1999))。またメモリーT細胞中のCLA(cutaneous lymphocyte antigen)陽性、 $\alpha 4 \beta 8$ インテグリン陰性集団にCCR4+細胞が属しており、CCR4は腸管免疫ではなく皮膚などの全身性免疫に関わるメモリーT細胞に発現していることが報告されている(Nature, 400, 776(1999))。以上のことから、炎症が誘発された場合に活性化を受けるメモリーT細胞はCCR4を発現し、そのリガンドであるMDCやTARCによって炎症局所に遊走して他の炎症性細胞の活性化を促す可能性が強く示唆される。

【0008】

現在のTh2介在性免疫疾患に対する治療法としては、(1)サイトカイン・ケモカイン

10

20

30

40

50

に対する拮抗剤／ヒト化抗IL-5抗体(SB-240563:スミス・クラインビーチャム社、Sch-55700(CDP-835):シェーリング・ブラウ／セルテック社)、ヒト化抗IL-4抗体(US Patent No. 5,914,110)、可溶性ケモカイン受容体(J. Immunol., 160, 624(1998))など、(2)サイトカイン・ケモカイン産生抑制剤／IL-5産生阻害剤(特開平8-53355)、レチノイドアンタゴニスト(WO99/24024)、トシル酸スプラタスト(IPD-1151T、大鵬薬品工業社製)など、(3)好酸球や肥満細胞などの最終的な炎症性細胞を対象としたもの／ヒト化抗IL-5受容体抗体(WO97/10354)、CCR3受容体3(CCR3)拮抗剤(特開平11-147872)など、(4)炎症性生体機能分子阻害剤／ヒト化抗IgE抗体(Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157, 1429(1998))など、が開発されているが、これらは複雑なサイトカイン・ケモカイン・炎症性細胞間のネットワークの一部を阻害するだけであり、根治的ではない。T細胞を制御するものとしては抗CD4抗体があり、重度のステロイド依存性喘息に効果をあげている。しかしCD4分子は免疫担当細胞に広く発現しているため、特異性に欠け、かつ、強い免疫抑制作用を伴うという欠点を有する(Int. Arch. Allergy Immunol., 118, 133(1999))。

【0009】

このことから、これらすべてを抑制するためには、アレルギー反応の上流部、すなわちTh2細胞の制御が必要となる。

現在の重度のTh2介在性免疫疾患患者に対する主な治療法はステロイド投与であるが、ステロイドによる副作用を免れることは出来ない。また、ステロイド投与を中止した場合には、患者の病態はまた元に戻り、長期間のステロイド投与は耐性を獲得するなどの欠点を有する。

これまで、CCR4を発現している細胞を検出でき、かつ、CCR4発現細胞に対して細胞傷害性を有するモノクローナル抗体は確立されていない。さらに、Th2サイトカインの産生を抑制する治療薬はこれまでに知られていない。

白血病においてもCCR4が発現していることが報告されているが(Blood, 96, 685(2000))、それら白血病細胞を傷害するような治療薬はこれまでに報告されていない。

【0010】

一般にヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることにより、ヒト体内にマウス抗体に対するヒト抗体(Human Anti Mouse Antibody:以下、HAMAと表記する)が誘導されることが知られている。HAMAは投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり(J. Clin. Oncol., 2, 881(1984)、Blood, 65, 1349(1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 932(1988)、Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82, 1242(1985))、投与されたマウス抗体の体内からの消失を速め(J. Nucl. Med., 26, 1011(1985)、Blood, 65, 1349(1985)、J. Natl. Cancer Inst., 80, 937(1988))、マウス抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている(J. Immunol., 135, 1530(1985)、Cancer Res., 46, 6489(1986))。

【0011】

これらの問題点を解決するため、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キメラ抗体あるいはヒト型相補性決定領域(Complementarity Determining Region:以下、CDRと表記する)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。ヒト型キメラ抗体とは、抗体可変領域(以下、V領域と表記する)がヒト以外の動物の抗体で、定常領域(以下、C領域と表記する)がヒト抗体である抗体であり(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81, 6851(1984))、ヒト型CDR移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体のV領域中

10

20

30

40

50

のCDRのアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である(Nature, 321, 522(1986))。これらのヒト化抗体は、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、免疫原性および血中での安定性に関しては、ヒト型キメラ抗体では、ヒトに投与した場合、マウス抗体に比べて血中半減期が約6倍伸びたことが報告されている(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 4220(1989))。ヒト型CDR移植抗体では、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が4~5倍伸びたことが報告されている(J. Immunol., 147, 1352(1991))。即ち、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。また、特にCCR4発現細胞数を減少させる治療において、抗体のFc領域(抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域)を介した補体依存性細胞傷害活性(以下、CDC活性と表記する)や抗体依存性細胞傷害活性(以下、ADCC活性と表記する)等の細胞傷害活性の高さがその治療効果に重要であるが、こうした細胞傷害活性に関しても、ヒトにおいてはヒト以外の動物の抗体のFc領域よりも、ヒト抗体のFc領域の方がヒト補体成分や、単核球、マクロファージ、豆細胞等の様なFc受容体を細胞表面に有するヒトエフェクター細胞をより効率的に活性化できる為、より優れていることが報告されている。例えば、GD2に対するマウス抗体のFc領域をヒト抗体のFc領域に変換したヒト型キメラ抗体は、ヒトエフェクター細胞による腫瘍細胞傷害活性が上昇することが報告されており(J. Immunol., 144, 1382(1990))、また、CAMPATH-1抗原に対するヒト型CDR移植抗体についても同様の結果が報告されている(Nature, 332, 323(1988))。

10

20

【0012】

以上の結果は、ヒトへの臨床応用に用いる抗体としては、ヒト化抗体の方がマウス抗体等のヒト以外の動物の抗体より望ましいことを明確に示している。

更に、最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、Fab、Fab'、(Fab')₂、一本鎖抗体(以下、scFvと表記する)(Science, 242, 423(1988))、ジスルフィド安定化V領域断片(以下、dsFvと表記する)(Molecular Immunol., 32, 249(1995))等の、より分子量の小さい抗体の断片の作製が可能となっている。これらの断片は、完全な抗体分子に比べ分子量が小さい為、標的組織への移行性に優れている(Cancer Res., 52, 3402(1992))。これらの断片についても、ヒトへの臨床応用の場合には、マウス抗体等のヒト以外の動物の抗体よりもヒト化抗体に由来する方が、より望ましいと考えられる。

30

【0013】

これまで述べてきたように、ヒト化抗体およびその断片は、単独の使用によっても診断および治療の効果が期待されるが、更に他の分子との併用により、その効果をより高めることが検討されている。例えば、それら分子の一つとしてサイトカインが用いられている。サイトカインは免疫反応における細胞間相互作用を司る種々の液性因子の総称である。抗体の細胞傷害活性には、CDC活性やADCC活性等が知られているが、ADCC活性は、単核球、マクロファージ、NK細胞の様なFc受容体を細胞表面に有するエフェクター細胞によって担われている(J. Immunol., 138, 1992(1987))。種々のサイトカインはこれらのエフェクター細胞を活性化することから、抗体のADCC活性等を高める目的で、抗体と組み合わせて投与することが行われている。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

抗体は重鎖(以下、H鎖と表記する)および軽鎖(以下、L鎖と表記する)のV領域のCDRを介して抗原に結合し、CDRのアミノ酸配列が抗体の結合反応性、結合特異性を規定している(J. Exp. Med., 132, 211(1970))。従って、特にCDRが新規なアミノ酸配列を有し、公知の抗CCR4抗体とは異なる結合反応性、細胞傷害活性等を有するヒトCCR4に特異的に結合する抗CCR4抗体が求められている。ま

50

た、サイトカイン産生細胞であるCCR4発現Th2細胞を選択的に除去できる抗体、Th2サイトカインの産生を抑制する抗体、該抗体を用いる診断薬および治療薬が求められている。さらに、造血系細胞が腫瘍化した疾患である白血病等の血液癌を診断および治療するための有用な方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、IgG1クラスに属するCCR4に対するマウスモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマKM2160より抗体H鎖cDNAおよびL鎖cDNAを取得し、それらのV領域のCDRが新規なアミノ酸配列を有することを見出し、該新規CDRを有するH鎖V領域およびL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト抗体H鎖C領域およびヒト抗体L鎖C領域をコードするcDNAを有する動物細胞用発現ベクターにクローニングしてヒト化抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより抗CCR4キメラ抗体KM2760を発現、精製した。該抗体がヒトCCR4に特異的に反応し、かつ抗原陽性細胞株に対して強い細胞傷害活性を示すことでその細胞数の減少を証明し、該抗体のヒト生体内での使用における有用性を示し、本発明を完成させた。

さらに、本発明者らは、CCR4に対する遺伝子組換え抗体が白血病細胞、特にT細胞系白血病細胞に高率に反応し、かつCCR4陽性白血病細胞に対する強い細胞傷害活性を示すことでその細胞数の減少を証明し、該抗体のヒト白血病等の血液癌の診断、治療における有用性を示し、本発明を完成させた。

【0016】

本発明は、以下の(1)～(46)に関する。

(1) 形質転換体FERMBP-7054により生産されるモノクローナル抗体KM2760により認識されるエピトープに特異的に結合し、かつCCR4発現細胞に対し細胞傷害活性を有し、ヒトCCR4の細胞外領域に対して、特異的に反応する遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(2) 細胞外領域が、配列番号17で示されるアミノ酸配列の1～39、98～112、176～206および271～284番目からなる群から選ばれる細胞外領域である上記(1)記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(3) 配列番号17で示されるアミノ酸配列の2～29番目に存在するエピトープを認識する上記(1)または(2)記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(4) CCR4発現細胞に特異的に反応する上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

細胞傷害活性としては、CDC活性、ADCC活性などがあげられる。

【0017】

(5) CCR4発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す上記(1)記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性とは、後述する遺伝子組換え抗体を作製する際に用いたCCR4に特異的に反応するヒト以外の動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも得られた遺伝子組換え抗体が有する細胞傷害活性のほうが高いことを意味する。

【0018】

(6) 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性である上記(1)記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(7) 抗体依存性細胞傷害活性がTh2細胞のアポトーシスを誘導することによるものである、上記(6)記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(8) Th2細胞を除去する作用を示す抗体である上記(1)～(7)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(9) Th2サイトカイン産生抑制活性を示す上記(1)～(8)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

10

20

30

40

50

(1 0) T h 2 サイトカインが、I L - 4、I L - 5、または I L - 1 3 である上記 (9) 記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片。

(1 1) 遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体またはヒト抗体から選ばれる上記 (1) ~ (1 0) のいずれかに記載の遺伝子組換え抗体。

(1 2) ヒト化抗体が、ヒト型キメラ抗体またはヒト型 C D R 移植抗体である上記 (1 1) 記載の遺伝子組換え抗体。

(1 3) ヒト抗体 I g G 型に属する上記 (1) ~ (1 2) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体。

【 0 0 1 9 】

(1 4) ヒト化抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) の相補性決定領域 (C D R) 1、C D R 2、C D R 3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む上記 (1 1) 記載の遺伝子組換え抗体。 10

(1 5) ヒト型キメラ抗体が、C C R 4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域と、ヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) と L 鎖 C 領域からなる上記 (1 2) 記載の遺伝子組換え抗体。

(1 6) ヒト型キメラ抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H 鎖 V 領域の相補性決定領域 (C D R) 1、C D R 2、C D R 3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む上記 (1 5) 記載の遺伝子組換え抗体。 20

(1 7) ヒト型キメラ抗体が、配列番号 15 で示されるアミノ酸配列の 20 ~ 138 番目からなる H 鎖 V 領域、および配列番号 16 で示されるアミノ酸配列の 20 ~ 132 番目からなる L 鎖 V 領域を含む上記 (1 2) 記載の遺伝子組換え抗体。

【 0 0 2 0 】

(1 8) ヒト型キメラ抗体が、形質転換体 K M 2 7 6 0 (F E R M B P - 7 0 5 4) が生産する、抗体 H 鎖 C 領域がヒト I g G 1 サブクラスである、抗体 K M 2 7 6 0 である上記 (1 2) 記載の遺伝子組換え抗体。

(1 9) ヒト型 C D R 移植抗体が、C C R 4 に特異的に反応するモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域の相補性決定領域 (C D R) と、ヒト抗体の H 鎖および L 鎖の C 領域および V 領域フレームワーク領域からなる上記 (1 2) 記載の遺伝子組換え抗体。 30

(2 0) ヒト型 C D R 移植抗体が、それぞれ配列番号 5、6、7 で示されるアミノ酸配列からなる H 鎖 V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3、およびそれぞれ配列番号 8、9、10 で示されるアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3 を含む上記 (1 9) 記載の遺伝子組換え抗体。

【 0 0 2 1 】

(2 1) 上記 (1) ~ (2 0) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片をコードする D N A。

(2 2) 上記 (2 1) 記載の D N A とタンデム型ヒト化抗体発現用ベクターを含む組換えベクター。 40

(2 3) 上記 (2 2) 記載の組換えベクターが宿主細胞に導入された形質転換体。

(2 4) 形質転換体が K M 2 7 6 0 (F E R M B P - 7 0 5 4) である上記 (2 3) 記載の形質転換体。

(2 5) 上記 (2 3) または (2 4) 記載の形質転換体を培養して培養液中に遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を生成・蓄積させ、該培養液から該抗体またはその抗体断片を回収する、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の製造方法。

【 0 0 2 2 】

(2 6) ヒト抗体が、抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) と抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域を含む上記 (1 1) 記載の遺伝子組換え抗体。 50

(27) ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域(CDR)が、それぞれCCR4に特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む上記(26)記載の遺伝子組換え抗体。

(28) ヒト抗体が、それぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなるH鎖V領域のCDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列からなるL鎖V領域のCDR1、CDR2、CDR3を含む上記(27)記載の遺伝子組換え抗体。

(29) ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域が、それぞれCCR4に特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む上記(26)記載の遺伝子組換え抗体。

10

(30) ヒト抗体が、配列番号15で示されるアミノ酸配列の20~138番目からなるH鎖V領域、または配列番号16で示されるアミノ酸配列の20~132番目からなるL鎖V領域を含む上記(29)記載の遺伝子組換え抗体。

(31) ヒト抗体が、ヒト抗体ファージライブラリーまたはヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体である上記(26)~(30)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体。

【0023】

(32) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片、または抗体の相補性決定領域(CDR)を含むペプチドである上記(1)~(10)のいずれか1項に記載の抗体断片。

20

(33) 抗体断片が、抗体の抗体重鎖(H鎖)可変領域(V領域)と抗体軽鎖(L鎖)V領域を含む上記(32)記載の抗体断片。

(34) 抗体断片のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域(CDR)が、それぞれCCR4に特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む上記(33)記載の抗体断片。

(35) 抗体断片が、それぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなるH鎖V領域のCDR1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列からなるL鎖V領域のCDR1、CDR2、CDR3を含む上記(34)記載の抗体断片。

【0024】

30

(36) 抗体断片のH鎖V領域およびL鎖V領域が、それぞれCCR4に特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を含む上記(33)記載の抗体断片。

(37) 抗体断片が、配列番号15で示されるアミノ酸配列の20~138番目からなるH鎖V領域、および配列番号16で示されるアミノ酸配列の20~132番目からなるL鎖V領域を含む上記(36)記載の抗体断片。

(38) 上記(1)~(20)、(26)~(37)のいずれか1項に記載された遺伝子組換え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化学的または遺伝子工学的に結合している遺伝子組換え抗体または抗体断片。

【0025】

40

(39) 上記(1)~(20)、(26)~(38)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4を免疫学的に検出する方法。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と検体を接触させることにより、検体中のCCR4を免疫学的に検出することができる。

(40) 上記(1)~(20)、(26)~(38)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を用いて、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と細胞を接触させることにより、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出することができる。

(41) 上記(1)~(20)、(26)~(38)のいずれか1項に記載の遺伝子

50

組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする C C R 4 を細胞表面に発現した細胞の減少または除去剤。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の有効量をヒトまたは動物に投与することにより、C C R 4 を細胞表面に発現した細胞を減少または除去することができる。

(42) 上記(1)～(20)、(26)～(38)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする T h 2 サイトカインの産生抑制剤。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の有効量をヒトまたは動物に投与することにより、T h 2 サイトカインの産生を抑制することができる。

【0026】

(43) 上記(1)～(20)、(26)～(38)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする医薬。

10

(44) 上記(1)～(20)、(26)～(38)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする T h 2 介在性免疫疾患の治療または診断剤。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の有効量をヒトまたは動物に投与することにより、T h 2 介在性免疫疾患を治療することができ、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と検体を接触させることにより、T h 2 介在性免疫疾患を診断することができる。

(45) 上記(1)～(20)、(26)～(38)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体またはその抗体断片を有効成分とする血液癌の治療剤。

例えば、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片の有効量をヒトまたは動物に投与することにより、血液癌を治療することができ、遺伝子組換え抗体またはその抗体断片と検体を接触させることにより、血液癌を診断することができる。

20

(46) 血液癌が白血病である上記(45)記載の治療剤。

本発明の T h 2 介在性免疫疾患としては、急性あるいは慢性の気道過敏性または気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などを包含する。

【0027】

本発明の癌疾患としては、血液癌、特に白血病があげられる。

本発明における遺伝子組換え抗体およびその抗体断片(以下、本発明の抗体と表記する)は、ヒト C C R 4 の細胞外領域に特異的に反応すればいかなるものでもよい。好ましくは、配列番号17で示されるアミノ酸配列の1～39、98～112、176～206または271～284番目を含む領域に特異的に反応する抗体があげられる。さらに好ましくは、それぞれ配列番号5、6、7で示されるアミノ酸配列からなるH鎖V領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3、およびそれぞれ配列番号8、9、10で示されるアミノ酸配列からなるL鎖V領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3を含む抗体、ならびに配列番号15で示されるアミノ酸配列の20～138番目からなるH鎖V領域、および配列番号16で示されるアミノ酸配列の20～132番目からなるL鎖V領域を含む抗体があげられる。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、且つ C C R 4 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。

30

【0028】

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。

40

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

50

酸残基は相互に置換可能である。

【 0 0 2 9 】

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

【 0 0 3 0 】

具体的な本発明の抗体としては、以下に述べるヒト化抗体、ヒト抗体およびそれらの抗体断片などがあげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 C D R 移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体 H 鎖 V 領域（以下、V H と表記する）および抗体 L 鎖 V 領域（以下、V L と表記する）とヒト抗体の H 鎖 C 領域（以下、C H と表記する）およびヒト抗体の L 鎖 C 領域（以下、C L と表記する）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体は、C C R 4 に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、V H および V L をコードする c D N A を取得し、ヒト抗体 C H およびヒト抗体 C L をコードする遺伝子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キメラ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。

【 0 0 3 1 】

ヒト型キメラ抗体の C H としては、ヒトイムノグロブリン（以下、h I g と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、h I g G クラスのものが好適であり、更に h I g G クラスに属する h I g G 1、h I g G 2、h I g G 3、h I g G 4 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、ヒト型キメラ抗体の C L としては、h I g に属すればいかなるものでもよく、κ クラスあるいは λ クラスのものをを用いることができる。

抗 C C R 4 キメラ抗体の具体例としては、抗体の V H が配列番号 1 5 で示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 8 番目のアミノ酸配列、C H が h I g G 1 サブクラスのアミノ酸配列を有し、抗体の V L が配列番号 1 6 で示されるアミノ酸配列の 2 0 ~ 1 3 2 番目のアミノ酸配列、C L がヒト抗体 κ クラスのアミノ酸配列を有する抗体 K M 2 7 6 0 があげられる。

ヒト型 C D R 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の V H および V L の C D R のアミノ酸配列をヒト抗体の V H および V L の適切な位置に移植した抗体を意味する。

【 0 0 3 2 】

本発明のヒト型 C D R 移植抗体は、C C R 4 に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体の V H および V L の C D R 配列を任意のヒト抗体の V H および V L の C D R 配列に移植した V 領域をコードする c D N A を構築し、ヒト抗体の C H およびヒト抗体の C L をコードする遺伝子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 C D R 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することによりヒト型 C D R 移植抗体を発現させ、製造することができる。

ヒト型 C D R 移植抗体の C H としては、h I g に属すればいかなるものでもよいが、h I g G クラスのものが好適であり、更に h I g G クラスに属する h I g G 1、h I g G 2、h I g G 3、h I g G 4 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

10

20

30

40

50

ト型 C D R 移植抗体の C L としては、h I g に属すればいかなるものでもよく、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。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

【 0 0 3 3 】

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、E B ウイルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより F a b、s c F v 等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2 本の完全な H 鎖および 2 本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組み込まれた動物を意味する。具体的には、マウス E S 細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該 E S 細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

【 0 0 3 4 】

抗体断片としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、d s F v、および C D R を含むペプチドなどがあげられる。

F a b は、I g G 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 2 2 4 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。

本発明の F a b は、C C R 4 に特異的に反応する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 F a b をコードする D N A 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、F a b を製造することができる。

F (a b')₂ は、I g G 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 2 3 4 番目のアミノ酸残基で切断される)、F a b がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 1 0 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【 0 0 3 5 】

本発明の F (a b')₂ は、C C R 4 に特異的に反応する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 F a b' をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

F a b' は、上記 F (a b')₂ のヒンジ領域のジスルフィド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。

本発明の F a b' は、C C R 4 に特異的に反応する F (a b')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、該抗体の F a b' 断片をコードする D N A 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 F a b' を発現させ、製造することができる。

s c F v は、一本の V H と一本の V L とを適当なペプチドリinker (以下、P と表記する) を用いて連結した、V H - P - V L ないしは V L - P - V H ポリペプチドを示す。本発明の s c F v に含まれる V H および V L は、本発明の C C R 4 に特異的に反応する抗体

10

20

30

40

50

、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

【0036】

本発明の *s c F v* は、*C C R 4* に特異的に反応する抗体の *V H* および *V L* をコードする *c D N A* を取得し、*s c F v* をコードする *D N A* を構築し、該 *D N A* 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、*s c F v* を製造することができる。

d s F v は、*V H* および *V L* 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ジスルフィド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 *R e i t e r* らにより示された方法 (*P r o t e i n E n g i n e e r i n g*, 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 *d s F v* に含まれる *V H* および *V L* は本発明の *C C R 4* に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれをも用いることができる。

10

【0037】

本発明の *d s F v* は、*C C R 4* に特異的に反応する抗体の *V H* および *V L* をコードする *c D N A* を取得し、*d s F v* をコードする *D N A* を構築し、該 *D N A* 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、*d s F v* を製造することができる。

C D R を含むペプチドは、*H* 鎖または *L* 鎖 *C D R* の少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数の *C D R* は、直接または適当なペプチドリinkerを介して結合させることができる。

20

本発明の *C D R* を含むペプチドは、*C C R 4* に特異的に反応する抗体の *V H* および *V L* をコードする *c D N A* を取得した後、*C D R* をコードする *D N A* を構築し、該 *D N A* 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、*C D R* を含むペプチドを製造することができる。

また、*C D R* を含むペプチドは、*F m o c* 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、*t B o c* 法 (*t* - ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法によって製造することもできる。

【0038】

30

本発明の抗体は、本発明の *C C R 4* に特異的に反応する抗体、例えば、ヒト化抗体、ヒト抗体またはそれらの抗体断片に放射性同位元素、蛋白質または薬剤など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、*C C R 4* 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放射性同位元素、蛋白質あるいは薬剤などを化学的手法 (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。

または、*C C R 4* に特異的に反応する抗体または抗体断片をコードする *D N A* と、結合させたい蛋白質をコードする *D N A* 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。以上のような遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

40

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 等があげられ、例えば、クロラミン T 法等により、抗体に結合させることができる。

【0039】

薬剤としては、低分子のものが好ましく、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5 - フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン C、ダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤等の抗癌剤 (臨床腫瘍学、

50

日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社（１９９６）、またはハイドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤等の抗炎症剤（炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（１９８２））などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシン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ダウノマイシン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。

【００４０】

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカインが好適であり、例えば、ヒトインターロイキン２（以下、 $hIL-2$ と表記する）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下、 $hGM-CSF$ と表記する）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下、 $hM-CSF$ と表記する）、ヒトインターロイキン１２（以下、 $hIL-12$ と表記する）等があげられる。また、癌細胞を直接傷害するため、リシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体または抗体断片をコードする $cDNA$ に蛋白質をコードする $cDNA$ を連結させ、融合抗体をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物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、融合抗体を製造することができる。

【００４１】

以下に、 $CCR4$ に特異的に反応し、かつ H 鎖および L 鎖の V 領域に新規のアミノ酸配列を有するヒト型キメラ抗体の作製方法を例に挙げて説明する。

１．ハイブリドーマ産生抗 $CCR4$ モノクローナル抗体の作製

（１）抗原の調製

$CCR4$ をコードする $cDNA$ を含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等に導入してリコンビナント $CCR4$ 蛋白質を得る。あるいは $CCR4$ を発現した培養腫瘍細胞もしくは該細胞より精製して得た $CCR4$ 蛋白質、あるいは、 $CCR4$ 部分配列を有する合成ペプチドを抗原に用いることもできる。

抗原用部分ペプチドとしては、５～３０残基程度の蛋白質部分配列が選択される。変性していない天然の構造を有している状態の該蛋白質を認識する抗体を取得するためには、立体構造上蛋白質の表面に存在している部分配列を抗原ペプチドとして選択する必要がある。立体構造上蛋白質表面に存在する部分は、Genetyx Macなど市販の蛋白質配列解析ソフトを用い、親水性の高い部分配列を予測することで推測することができる。即ち、一般的に親水性の低い部分は立体構造上蛋白質の内部に存在する場合が多く、親水性の高い部分は蛋白質表面に存在する場合が多いためである。また、蛋白質の N 末端、 C 末端は蛋白質表面に存在する場合が多い。しかしながら、このように選択した部分ペプチドが目的通りの抗体を確立する抗原となるとは限らない。

【００４２】

部分ペプチドには蛋白質と架橋するために、システインを末端に付加する。蛋白質の内部配列を選択した場合には、必要に応じペプチドの N 末端はアセチル化、 C 末端はアミド化する。

部分ペプチドは一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる（The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1, Erhard GrossおよびJohannes Meinhof編、Academic Press（１９７９）、第２巻（１９８０）、第３巻（１９８１）；ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善（１９８５）；続医薬品の開発、第１４巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店（１９９１）；International Journal of Peptide Protein Research、35、161（１９９０））

。

【0043】

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、Applied Biosystems, Inc., USA社製(以下、ABI社と表記する)ペプチド合成機、Advanced ChemTech Inc., USA社製(以下、ACT社と表記する)ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護したN α -Fmoc-アミノ酸あるいはN α -Boc-アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。

。

【0044】

10

原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI社、島津製作所、国産化学(株)、ノバ・バイオケム社(Nova Biochem)、渡辺化学(株)、ACT社、またはペプチド研究所(株)等から入手することができる。また、原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法に従って、あるいはそれに準じて合成することができる(The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1, Erhard GrossおよびJohannes Meinhofer編、Academic Press(1979)、第2巻(1980)、第3巻(1981); ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善(1985); 続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店(1991); International Journal of Peptide Protein Research, 35, 161(1990))。

20

【0045】

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

免疫に用いる動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものでもよい。下記に、マウスおよびラットを用いる例を説明する。

3~20週令のマウスまたはラットに、上記1(1)で調製した抗原を免疫し、その動物の脾、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバントとともに抗原を数回投与することにより行う。アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's

30

Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどがあげられる。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA(ウシ血清アルブミン)やKLH(Keyhole Limpet hemocyanin)などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。各投与後3~7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、抗原として用いたCCR4に対する反応性について、酵素免疫測定法などで確認し(酵素免疫測定法(ELISA法)、医学書院刊(1976))、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源とする。抗原物質の最終投与後3~7日目に、免疫したマウスまたはラットより公知の方法(Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory(1988))に準じて脾臓を摘出し、脾細胞

40

【0046】

(3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1)(Euro. J. Immunol., 6, 511(1976))、SP2/0-Ag14(SP-2)(Nature, 276, 269(1978))、P3-X63-Ag8653(653)(J. Immunol., 123, 1548(1979))、P3-X63-Ag8(X63)(Nature, 256, 495(1975))など、in vitroで増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代

50

については公知の方法 (Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) に従い、細胞融合時までに 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【0047】

(4) 細胞融合

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール - 1000 (PEG - 1000) などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄には MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1 リットル、pH 7.2) などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地 { 正常培地 (RPMI - 1640 培地にグルタミン (1.5 mM)、2 - メルカプトエタノール (5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン (10 μ g/ml) および牛胎児血清 (FCS) (CSL 社製、10%) を加えた培地) にヒポキサンチン (10^{-4} M)、チミジン (1.5×10^{-5} M) およびアミノプテリン (4×10^{-7} M) を加えた培地 } を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0048】

(5) ハイブリドーマ産生抗CCR4モノクローナル抗体の選択

抗CCR4モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択はAntibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988) に述べられている方法などに従い、以下に述べる測定法により行う。これらの方法により、後述する抗CCR4ヒト型キメラ抗体、該抗体断片を産生する形質転換株の培養上清中に含まれる抗CCR4抗体あるいはすべての精製抗CCR4抗体の結合活性を測定することができる。

酵素免疫測定法：

抗原を96穴ELISAプレートに固層化する。ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行ない、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

当該ハイブリドーマ株の具体例としては、ハイブリドーマ株KM2160があげられる。

【0049】

(6) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理 (2, 6, 10, 14 - テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 ml を腹腔内投与し、2週間飼育する) した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、上記1(4)で得られる抗CCR4モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE - セファロースカラム、プロテインA - カラムあるいはセルロファインGSL2000 (生化学工業社製) のカラムなどを用いて、IgGあるいはIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられる。

マウスIgG2a、IgG2b、IgG3およびヒトIgG1、IgG3タイプは、比較的強いCDC活性およびADCC活性等の細胞傷害活性を有し、治療への応用上、有用である。

【0050】

10

2. ヒト化抗体の作製

(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H鎖C領域およびL鎖C領域をコードする遺伝子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H鎖C領域およびL鎖C領域をコードする遺伝子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。

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域であることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC γ 1と表記する）およびヒト抗体のL鎖の κ クラスのC領域（以下、hC κ と表記する）等があげられる。ヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域をコードする遺伝子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。

20

【0051】

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み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 (Cytotechnology, 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))、pSG1 β d2-4 (Cytotechnology, 4, 173 (1990))等があげられる。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とエンハンサー (J. Biochem., 101, 1307 (1987))、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー (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))等があげられる。

30

【0052】

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或いは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）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等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))等があげられる。

40

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

【0053】

(2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のH鎖のV領域およびL鎖のV領域をコー

50

ドする cDNA は以下の様にして取得する。

マウス抗体などを産生するハイブリドーマ細胞より mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体の C 領域部分或いは V 領域部分をプローブとして用い、H 鎖 V 領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドおよび L 鎖 V 領域をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の全塩基配列を決定し、塩基配列より H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

【0054】

ハイブリドーマ細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン - トリフルオロ酢酸セシウム法 (Methods in Enzymol., 154, 3 (1987))、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989)) 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34)、或いは市販のキット、例えば、Super ScriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP - cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法等があげられる。

【0055】

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express (Stratagene, 5, 58 (1992))、pBluescript II SK (+) (Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989))、λzap II (Stratagene 社製)、λgt10、λgt11 (DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985))、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、λExCell、pT7T318U (Pharmacia 社製)、pcD2 (Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)) および pUC18 (Gene, 33, 103 (1985)) 等が用いられる。

【0056】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持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、XL1-Blue MRF' (Stratagene, 5, 81 (1992))、C600 (Genetics, 39, 440 (1954))、Y1088、Y1090 (Science, 222, 778 (1983))、NM522 (J. Mol. Biol., 166, 1 (1983))、K802 (J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)) および JM105 (Gene, 38, 275 (1985)) 等が用いられる。

【0057】

10

20

30

40

50

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードするcDNAクローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989))により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction(以下、PCR法と表記する; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34)によりH鎖V領域およびL鎖V領域をコードするcDNAを調製することもできる。

【0058】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK(-)(Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー(Sanger, F.)らのジデオキシ法(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463 (1977))等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、A.L.F. DNAシーケンサー(Pharmacia社製)等を用いて解析することで該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【0059】

決定した塩基配列からH鎖V領域およびL鎖V領域の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の全アミノ酸配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991))と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。分泌シグナル配列を含む抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の全アミノ酸配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991))と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、H鎖V領域およびL鎖V領域の各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991))と比較することによって見出すことができる。

【0060】

更にH鎖V領域およびL鎖V領域の完全なアミノ酸配列を用いて任意のデータベース、例えば、SWISS-PROTやPIR-Protein等に対してBLAST法(J. Mol. Biol., 215, 403 (1990))等の配列の相同性検索を行い、配列の新規性を検討することができる。

【0061】

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

上記2(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体H鎖V領域およびL鎖V領域の3'末端側の塩基配列とヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域の5'末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な

制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを上記2(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。また、ヒト以外の動物の抗体H鎖V領域およびL鎖V領域のcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法により増幅し、それぞれを上記2(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

【0062】

(4) 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H鎖V領域およびL鎖V領域をコードする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H鎖V領域およびL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFRのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の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等のデータベースに登録されているヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の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))等があげられるが、その中でも、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H鎖V領域およびL鎖V領域のFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域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(Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991))を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100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、H鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計することが好ましい。

【0063】

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、上記2(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pBluescript SK(-)(Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、上記2(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0064】

(5) 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H鎖V領域およびL鎖V領域のCDRのみをヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の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H鎖V領域およびL鎖V領域では、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的或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の移植に伴い、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型

C D R 移植抗体では、ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のF R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C D R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(B I O / T E C H N O L O G Y , 9 , 2 6 6 (1 9 9 1))。ヒト型C D R 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F R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 . M o l . B i o l . , 1 1 2 , 5 3 5 (1 9 7 7)) 或いはコンピュータモデリング(P r o t e i n E n g i n e e r i n g , 7 , 1 5 0 1 (1 9 9 4)) 等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C D R 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C D R 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等の種々の試行錯誤が必要である。

10

ヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のF Rのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAを用いて上記2(4)に記載の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上記2(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。

【0065】

(6) ヒト型C D R 移植抗体発現ベクターの構築

20

上記2(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域をコードする遺伝子上流に、上記2(4)および(5)で構築したヒト型C D R 移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードするcDNAをクローニングし、ヒト型C D R 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

例えば、上記2(4)および(5)でヒト型C D R 移植抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域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、上記2(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のH鎖C領域およびL鎖C領域をコードする遺伝子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。

【0066】

30

(7) ヒト化抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、上記2(3)および(6)に記載のヒト化抗体発現ベクター、或いはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化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、ヒト化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))等があげられる。

40

【0067】

発現ベクターの導入後、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酵素免疫抗体法(ELISA法); Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14(1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited(1996)等により測定できる。

【0068】

50

(8) ヒト化抗体の安定発現

上記2(3)および(6)に記載のヒト化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化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(特開平2-257891、Cytotechnology, 3, 133(1990))等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化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(以下、dhfrと表記する)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(ATCC CRL1662、以下、YB2/0細胞と表記する)等があげられる。

10

【0069】

抗体依存性細胞傷害活性を有する抗体を製造するための宿主細胞としては、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加させる反応に関連する酵素活性の低いまたは当該酵素活性を有しない細胞を用いることが好ましい。具体的には、YB2/0細胞があげられる。

N-アセチルグルコサミンにフコースを付加させる酵素としては、 α 1,6結合に関与する酵素、具体的には α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、GDP-フコースの生合成に係る酵素、具体的にはGDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ、GDP- β -L-フコースピロフォスフォリラーゼ、フコキナーゼなどがあげられる。したがって、宿主細胞として用いる細胞の、これらの酵素の遺伝子を欠損させたり、該遺伝子への変異を与えて酵素活性を低下させるかあるいは欠失させたりなどの人為的変異を行うことにより得られた細胞を、宿主細胞として用いることもできる。

20

【0070】

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、本発明の遺伝子組換え抗体を生産させることが可能であればいかなる細胞でもよいが、動物細胞が好ましい。動物細胞としては、YB2/0細胞、マウスミエロマ細胞であるNSO細胞、Sp2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44細胞、サルの細胞であるCOS細胞、ヒトミエロマ細胞であるナマルバ(Namalwa)細胞などがあげられる。

30

当該宿主細胞を用いることにより、抗体のFc領域に結合する糖鎖が、N-アセチルグルコサミンにフコースが結合しないN-グルコシド結合糖鎖含量が高い抗体を取得することができる。当該抗体は、CCR4発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い抗体依存性細胞傷害活性を示す。

【0071】

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に発現する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418 sulfate(以下、G418と表記する:Sigma社製)等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。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FCS等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化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法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、dhfr増幅系等を利用してヒト化抗体の発現量を上昇させることができる。

40

【0072】

50

ヒト化抗体は、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 Laboratory, 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鎖或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(以下、SDS-PAGEと表記する: 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))等で測定することができる。

10

【0073】

(9) ヒト化抗体の活性評価

精製したヒト化抗体の抗原との結合活性、CCR4発現細胞株に対する結合活性はELISA法および蛍光抗体法(Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993))等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定し、評価することができる(Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993))。

20

【0074】

3. 抗CCR4抗体を用いたCCR4の検出および定量法

本発明は、本発明の抗体を用いて、CCR4またはCCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法に関する。

本発明の抗体を用いて、CCR4、CCR4を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法(ELISA法)、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法(ABC法、CASA法等)、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチELISA法(単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック(1987)、続生化学実験講座5免疫生化学研究法、東京化学同人(1986))などがあげられる。

30

蛍光抗体法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート(FITC)などの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

【0075】

免疫酵素抗体法(ELISA法)とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

40

放射性物質標識免疫抗体法(RIA)とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート(FITC)などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

【0076】

サンドイッチELISA法とは、本発明の抗体で、抗原認識部位の異なる2種類の抗体

50

のうち、あらかじめ一方の抗体はプレートに吸着させ、もう一方の抗体はF I T Cなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素で標識しておき、抗体吸着プレートに、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識した抗体を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である。

【 0 0 7 7 】

4 . T h 2 介在性免疫疾患または癌疾患の診断及び治療

本発明のヒト化抗体は、培養細胞株に発現しているC C R 4 と特異的に結合し、かつC D C 活性およびA D C C 活性等の細胞傷害活性を示すため、T h 2 介在性疾患等の診断、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に比べ、ヒト抗体の10
アミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において強い細胞傷害活性を示し、かつ免疫原性を示さず、その効果が長期間に渡り持続することが期待される。

また、本発明の抗体を、被験者の細胞あるいは組織に投与することにより、細胞が産生するT h 2 サイトカインであるI L - 4、I L - 5、I L - 1 3等の産生を抑制することができる。

本発明に係るT h 2 細胞としては、好ましくは、活性化T h 2 細胞またはメモリーT h 2 細胞などがあげられる。具体的には、C D 4 5 R A - およびC D 4 + の性質を有する細胞があげられる。

【 0 0 7 8 】

本発明の遺伝子組換え抗体が有する細胞傷害活性は、T h 2 細胞に本発明の抗体が結合し、当該細胞にアポトーシスを誘導することなどにより生ずる。また、アポトーシスを誘導することにより当該細胞に傷害を与え、除去することができる。20

また、T h 2 介在性免疫疾患または癌疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒトC C R 4 陽性細胞を、上述した免疫学的に検出する方法があげられる。

また、本発明の抗体は、T h 2 介在性免疫疾患または癌疾患、また異常なT h 2 細胞の増加・減少により病態が進行する疾患の診断薬として用いることができる。

さらに、本発明の抗体はその細胞傷害活性によりヒトC C R 4 発現細胞を減少もしくは除去できるため、本発明の抗体を用いるT h 2 介在性免疫疾患または癌疾患の診断方法あるいは治療方法、本発明の抗体を有効成分とする、T h 2 介在性免疫疾患または癌疾患の30
治療薬および予防薬が提供される。

【 0 0 7 9 】

T h 2 介在性免疫疾患とは、軽度・重度に関わらず、急性あるいは慢性の気道過敏性や気管支喘息、アトピー性皮膚炎を含むアトピー性皮膚疾患、アレルギー性鼻炎または花粉症などの炎症性疾患、T h 2 細胞から放出されるサイトカイン・ケモカインによって増殖もしくは活性化し得る好酸球や肥満細胞などの炎症担当細胞、ならびにT h 2 細胞から放出されるサイトカイン・ケモカインによって産生されるI g E等の生体機能分子に基づく疾患、また異常なT h 2 細胞の変動により病態が進行する免疫疾患を示す。

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。40

【 0 0 8 0 】

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等の非経口投与をあげることができる。抗体またはペプチド製剤の場合、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、テープ剤等があげられる。

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、顆粒剤等があげられる。

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、果糖等の糖50

類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p - ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

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

【0081】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

10

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等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体またはペプチドそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体またはペプチド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。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体またはペプチドおよび用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等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回当たり10 μ g / kg ~ 8 mg / kg である。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0082】

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

マウス抗CCR4モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞の作製：

以下の手順に従い、マウス抗CCR4モノクローナル抗体、KM2160 (Int. Immunol., 11, 81 (1999)) を産生するハイブリドーマ細胞を作製した。

(1) 抗原の調製

30

ヒトCCR4 (以下、hCCR4と記す) 蛋白質のアミノ酸配列 (配列番号17) を Genetyx Mac を用いて解析し、親水性の高い部分、N末端、C末端のなかから抗原として適当と考えられる部分配列として、化合物1 (配列番号1) を選択した。また、マウスCCR4 (以下、mCCR4と記す) (BBRC, 218, 337 (1996)) 蛋白質のアミノ酸配列中、化合物1に相当する部分を化合物2 (配列番号2) として選択した。配列番号1および2は、それぞれヒトおよびマウスCCR4のN末端アミノ酸から2~29番目に相当する。

【0083】

略号本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会 (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) の勧告 (European Journal of Biochemistry, 138, 9 (1984)) に従った。

40

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

【0084】

Ala: L - アラニン

Asn: L - アスパラギン

Asp: L - アスパラギン酸

Asx: L - アスパラギン酸またはL - アスパラギン

Cys: L - システイン

50

G l n : L - グルタミン
 G l u : L - グルタミン酸
 G l x : L - グルタミン酸または L - グルタミン
 G l y : グリシン
 I l e : L - イソロイシン
 L e u : L - ロイシン
 L y s : L - リジン
 M e t : L - メチオニン
 P h e : L - フェニルアラニン
 P r o : L - プロリン
 S e r : L - セリン
 T h r : L - スレオニン
 T y r : L - チロシン
 V a l : L - バリン

【 0 0 8 5 】

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

【 0 0 8 6 】

F m o c : 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル
 t B u : t - ブチル
 T r t : トリチル
 B o c : t - ブチルオキシカルボニル
 F m o c - T h r (t B u) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル -
 O - t - ブチル - L - スレオニン
 F m o c - S e r (t B u) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル -
 O - t - ブチル - L - セリン
 F m o c - T y r (t B u) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル -
 O - t - ブチル - L - チロシン
 F m o c - L y s (B o c) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル -
 N ε - t - ブチルオキシカルボニル - L - リジン
 F m o c - A s n (T r t) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル -
 N γ - トリチル - L - アスパラギン
 F m o c - G l n (T r t) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル -
 N δ - トリチル - L - グルタミン
 F m o c - A s p (O t B u) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル
 - L - アスパラギン酸 - β - t - ブチルエステル
 F m o c - G l u (O t B u) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル
 - L - グルタミン酸 - γ - t - ブチルエステル
 F m o c - C y s (T r t) - O H : N α - 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル -
 S - トリチル - L - システイン

【 0 0 8 7 】

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

【 0 0 8 8 】

P y B O P : ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサ
 フルオロホスフェート
 H O B t : N - ヒドロキシベンゾトリアゾール
 D M F : N , N - ジメチルホルムアミド
 D C M : ジクロロメタン
 T F A : トリフルオロ酢酸
 N M M : N - メチルモルホリン
 D T T : ジチオスレイトール

【0089】

(1)化合物1(配列番号1)(H-Asn-Pro-Thr-Asp-Ile-Ala-Asp-Thr-Thr-Leu-Asp-Glu-Ser-Ile-Tyr-Ser-Asn-Tyr-Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ser-Ile-Pro-Lys-Pro-Cys-OH)の合成

H-Cys(Trt)、16.8 μmolが結合した担体樹脂(クロロトリチル樹脂、AnaSpec社製)30mgを自動合成機(島津製作所社製)の反応容器に入れ、1mlのDCM/DMF(1:1)を加えて10分間攪拌し溶液を排出し、さらに1mlのDMFを加えて1分間攪拌し溶液を排出した後、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

10

【0090】

(a) Fmoc-Pro-OH(168 μmol)、PyBOP(168 μmol)、HOBt・1水和物(168 μmol)およびNMM(252 μmol)をDMF(588.2 μl)中で5分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を60分間攪拌し、溶液を排出した。

(b) 担体樹脂を707 μlのDMFで1分間洗浄し、これを5回繰り返した。こうして、Fmoc-Pro-Cys(Trt)が担体上に合成された。

次に以下のFmoc基脱保護工程を行った。

(c) 30%ピペリジン-DMF溶液707 μlを加えて混合物を4分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう1回繰り返した。

20

(d) 担体樹脂を707 μlのDMFで1分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を5回繰り返した。

こうして、Fmoc基を除去したH-Pro-Cys(Trt)の結合した担体樹脂を得た。

【0091】

次に、(a)の工程でFmoc-Lys(Boc)-OHを用いて縮合反応を行い、(b)の洗浄工程、次いで(c)、(d)の脱保護工程を経て、H-Lys(Boc)-Pro-Cys(Trt)が担体上に合成された。以下、工程(a)において、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OHを順次用いて、(a)~(d)を繰り返した。次に工程(a)においてFmoc-Asn(Trt)-OHを用いて縮合反応を行い、(b)の洗浄工程を経て、再び工程(a)のFmoc-Asn(Trt)-OHを用いた縮合反応、(b)の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d)の脱保護工程を行った。引き続き、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OHを順次用いて、(a)~(d)を繰り返した。次に工程(a)においてFmoc-Leu-OHを用いて縮合反応を行い、(b)の洗浄工程を経て、再び工程(a)のFmoc-Leu-OHを用いた縮合反応、(b)の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d)の脱保護工程を行った。以降、工程(a)で、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OHを順次用いて、(a)、(b)の縮合反応工程を2度繰り返した後に(c)、(d)の脱保護工程を行うという一連の操作を繰り返した後、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し、減圧下12時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA(90%)、チオアニソール(5%)、1,2-エタンジチオール(5%)からなる混合溶液1mlを加えて室温で2時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約10mlを加え、生成した

30

40

50

沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、減圧下乾燥させて、粗ペプチドとして63.7mgを取得した。この粗生成物を60mgのDTT存在下2mlのDMFに溶解後、逆相カラム（資生堂社製、CAPCELL PAK C18 30mm I.D. × 25mm）を用いたHPLCで精製した。0.1% TFA水溶液に、TFA 0.1%を含む90%アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220nmで検出し、化合物1を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物1を2.5mg得た。

【0092】

質量分析 (FABMS) ; $m/z = 3227.5 (M + H^+)$

アミノ酸分析 ; Asx 4.8 (5), Glx 2.7 (2), Ser 3.1 (3), Thr 2.0 (3), Ala 1.1 (1), Pro 3.1 (3), Tyr 3.8 (4), Leu 2.2 (2), Lys 1.2 (1), Ile 3.0 (3), Cys 1.2 (1) 10

【0093】

(2)化合物2（配列番号2）（H-Asn-Ala-Thr-Glu-Val-Thr-Asp-Thr-Thr-Gln-Asp-Glu-Thr-Val-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Tyr-Phe-Tyr-Glu-Ser-Met-Pro-Lys-Pro-Cys-OH）の合成

H-Cys(Trt)、28.0μmolが結合した担体樹脂（クロロトリチル樹脂、AnaSpec社製）50mgを出発原料として、(1)と同様に、工程(a)において、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OHを順次用いて、(a)~(d)を繰り返した。次に工程(a)においてFmoc-Ser(tBu)-OHを用いて縮合反応を行い、(b)の洗浄工程を経て、再び工程(a)のFmoc-Ser(tBu)-OHを用いた縮合反応、(b)の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d)の脱保護工程を行った。続いて工程(a)においてFmoc-Asn(Trt)-OHを用いて縮合反応を行い、(b)の洗浄工程を経て、再び工程(a)のFmoc-Asn(Trt)-OHを用いた縮合反応、(b)の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d)の脱保護工程を行った。引き続き、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OHを順次用いて、(a)~(d)を繰り返した。次に工程(a)においてFmoc-Gln(Trt)-OHを用いて縮合反応を行い、(b)の洗浄工程を経て、再び工程(a)のFmoc-Gln(Trt)-OHを用いた縮合反応、(b)の洗浄工程を繰り返してから、(c)、(d)の脱保護工程を行った。以降、工程(a)で、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OHを順次用いて、(a)~(b)の縮合反応工程を2度繰り返した後に(c)、(d)の脱保護工程を行うという一連の操作を繰り返した後、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。(1)と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド96.3mgを取得し、逆相カラムを用いたHPLCで精製し、化合物2を5.8mg得た。 20 30 40

【0094】

質量分析 (TOFMS) ; $m/z = 3297.7 (M + H^+)$

アミノ酸分析 ; Asx 4.1 (4), Glx 4.3 (4), Ser 2.0 (2), Thr 4.6 (5), Ala 1.0 (1), Pro 2.2 (2), Tyr 3.9 (4), Val 1.9 (2), Met 1.0 (1), Phe 1.0 (1), Lys 50

1 . 1 (1) , C y s 1 , 1 (1)

【 0 0 9 5 】

(2) 免疫原の調製

実施例 1 の (1) で得られた h C C R 4 部分ペプチドは、免疫原性を高める目的で以下の方法で K L H (カルビオケム社) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、K L H を P B S に溶解して 1 0 m g / m l に調整し、1 / 1 0 容量の 2 5 m g / m l M B S (ナカライテスク社) を滴下して 3 0 分間攪拌反応させた。あらかじめ P B S で平衡化したセファデックス G - 2 5 カラムなどのゲルろ過カラムでフリーの M B S を除いて得られた K L H - M B 2 . 5 m g を 0 . 1 M リン酸ナトリウムバッファー (p H 7 . 0) に溶解したペプチド 1 m g と混合し、室温で 3 時間、攪拌反応させた。反応後、P B S で透析した。

10

【 0 0 9 6 】

(3) 動物の免疫と抗体産生細胞の調整

実施例 1 の (2) で調製したペプチド - K L H コンジュゲート 1 0 0 μ g をアルミニウムゲル 2 m g および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1 × 1 0 ⁹ 細胞とともに 5 週令雌マウス (B a l b / c) に投与し、2 週間後より 1 0 0 μ g のコンジュゲートを 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。最終投与後 3 日目のマウスより脾臓を摘出し、M E M 培地 (日水製薬社製) 中で裁断し、ピンセットを用いて解した後、遠心分離 (1 2 0 0 r p m 、5 分間) して上清を除去後、3 m l のトリス - 塩化アンモニウム緩衝液 (p H 7 . 6 5) で 1 ~ 2 分間処理し、赤血球を除いた。更に、M E M 培地で 3 回洗浄した後、細胞融合に供した。

20

(4) マウス骨髄腫細胞の調製

8 - アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株 P 3 X 6 3 A g 8 U . 1 (A T C C C R L 1 5 9 7 、以下、P 3 - U 1 と表記する) を培養し、細胞融合における親株として用いた。

【 0 0 9 7 】

(5) ハイブリドーマ細胞の作製

実施例 1 の (3) および (4) で得られた脾細胞と骨髄腫細胞を 1 0 : 1 になる様に混合し、遠心分離 (1 2 0 0 r p m 、5 分間) して上清を除去後、沈殿した細胞群に 3 7 の条件下でポリエチレングリコール溶液 (2 g のポリエチレングリコール - 1 0 0 0 、2 m l の M E M 培地および 0 . 7 m l の D M S O からなる溶液) を 1 0 ⁸ 個の脾細胞あたり 0 . 5 m l 加え、よく懸濁した。更に、1 ~ 2 分間毎に M E M 培地を 1 ~ 2 m l ずつ数回加え、最終的に M E M 培地で全量を 5 0 m l とした。遠心分離 (9 0 0 r p m 、5 分間) して上清を除去後、1 0 0 m l の H A T 培地に懸濁し、9 6 ウェルマイクロタイタープレート (住友ベークライト社製) に 1 0 0 μ l / ウェルずつ分注して 5 % C O ₂ インキュベーター内で 3 7 °C で 1 0 ~ 1 4 日間培養した。融合細胞の増殖が見られたウェルについて、培養上清中 h C C R 4 部分ペプチド (化合物 1) に対する結合活性を実施例 2 の 2 項 (3) に記載の E L I S A 法により測定した。活性の認められたウェルについては、培地を H T 培地に変えて 1 回、更に、培地を正常培地に変えて 1 回、の計 2 回の限界希釈法によるクローン化を行った。この様にして、マウス抗体 K M 2 1 6 0 を生産するハイブリドーマ細胞 K M 2 1 6 0 を得た。第 1 図に示すように K M 2 1 6 0 は h C C R 4 部分ペプチド (化合物 1) に特異的に反応した。

30

40

【 0 0 9 8 】

実施例 2

抗 C C R 4 キメラ抗体の作製 1 . 抗 C C R 4 マウス抗体の V 領域をコードする c D N A の単離、解析 :

(1) 抗 C C R 4 マウス抗体生産ハイブリドーマ細胞からの m R N A の調製

実施例 1 に記載されたハイブリドーマ細胞 K M 2 1 6 0 より m R N A を回収した。m R N A の調製キットである F a s t T r a c k m R N A I s o l a t i o n K i t

50

(Invitrogen社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、ハイブリドーマ細胞KM2160の 8×10^7 細胞よりmRNAを約48 μ g調製した。

【0099】

(2) 抗CCR4マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

実施例2の1項(1)で取得したKM2160のmRNAの5 μ gから、cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、両端にEcoRI - NotIアダプターを有するcDNAを合成した。作製したcDNAを20 μ lの滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG型抗体のH鎖に対応する約1.5kbのcDNA断片と κ 型のL鎖に対応する約1.0kbのcDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてそれぞれ回収した。次に、 λ ZAPII Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit (Stratagene社製)を用いて、各々の約1.5kbのcDNA断片0.1 μ gおよび約1.0kbのcDNA断片0.1 μ gと、制限酵素EcoRIで消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphataseで末端を脱リン酸化した λ ZAPIIベクター1 μ gを、添付の使用説明書に従い、連結した。連結後の各々の反応液のうち2.5 μ lをGigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、 λ ファージにパッケージングした後、適量を大腸菌株XL1-Blue (Biochemicals, 5, 376 (1987))に感染させて、KM2160のH鎖cDNAライブラリーとして 9.3×10^4 個、L鎖cDNAライブラリーとして 7.4×10^4 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、添付の使用説明書に従って、ナイロンメンブレンフィルターHybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech社製)上に固定した。

【0100】

(3) 抗CCR4マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAのクローニング

実施例2の1項(2)で作製したKM2160のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラ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 System (Amersham Pharmacia Biotech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 (H鎖はマウスCy1cDNAのBamHI - EcoRI断片 (EMBO J., 3, 2047 (1984))、L鎖はマウスC κ cDNAのHpaI - EcoRI断片 (Cell, 22, 197 (1980))をプローブとして検出し、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、 λ ZAPII Cloning Kit (Stratagene社製)の使用説明書に従い、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。こう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 (PE Biosystems社製)を用いて、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377により解析した。その結果、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pKM2160H4およびL鎖cDNAを含むプラスミドpKM2160L6を得た。

【0101】

(4) 抗CCR4マウス抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

プラスミドpKM2160H4に含まれていたH鎖V領域の全塩基配列を配列番号3に、それから推定されたH鎖V領域の全アミノ酸配列を配列番号15に、プラスミドpKM2160L6に含まれていたL鎖V領域の全塩基配列を配列番号4に、それから推定されたL鎖V領域の全アミノ酸配列を配列番号16にそれぞれ示す。なお、配列番号15および16に記載したアミノ酸配列にそれぞれ対応する塩基配列は、配列番号3および4に記

10

20

30

40

50

載したものの以外に無数に存在するが、それらはすべて本発明の範囲に包含される。既知のマウス抗体の配列データ (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)) との比較および精製した抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (島津製作所社製: PPSQ-10) を用いて解析した結果との比較から、単離した各々のcDNAは分泌シグナル配列を含む抗CCR4マウス抗体KM2160をコードする完全長cDNAであり、H鎖については配列番号15に示したアミノ酸配列の1から19番目が、L鎖については配列番号16に示したアミノ酸配列の1から19番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

10

【0102】

次に、抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖およびL鎖のV領域のアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとしてGCG Package (version 9.1, Genetics Computer Group社製) を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベースをBLASTP法 (Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)) により検索した。その結果、H鎖、L鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖V領域およびL鎖V領域は新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖V領域およびL鎖V領域のCDRを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖のV領域のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号5、6および7に、L鎖のV領域のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号8、9および10にそれぞれ示した。

20

【0103】

2. 抗CCR4キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

(1) 抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160の構築 WO97/10354に記載のヒトIgG1、κ型の抗体を発現できるヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と実施例2の1項(3)で得られたプラスミドpKM2160H4およびpKM2160L6を用いて抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160を以下の様にして構築した。

30

KM2160のH鎖V領域cDNAをPCR法によって得るために配列番号11と12に示した塩基配列を有する合成DNAを、L鎖V領域cDNAを得るために配列番号13と14に示した塩基配列を有する合成DNAを設計した。それぞれの合成DNAは5'末端にpKANTEX93へクローニングするための制限酵素認識配列を含んでおり、DNAの合成はジェンセット社に委託した。実施例2の1項(3)で得られたプラスミドpKM2160H4の20ngを50μlのKOD DNA Polymerase添付PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウム、0.5μMの配列番号11と12に示した塩基配列を有する合成DNAを含む緩衝液に添加し、DNAサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER社製) を用いて、94℃にて3分間加熱した後、2.5単位のKOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、94℃にて30秒間、58℃にて30秒間、74℃にて1分間のサイクルを25サイクル行った。同様に、実施例2の1項(3)で得られたプラスミドpKM2160L6の20ngを50μlのKOD DNA Polymerase添付PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM塩化マグネシウム、0.5μMの配列番号13と14に示した塩基配列を有する合成DNAを含む緩衝液に添加し、上記の方法でPCR反応を行なった。該反応液10μlをアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、約0.46kbのH鎖V領域PCR産物、約0.43kbのL鎖V領域PCR産物をそれぞれ回収した。

40

50

【0104】

次に、プラスミド pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 SmaI (宝酒造社製) で消化して得られた DNA 0.1 µg と、上記で得られたそれぞれの PCR 産物約 0.1 µg を滅菌水に加えて 7.5 µl とし、TAKARA DNA Ligation Kit Ver. 2 の solution I (宝酒造社製) 7.5 µl、制限酵素 SmaI 0.3 µl を加えて 22 で一晩反応させた。この様にして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) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って 10 反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した。こうして目的の塩基配列を有する第 2 図に示したプラスミド pKM2160VH41 および pKM2160VL61 を得た。

【0105】

次にヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 と上記で得られた pKM2160VH41 の 3 µg をそれぞれ 30 µl の 10 mM トリス - 塩酸 (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウムおよび 1 mM DTT からなる緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) を加えて 37 で 1 時間反応させた。該反応液をエタノール沈殿し、10 µl の 50 mM トリス - 塩酸 (pH 7.5)、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、100 µg/ml BSA および 0.01% トラ 20 イトン X-100 からなる緩衝液に加え、更に 10 単位の制限酵素 NotI (宝酒造社製) を加えて 37 で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKANTEX93 の約 12.75 kb、pKM2160VH41 の約 0.44 kb の ApaI - NotI 断片をそれぞれ回収した。得られた 2 種類の断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて添付の説明書に従って連結し、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) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA 各プラスミド DNA を調製して制限酵素処理により確認し、目的の約 0.44 kb の ApaI - NotI 断片が挿入された第 3 図に示したプラスミド pKANTEX2160H を得た。

【0106】

次に上記で得られた pKANTEX2160H と pKM2160VL61 の 3 µg を 50 mM トリス - 塩酸 (pH 7.5)、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT および 100 µg/ml BSA からなる緩衝液に加え全量を 30 µl とし、10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を加えて 55 で 1 時間反応させた後、更に制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37 で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、pKANTEX2160H の約 13.20 kb、pKM2160VL61 の約 0.41 kb の EcoRI - BsiWI 断片をそれぞれ回収した。得られた 2 種類の断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver. 2 を用いて添付の説明書に従って連結し、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 40 転換した。形質転換株のクローンより各プラスミド DNA を調製して制限酵素処理により確認し、目的の約 0.41 kb の EcoRI - BsiWI 断片が挿入された第 4 図に示したプラスミド pKANTEX2160 を得た。該プラスミドに関して、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社の DNA シーケンサ ABI PRISM 377 により塩基配列を解析した結果、目的の KM2160H 鎖および L 鎖 V 領域 cDNA がクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

【0107】

(2) 抗CCR4キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

10

20

30

40

50

実施例2の2項(1)で得られた抗CCR4キメラ抗体発現ベクターpKANTEX2160を用いて抗CCR4キメラ抗体の動物細胞での発現を以下の様にして行った。

プラスミドpKANTEX2160を制限酵素AatII(東洋紡績社製)で消化して直線状化した後、 $10\mu\text{g}$ を 4×10^6 細胞のラットミエローマ細胞株YB2/0細胞(ATCC CRL1662)へエレクトロポレーション法(Cytotechnology, 3, 133(1990))により導入後、 40ml のH-SFM(GIBCO-BRL社製)培地(FCSを5%添加)に懸濁し、96ウェルマイクロタイタープレート(住友ベークライト社製)に $200\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37、24時間培養した後、G418を $1\text{mg}/\text{ml}$ になる様に添加して1~2週間培養した。G418耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗CCR4キメラ抗体の抗原結合活性を実施例2の2項(3)に示すELISA法(二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(γ)抗体を使用)により測定した。

10

【0108】

培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418を $1\text{mg}/\text{ml}$ 、dhfr遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素(以下、DHFRと表記する)の阻害剤であるメソトレキセート(以下、MTXと表記する:Sigma社製)を 50nM 含むH-SFM培地に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/ ml になる様に懸濁し、24ウェルプレート(Greiner社製)に 1ml ずつ分注した。5%CO₂インキュベーター内で37で1~2週間培養して、 50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗CCR4キメラ抗体の抗原結合活性を実施例2の2項(3)に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗CCR4キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を 100nM 、 200nM と順次上昇させ、最終的にG418を $1\text{mg}/\text{ml}$ 、MTXを 200nM の濃度で含むH-SFM培地で増殖可能かつ、抗CCR4キメラ抗体を高発現する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2回の限界希釈法による単一細胞化(クローン化)を行い、抗CCR4キメラ抗体の発現の最も高い形質転換細胞クローンをKM2760と命名した。KM2760の抗CCR4キメラ抗体の発現量は約 $5\mu\text{g}/10^6$ 細胞/24時間であった。また、KM2760の抗体H鎖C領域はヒトIgG1サブクラスである。なお、KM2760は平成12年2月24日付で、通商産業省 工業技術院生命工学工業技術研究所(現・経済産業省 産業技術総合研究所 生命工学工業技術研究所)(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)にFERM BP-7054として国際寄託されている。

20

30

【0109】

(3) 抗体のCCR4部分ペプチドに対する結合活性の測定(ELISA法)

アッセイ用の抗原には実施例1の(1)で得られたhCCR4部分ペプチド(化合物1)をサイログロブリン(以下、THYと表記する)とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は実施例1の(2)に記した通りであるが、架橋剤にはMBSの代わりに4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシリクアシッドN-ヒドロキシサクシンイミドエステル(SMCC、Sigma社)を用いた。96穴のEIA用プレート(グライナー社)に、上述のように調製したコンジュゲートを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50\mu\text{l}$ /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を含むPBS(以下、1%BSA-PBSと表記する)を $100\mu\text{l}$ /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、形質転換株の培養上清、精製したマウス抗体または精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を $50\mu\text{l}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20を含むPBS(以下、Tween-PBSと表記する)で洗浄後、マウス抗体を添加したウェルには1%BSA-PBSで400倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIg抗体溶液(DAKO社製)を、ヒト型キメラ抗体を添加したウェルには1

40

50

% BSA - PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (γ) 抗体溶液 (American Qual ex 社製) を二次抗体溶液として、それぞれ 50 μl / 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 (2, 2' - アジノ - ビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸) アンモニウム) の 0.55 g を 1 L の 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を 1 μl / ml で添加した溶液) を 50 μl / ウェルで加えて発色させ、415 nm の吸光度 (以下、OD 415 と表記する) を測定した。

【0110】

(4) 抗CCR4キメラ抗体の培養上清からの精製

実施例2の2項(2)で得られた抗CCR4キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローンKM2760をMTXを200 nM、Daigo's GF21 (和光純薬製) を5%の濃度で含むH-SFM (GIBCO-BRL社製) に $1 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/ml となる様に懸濁し、175 cm² フラスコ (Greiner社製) に100 ml ずつ分注した。5% CO₂ インキュベーター内で37℃で5~7日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約200 ml よりProsep-A (Bioprocessing社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CCR4キメラ抗体KM2760を精製し、約1.9 mg の精製蛋白質を取得した。得られた抗CCR4キメラ抗体KM2760の約3 μg を、公知の方法 (Nature, 227, 680 (1970)) に従って電気泳動し、分子量および精製度を調べた。その結果を第5図に示した。第5図に示した様に、精製した抗CCR4キメラ抗体KM2760は、非還元条件下は約150 キロダルトン (以下、Kd と表記する) であり、還元条件下では約50 Kd と約25 Kd の2本のバンドが認められた。これらの蛋白質の大きさは、KM2760のH鎖およびL鎖のcDNAの塩基配列から推定される分子量 (H鎖: 49, 226、L鎖: 24, 168) とほぼ一致し、更に、IgG型の抗体は、非還元条件下では分子量は約150 Kd であり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合 (以下、S-S結合と表記する) が切断され、約50 Kd の分子量を持つH鎖と約25 Kd の分子量を持つL鎖に分解されるという報告 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) と一致し、抗CCR4キメラ抗体KM2760が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。また、精製した抗CCR4キメラ抗体KM2760のH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (島津製作所社製: PPSQ-10) を用いて解析した結果、抗CCR4マウス抗体KM2160のH鎖およびL鎖のN末端アミノ酸配列と一致することを確認した。

【0111】

3. hCCR4高発現細胞の確立

(1) 動物細胞用発現ベクターCAG-pcDNA3の構築

動物細胞用発現ベクターpcDNA3 (INVI TROGEN社) のプロモーター領域をサイトメガロウイルス (CMV) からCAG (AG (モディファイド チキン βアクチン) プロモーターウィズCMV-IEエンハンサー) に変更した発現ベクター (CAG-pcDNA3) を作製し、CCR4遺伝子を組み込むことで発現ベクターを以下のように構築した。

5 μg のpcDNA3を制限酵素NruI (宝酒造社製) で37℃、1時間反応させた後、エタノール沈殿によりDNA断片を回収した。次に制限酵素HindIII (宝酒造社製) で37℃、1時間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて分画後、CMVプロモーター領域を含まない約5.8 kbのDNA断片を回収した。3 μg のCAGプロモーター (Nuc. Acid. Res., 23, 3816 (1995)) 領域を有するプラスミドCAG-pBluescript I IKS (+) をSalI (宝酒造社製) で37℃、1時間反応後、エタノール沈殿によりDNA断片を回収した。DNA Blunting

10

20

30

40

50

K i t (宝酒造社製)にて平滑末端化し、さらにH i n d I I Iで37 1時間反応してアガロースゲル電気泳動にて分画し、C A Gプロモーター領域を含む約1.8 k bのD N A断片を回収した。それぞれ回収したD N A断片をD N A L i g a t i o n K i t (宝酒造社製)を用いてl i g a t i o nし、得られた組換えプラスミドD N Aを用いて大腸菌D H 5 α株を形質転換し、プラスミドC A G - p c D N A 3を得た。

【0112】

(2) h C C R 4 発現ベクターの構築

実施例2の3項(1)で得られたC A G - p c D N A 3とh C C R 4 D N Aの組込まれたp c D N A 3 (C C R 4 / p c D N A 3)とを用いて以下のようにh C C R 4 発現ベクターを構築した。C A G - p c D N A 3、C C R 4 / p c D N A 3共にH i n d I I I
10
で37、1時間反応させ、エタノール沈殿によりD N A断片を回収した。次にB g l I I (宝酒造社製)で37、1時間反応させ、アガロースゲル電気泳動にて分画し、C A Gプロモーター領域を含む約2.0 k bのD N A断片とh C C R 4 遺伝子領域を含む約5.5 k bのD N A断片を回収した。以下、両D N A断片を実施例2の3項(1)と同様の方法を用いて、プラスミドC A G - C C R 4 / p c D N A 3を得た。

【0113】

(3) 動物細胞におけるh C C R 4 の発現

動物細胞へのプラスミドの導入は、実施例2の2項(2)と同様にエレクトロポレーション法にて行った。E L - 4細胞(A T C C T I B - 39)をP B S (-) (G I B C O B R L社製)にて 1×10^7 個/500 μ lに懸濁し、実施例2の3項(2)で得られたC A G - C C R 4 / p c D N A 3を10 μ g加えて氷中で10分間放置した後、専用
20
キュベット(バイオラッド社製)に入れ、260 V、500 μ F Dで遺伝子導入を行った。さらに10分間氷中にて放置した後、10% F C S - R P M I培地200 mlに懸濁し、96ウェル細胞培養用プレートに200 μ l/ウェルずつ分注した。24時間後に培養上清を100 μ l/ウェル除去し、1 mg/mlのG 4 18を含む10% F C S - R P M I培地を100 μ l/ウェルずつ分注し、最終濃度0.5 mg/mlとした。2週間後、数十株のシングルクローンを選択して拡大培養した。

【0114】

(4) h C C R 4 高発現細胞の選択

実施例1の(5)で作製されたK M 2 1 6 0を用いて、蛍光抗体法で選択した。選択した数十株の遺伝子導入細胞各 2×10^5 個を96ウェルU字プレートに分注した。公知の方法(酵素抗体法:学際企画刊(1985))でビオチン標識したK M 2 1 6 0をF A C S用緩衝液(1% B S A - P B S、0.02% E D T A、0.05% N a N ₃、p H 7.4)で5 μ g/mlに、また非特異的な染色を防ぐために、ヒトI g G (ウェルファイド社製)を3.75 mg/mlにそれぞれ希釈した抗体溶液を200 μ l/ウェルとして加え、氷中で30分間反応させた。陰性対象としては、ビオチン化抗I L - 5 R抗体(W O 97/10354)を同濃度で用いた。緩衝液にて200 μ l/ウェルで2回洗浄後、ストレプトアビジン - P E (日本ベクトン・ディッキンソン社製)を20 μ l/ウェル加えた。遮光し氷中で30分間反応後、200 μ l/ウェルで3回洗浄し、最終的に500 μ lに懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、最も強い蛍光強度の株を1種
40
類選択した。

【0115】

実施例3

抗C C R 4 キメラ抗体の機能解析:

1. 抗C C R 4 キメラ抗体の活性評価

(1) 抗C C R 4 キメラ抗体のヒトおよびマウスC C R 4 に対する反応性(E L I S A 法)

精製した抗C C R 4 キメラ抗体K M 2 7 6 0のヒトおよびマウスC C R 4 に対する反応性を実施例2の2項(3)に示すE L I S A法により測定した。抗原としては実施例1の(1)で得られたh C C R 4 部分ペプチド(化合物1)およびm C C R 4 部分ペプチド(

10

20

30

40

50

化合物 2) を T H Y とコンジュゲートしたものを用いた。作製方法は実施例 1 の (2) に記した通りであるが、架橋剤には M B S の代わりに S M C C (S i g m a 社) を用いた。第 6 図は E L I S A 用のプレートの各ウェルに吸着させる C C R 4 ペプチドコンジュゲートの量を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $50 \mu\text{l} / \text{ウェル}$ に固定し、添加する抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 の濃度を变化させて反応性を検討した結果である。第 6 図に示したように、抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 は、h C C R 4 部分ペプチドと m C C R 4 部分ペプチドに対して、ほぼ同等の結合活性を有していた。この結果により、抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 は、ヒトおよびマウスの C C R 4 の N 末端アミノ酸から 2 ~ 2 9 番目に存在するエピトープを認識することが明らかになった。

【 0 1 1 6 】

10

(2) 抗 C C R 4 キメラ抗体の h C C R 4 高発現細胞との反応性 (蛍光抗体法)

精製した抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 と実施例 2 の 3 項 (4) で作製した h C C R 4 高発現細胞 (以下、C C R 4 / E L - 4 と表記する) との反応性は、実施例 2 の 3 項 (4) と同様の方法で測定した。第 7 図に示した様に、抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 は C C R 4 / E L - 4 細胞に対して強い反応を示した。

【 0 1 1 7 】

2 . 抗 C C R 4 キメラ抗体の i n v i t r o 細胞傷害活性 (A D C C 活性)

実施例 2 の 2 項 (4) で得られた精製 C C R 4 キメラ抗体の i n v i t r o 細胞傷害活性を評価するため、以下に示す方法に従い、A D C C 活性を測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

20

実施例 2 の 3 項 (4) で得られた h C C R 4 高発現細胞 C C R 4 / E L - 4 を $0.5 \text{ mg} / \text{ml}$ の G 4 1 8 を含む 1 0 % F C S - R P M I 1 6 4 0 培地で培養し、 1×10^6 細胞 / 0.5 ml となる様に調製し、放射性物質であるクロム酸ナトリウム ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) (第一化学薬品社製) を 1.85 MBq 当量加えて 3 7 で 1 . 5 時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、R P M I 1 6 4 0 培地で懸濁および遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4 で 3 0 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、1 0 % F C S - R P M I 1 6 4 0 培地を 5 ml 加え、 2×10^5 細胞 / ml に調製し、標的細胞溶液とした。

【 0 1 1 8 】

(2) エフェクター細胞溶液の調製

30

ヘパリンナトリウム注射液 (武田薬品社製) を 2 0 0 単位 ($200 \mu\text{l}$) 入れた注射筒を用いて、健康人ヒト末梢血 60 ml を採取した。その全量を等量の生理食塩液 (大塚製薬社製) にて 2 倍に希釈し、 120 ml とした。15 ml 容量の遠心管 (住友ベークライト社製) 1 2 本にリンフォプレップ (N Y C O M E D 社製) を 5 ml ずつ分注し、その上から希釈した末梢血を 10 ml ずつ重層し、 $800 \times g$ 、2 0 分間、室温で遠心分離した。血漿層とリンフォプレップ層の間にある P B M C 画分をすべての遠心管より採取して 1 % F C S を含む R P M I 1 6 4 0 培地 (G I B C O 社製) (以下、1 % F C S - R P M I と表記する) に懸濁し、 $400 \times g$ 、5 分間、4 で 2 回遠心洗浄して 5×10^6 細胞 / ml の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞とした。

【 0 1 1 9 】

40

(3) A D C C 活性の測定

9 6 ウェル U 字底プレート (F a l c o n 社製) の各ウェルに実施例 3 の 2 項 (1) で調製した標的細胞溶液の $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 細胞 / ウェル) を分注した。次いで実施例 3 の 2 項 (2) で調製したエフェクター細胞溶液を $100 \mu\text{l}$ (5×10^5 細胞 / ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 5 0 : 1 となる) 添加した。更に、各種抗 C C R 4 キメラ抗体を各最終濃度 $0.01 \sim 10 \mu\text{g} / \text{ml}$ となる様に加え、3 7 で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、1 ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ の上清の ^{51}Cr 量を γ - カウンターにて測定した。自然解離 ^{51}Cr 量は、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上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。全解離 ^{51}Cr 量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細

50

胞溶液の代わりに1規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の ^{51}Cr 量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式により求めた。

【0120】

【数1】

$$\text{細胞障害活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

【0121】

その結果を第8図に示した。第8図に示した様に、抗CCR4キメラ抗体は0.01から10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で抗体濃度依存的に強い細胞傷害活性を示した。陰性対象として遺伝子非導入株であるEL-4細胞のADCC活性を同様に測定したが、活性は確認されなかったため、この細胞傷害活性はCCR4特異的であることが示された。以上の結果は、抗CCR4キメラ抗体KM2760が効率よくヒトのエフェクター細胞を活性化してCCR4を発現したTh2細胞を減少もしくは除去でき、気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのヒトのTh2介在性免疫疾患の診断もしくは治療に有用であることを示している。

【0122】

実施例4

抗CCR4キメラ抗体のヒト末梢血に及ぼす影響：

(1) ヒトPBMCに対するADCC活性の測定

実施例3の2項(2)と同様の方法でPBMCを分離し、最終的に1 $\times 10^7$ 細胞/mlの濃度で懸濁した。実施例3の2項(3)で用いたU字プレートに100 μl /ウェルずつ分注し、1 $\times 10^6$ 細胞/ウェルとした。KM2760と陰性対照である抗IL-5受容体抗体KM8399(WO97/10354)を20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈し、細胞を分注したウェルに100 μl /ウェルずつ分注した。5%CO₂気流下、37℃で24時間培養後、細胞を回収した。細胞傷害性の検出はAnnexin V-EGFP Apoptosis Detection Kit(MBL社製)を用いて、アネキシンV陽性細胞を死細胞とした。400 $\times g$ 、3分間、4℃で遠心分離し、5 $\times 10^5$ 細胞に対して200 μl のキットに付属しているBinding bufferに懸濁した。その中に1 μl のAnnexin V-EGFP試薬を添加し、数回ピペティング後、遮光して5分間反応させた。反応終了後、400 $\times g$ 、3分間、4℃で遠心分離し、上清を除いた。軽くボルテックスをかけてペレットを崩し、氷上にて冷却した2.5mM CaCl₂を含むメタノールを100 μl 添加し、4℃、10分間静置した。8000 $\times g$ 、30秒間で遠心分離し、上清を除去した。Binding buffer 200 μl にて懸濁し、遠心洗浄を2回行った。上清を除去したペレットにPC5標識抗CD4抗体(coulter社製)を10 μl 、PE標識抗CD45RA抗体(coulter社製)を20 μl 、2.5mM CaCl₂を含むFACS用緩衝液を20 μl 添加し、4℃、30分間反応させた。その後2.5mM CaCl₂を含むFACS用緩衝液で3回遠心洗浄し、フローサイトメーター(coulter社製)で解析した。まずCD4とCD45RAの染色性の違いにより細胞集団を4つに分画した(CD4+CD45RA+、CD4+CD45RA-、CD4-CD45RA+、CD4-CD45RA-)。次に各分画でのアネキシンV陽性率を測定し、細胞傷害%とした。その結果を第9図に示した。PBMCはKM2760と共培養した場合にのみ細胞傷害性が観察され、またその傷害性はCCR4陽性細胞の属するCD4+CD45RA-分画に特異的に検出された。

【0123】

(2) ヒトPBMCからのサイトカイン産生抑制効果

実施例3の2項(3)と同様にしてPBMCとKM2760(最終濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を24時間共培養し、ADCC活性を誘導した。培養後、上清を100 μl 除去し、代わりに1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のPMA(ホルボール・ミリステート・アセテート)と200ng/mlのA23187(カルシマイシン)(RBI社製)を含んだ培地100 μl を加え、最終濃度をPMAが0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、A23187が100ng/mlとし、細胞を刺

10

20

30

40

50

激してサイトカイン産生を誘導させた（条件(1)）。別の刺激条件として、A 2 3 1 8 7 の代わりに抗CD3抗体であるOKT-3（ATCC CRL-8001）を最終濃度50 ng/mlでサイトカイン産生を誘導させた（条件(2)）。各刺激剤導入後、24時間培養した後に培養上清を回収してサイトカイン測定キット（パイオソース社製）にてIL-4、IL-5、IL-13、インターフェロン（IFN）-γを測定した。第10図に示すように、KM2760添加群では著明にTh2サイトカインであるIL-4、IL-5、IL-13の産生が抑制されたが、Th1サイトカインであるIFN-γは影響なかった。

【0124】

実施例5

抗CCR4キメラ抗体のヒトT細胞系白血病細胞株への反応性：

（1）膜表面上への結合性（蛍光抗体法）

抗CCR4キメラ抗体KM2760と以下のヒトT細胞系白血病細胞株8株、HPB-ALL（Cancer Research, 54, 1511（1994）；急性T細胞系白血病）、HSB-2（ATCC CCL-120.1；白血病（T細胞））、MOLT-4（JCRB9031；リンパ腫（T細胞））、TALL-1（JCRB0086；白血病（T細胞））、Jurkat（ATCC TIB-152；急性T細胞系白血病）、CCRF-CEM（ATCC CCL-119；急性T細胞系白血病）、PEER（JCB0830、白血病（T細胞））、Hut78（ATCC TIB-161；皮膚T細胞系リンパ腫）との反応性を、実施例2の3項（4）と同様の方法で測定した。但しビオチン化KM2760の濃度は10 μg/mlとした。第11図に示したように、抗CCR4キメラ抗体KM2760は8株中5株（HPB-ALL、Jurkat、CCRF-CEM、PEER、Hut78）に対して強い反応性を示した。

【0125】

（2）ADCC活性

実施例5の1項で抗CCR4キメラ抗体KM2760での反応性が確認された細胞株5株に対するADCC活性の測定を実施例3の2項と同様の方法で測定した。第12図に示したように、全細胞について抗CCR4キメラ抗体KM2760は濃度依存的に傷害した。

【0126】

実施例6

抗CCR4キメラ抗体KM2760のインビボ（in vivo）における活性評価（Th2サイトカインの産生抑制）：

実施例2の2項（4）で得られた精製抗CCR4キメラ抗体KM2760のin vivoにおける活性を評価するため、カニクイザルに単回静脈内投与後、経日的に約1か月間にわたって採血を行い、PMA（Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Sigma社製）およびIONOMYCIN（Sigma社製）刺激によって末梢白血球にサイトカイン産生を誘導し、Th2サイトカインであるIL-4およびIL-13とTh1サイトカインであるIFN-γを測定した。以下に方法と結果を記す。

【0127】

精製抗CCR4キメラ抗体KM2760の投与量（蛋白量）はそれぞれ0.1 mg/kg、1.0 mg/kg、および10 mg/kgであり、各用量群とも2匹の4歳齢雄カニクイザルに単回静脈内投与を行った。採血は、投与前、投与後1週目、2週目、3週目、4週目に大腿静脈より行った。抗凝固剤にはヘパリン（ヘパリンナトリウム注射液, 1000 units/ml, 清水製薬株式会社製）を用い、血液1 mlに対しヘパリン25 unitsの濃度になるように添加した。平底24ウェルプレートを用い、各個体の末梢血を500 μl/ウェルの容量で2ウェルに分注した。一方には刺激剤（PMA終濃度50 ng/ml, IONOMYCIN終濃度1 μg/ml）を含む培地を、残りの一方には刺激剤を含まない培地をそれぞれ500 μl/ウェル加え、軽く攪拌し、5% CO₂、95

10

20

30

40

50

% 空気、37℃で24時間培養した。なお、用いた培地は、RPMI 1640 (GIBCO BRL社製) 100 ml に対し、ペニシリン・ストレプトマイシン液 (GIBCO BRL社製) 0.5 ml、非働化済牛胎児血清 (PAA laboratories社製) 5.6 ml を添加したものである。培養終了後、各ウェルより血球ごと培養液を回収し、遠心分離 ($6700 \times g$, 5分, 4℃) によって上清を得た。このようにして得られた培養上清に含まれるIL-4、IL-13、およびIFN- γ は、それぞれのサイトカイン測定キット (IL-4: OptEIA Human IL-4 Kit, Pharmingen社製; IL-13: Cyto screen Human IL-13 Immunoassay Kit, BioSource International社製; IFN- γ : Cyto screen Human IFN- γ Immunoassay Kit, BioSource International社製) を用いて定量した。10

各個体のサイトカインの産生量は、刺激剤を添加した量から刺激剤を添加しなかった量を差し引いた値である (0.1 mg/kg 群 個体番号 L-1, L-2, 1.0 mg/kg 群 個体番号 M-1, M-2, 10 mg/kg 群 個体番号 H-1, H-2)。その結果を第13図から第15図に示した。これらの図は、各個体毎にIL-4、IL-13、およびIFN- γ のそれぞれについて投与前の値を100%として、投与後の産生量を百分率で表したものである。Th2 サイトカインであるIL-4 (第13図) およびIL-13 (第14図) はすべての投与群において、投与後1週目から著明に減少し、投与後4週目においてもその抑制は継続した。一方、Th1 サイトカインであるIFN- γ (第15図) への影響は極めて小さいものであった。20

【0128】

以上の結果から、抗CCR4キメラ抗体KM2760をカニクイサルに投与すると、少なくとも4週間は末梢血単核球からのTh2 サイトカインの産生が抑制されることが明らかとなった。また、抗CCR4キメラ抗体KM2760がカニクイサル生体内において、CCR4を発現した末梢血中のTh2細胞を減少もしくは除去したことが示された。

【0129】

実施例7

抗CCR4キメラ抗体の*in vivo*抗腫瘍活性:

(1) 同系・腹腔内移植モデルに対する抗CCR4キメラ抗体KM2760の抗腫瘍効果

実施例2の2項(4)で得られたhCCR4高発現マウス由来細胞CCR4/EL-4細胞を、マウスに腹腔内移植したマウス同系腫瘍モデルに対する抗CCR4キメラ抗体KM2760の抗腫瘍効果を測定した。マウスは8週令、雄のC57BL/6マウス (日本クレア) を用いた。C57BL/6マウス10匹の腹腔内にPBS (-) (Gibco BRL社製) で 1×10^5 個/ml に懸濁したCCR4/EL-4細胞を200 μ l / 匹で移植した。その内の5匹に移植4時間後、3日後、6日後、10日後にクエン酸緩衝液 (pH6に調整した10 mmol/l クエン酸、150 mmol/l 塩化ナトリウム水溶液) で2 mg/ml に希釈したKM2760を腹腔内に200 μ l 投与した。残りの5匹はキメラ抗体を投与しない陰性対照群とした。移植当日より各群のマウスが腹水を伴う癌の増殖によって死亡するまでの日数を表1に示す。陰性対照群の平均生存日数が16.4日であったのに対し、KM2760投与群の平均生存日数は26.2日であった。KM2760投与により59.8%の生存期間の延長が認められ、KM2760はCCR4発現白血病細胞の同系・腹腔内移植モデルに対して延命効果を示した。40

【0130】

【表1】

表 1

	生存日数 (日)	平均値 (日)	延命率 (%)
陰性対照群	14/14/16/18/20	16.4	
KM2760 投与群	21/22/23/29/36	26.2	59.8

【 0 1 3 1 】

(2) 同系・皮下移植モデルに対する抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 の抗腫瘍効果

実施例 2 の 2 項 (4) で得られた h C C R 4 高発現マウス由来細胞 C C R 4 / E L - 4 細胞を、マウスに皮下移植したマウス同系腫瘍モデルに対する抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 の抗腫瘍効果を測定した。マウスは 8 週令、雄の C 5 7 B L / 6 マウス (日本ク

レア) を用いた。C 5 7 B L / 6 マウス 1 8 匹の腹側部の皮下に P B S (-) (G i b c o B R L 社製) で 1×10^6 個 / m l に懸濁した C C R 4 / E L - 4 細胞を $50 \mu l$ / 匹で移植した。うち 5 匹には移植 4 時間後、1 日 1 回、5 日間連続で、クエン酸緩衝液 (p H 6 に調整した $10 \text{ mmol} / \text{l}$ クエン酸、 $150 \text{ mmol} / \text{l}$ 塩化ナトリウム水溶液) で $2 \text{ mg} / \text{ml}$ に希釈した K M 2 7 6 0 を尾静脈より $100 \mu l$ 投与した。この時 1 回あたりの投与量は $200 \mu g$ / 匹となる。また別の 6 匹には移植 4 時間後、7 日後、1 4 日後にクエン酸緩衝液で $2 \text{ mg} / \text{ml}$ に希釈した K M 2 7 6 0 を尾静脈より $200 \mu l$ 投与した。この時 1 回あたりの投与量は $400 \mu g$ / 匹となる。残りの 7 匹はキメラ抗体を

投与しない陰性対照群とした。移植後 6 日目より経時的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は、各投与群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値に対する比、および投与開始後の生存日数で判定した。

腫瘍体積は下式にて算出した。

【 0 1 3 2 】

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径})^2 \times \text{長径} \times 0.5$$

【 0 1 3 3 】

各群の腫瘍体積の平均値を表 2 及び第 1 6 図、各群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値の比の結果を表 3 及び第 1 7 図に示す。移植後 1 8 日目における各 K M 2 7 6 0 投与群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値に対する比は、 $200 \mu g$ の 5 日間連続投与群が 0.356、 $400 \mu g$ の 3 回投与群が 0.257 であり、いずれの投与スケジュールにおいても K M 2 7 6 0 は C C R 4 陽性白血病細胞の同系・皮下移植モデルに対して増殖抑制効果を示した。

【 0 1 3 4 】

【表 2】

表 2

群構成	移植後の日数					
	0	6	10	12	15	18
陰性対照群	50±0	46±28	294±114	778±263	1825±708	3581±1279
KM2760 $200 \mu g \times 5$ 日間連続投与群	50±0	16±20	115±60	299±194	601±429	1274±886
KM2760 $400 \mu g \times 3$ 回投与群	50±0	0±0	73±49	198±158	431±467	920±1163

単位: $\text{mm}^3 \pm$ 標準偏差

【 0 1 3 5 】

【表 3】

10

20

30

40

表 3

群構成	移植後の日数					
	0	6	10	12	15	18
陰性対照群	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
KM2760 200 μ g $\times$ 5 日間連続投与群	1.000	0.348	0.393	0.384	0.330	0.356
KM2760 400 μ g $\times$ 3 回投与群	1.000	0.000	0.250	0.254	0.236	0.257

【0136】

(3) 異種移植モデルに対する抗CCR4キメラ抗体KM2760の抗腫瘍効果

CCR4を発現しているヒトT細胞白血病株CCRF-CEM細胞(ATCC CCL 119)をヌードマウスの皮下に移植したマウス異種移植・皮下腫瘍モデルに対する抗CCR4キメラ抗体KM2760の抗腫瘍効果を測定した。マウスは8週令、雄のBalb/cヌードマウス(日本クレア)を用いた。Balb/cヌードマウス20匹の腹側部の皮下にRPMI1640培地(Gibco BRL社製)で 1×10^8 個/mlに懸濁したCCRF-CEM細胞を200 μ l/匹で移植した。その後5匹ずつ4群に分け、うち3群には移植4時間後、3日後、6日後にそれぞれクエン酸緩衝液で2mg/ml、0.5mg/mlあるいは0.2mg/mlに希釈したKM2760を尾静脈より200 μ l投与した。この時、各群のKM2760投与量は400 μ g/匹/日、100 μ g/匹/日、40 μ g/匹/日となる。残りの1群はクエン酸緩衝液で2mg/mlに希釈したヒトイムノグロブリンG(以下hIgG、ウェルファイド社製)を尾静脈より200 μ l投与し(400 μ g/匹/日)、陰性対照群とした。移植後4日目より経時的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、抗腫瘍効果の判定は各群の腫瘍体積で判定した。腫瘍体積は下式にて算出した。

【0137】

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径})^2 \times \text{長径} \times 0.5$$

【0138】

各群の腫瘍体積の平均値の経時的变化を表4及び第18図に示す。KM2760のいずれの投与群においても腫瘍増殖の完全な抑制が認められ、KM2760はCCR4陽性白血病細胞の異種移植・皮下腫瘍モデルに対する増殖抑制効果を示した。

【0139】

【表4】

表 4

群構成	移植後の日数					
	0	6	10	12	15	18
陰性対照群	0 $\pm$ 0	44 $\pm$ 63	204 $\pm$ 159	233 $\pm$ 157	364 $\pm$ 86	448 $\pm$ 142
KM2760 40 μ g 投与群	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
KM2760 100 μ g 投与群	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
KM2760 400 μ g 投与群	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

単位: mm³ $\pm$ 標準偏差

【産業上の利用可能性】

【0140】

本発明により、ヒトCCR4に特異的に結合し、CCR4に対する新規なCDRを含む、遺伝子組換え抗体およびその抗体断片が提供される。本発明の抗体は免疫細胞染色におけるヒトTh2細胞の免疫学的検出、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などを始めとするすべてのTh2介在性免疫疾患や異常なTh2細胞のバランスにより病態が進行する疾患、白血病のような血液癌を始めとする癌疾患の診断あるいは治療に有用である。

【配列フリーテキスト】

【 0 1 4 1 】

配列番号 1 1 - 人工配列の説明：合成 D N A

配列番号 1 2 - 人工配列の説明：合成 D N A

配列番号 1 3 - 人工配列の説明：合成 D N A

配列番号 1 4 - 人工配列の説明：合成 D N A

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
 <120> Gene recombinant antibody and antibody fragment thereof 10
 <140> JP2001-564247
 <141> 2001-03-02
 <150> JP 2000-59508
 <151> 2000-03-03
 <150> JP 2000-401563
 <151> 2000-12-28
 <160> 17
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 28 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
 1 5 10 15
 Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
 20 25
 <210> 2
 <211> 28
 <212> PRT 30
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Asn Ala Thr Glu Val Thr Asp Thr Thr Gln Asp Glu Thr Val Tyr Asn
 1 5 10 15
 Ser Tyr Tyr Phe Tyr Glu Ser Met Pro Lys Pro Cys
 20 25
 <210> 3
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Mus musculus 40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(414)
 <400> 3
 atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48
 Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys
 20 25 30 50

cct gga ggg tcc ctg aaa atc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc	144	
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe		
35 40 45		
agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac atg agg ctg	192	
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu		
50 55 60		
gaa tgg gtc gca acc att agt agt gct agt act tat tcc tat tat cca	240	
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro		
65 70 75 80		
gac agt gtg aag gga cga ttc acc ata tcc agg gac aac gcc gag aac	288	10
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn		
85 90 95		
tcc cta tat ctg caa atg aat agt ctg agg tct gag gac aca ggc ata	336	
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile		
100 105 110		
tat tac tgt gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg	384	
Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp		
115 120 125		
ggc cga ggg act ctg gtc act gtc tct gca	414	
Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		20
130 135		
<210> 4		
<211> 396		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<220>		
<221> CDS		
<222> (1)..(396)		
<400> 4		
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct	48	30
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala		
1 5 10 15		
tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc	96	
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val		
20 25 30		
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cgg aac att	144	
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile		
35 40 45		
gtt cat att aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aga ccg	192	40
Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro		
50 55 60		
ggc cag tct cca aag ctc cta atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct	240	
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser		
65 70 75 80		
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288	
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
85 90 95		
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc	336	
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys		
100 105 110		50

ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg 384
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
 115 120 125

gaa atc aga cgg 396
 Glu Ile Arg Arg
 130

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 5

Asn Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15 20

Gly

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 16

30

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

40

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr

1 5

<210> 11

50

<211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 11
 aaggaaaaaa gcggccgcga cccctcacca tgaacctcg 39
 <210> 12
 <211> 39
 <212> DNA 10
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 12
 cgatgggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccag 39
 <210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220> 20
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 13
 ccggaattcg cctcctcaaa atgaagtgc c 31
 <210> 14
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA
 <400> 14 30
 agccaccgta cgtctgattt ccagcctggt g 31
 <210> 15
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 15
 Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys
 20 25 30 40
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile
 100 105 110 50

Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135
 <210> 16
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile
 35 40 45
 Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 Glu Ile Arg Arg
 130
 <210> 17
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
 1 5 10 15
 Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
 20 25 30
 Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
 35 40 45
 Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu
 50 55 60
 Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn
 65 70 75 80
 Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly
 85 90 95
 Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
 100 105 110
 Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
 115 120 125
 Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
 130 135 140

10

20

30

40

50

Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
 165 170 175
 Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
 195 200 205
 Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
 210 215 220
 Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
 225 230 235 240
 Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
 245 250 255
 Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
 260 265 270
 Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
 275 280 285
 Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
 290 295 300
 Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
 305 310 315 320
 Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
 325 330 335
 Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
 340 345 350
 Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
 355 360

10

20

【図面の簡単な説明】

第1図はKM2160の化合物に対するELISA法における反応性を示した図である 30

第2図はプラスミドpKM2160VH41とpKM2160VL61の造成工程を示した図である。

第3図はプラスミドpKANTEX2160Hの造成工程を示した図である。

第4図はプラスミドpKANTEX2160の造成工程を示した図である。

第5図は精製した抗CCR4キメラ抗体KM2760のSDS-PAGE(5~20%グラジエントゲルを使用)の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン1が高分子量マーカー、2がKM2760、3が低分子量マーカー、4がKM2760の泳動パターンをそれぞれ示す 40

第6図は精製した抗CCR4キメラ抗体KM2760のCCR4部分ペプチドとの結合活性を抗体濃度を变化させて測定した図である。縦軸はCCR4との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。

第7図は蛍光抗体法を用いた、CCR4高発現細胞(CCR4/EL-4)に対するKM2760の反応性を示した図である。

第8図は上図がCCR4/EL-4細胞、下図がEL-4細胞に対するADCC活性による細胞傷害性を示した図である。

第9図はCD4とCD45RAの染色性の違いによる4つの分画でのアネキシンV陽性率による、ヒトPBMCに対するADCC活性による細胞傷害性を示した図である。

第10図はヒトPBMCからのIL-4、IL-5、IL-13、IFN-γ産生抑制 50

効果を示した図である。

第 1 1 図は抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 のヒト T 細胞系白血病細胞株への反応性を示した図である。

第 1 2 図は抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 との反応性が確認されたヒト T 細胞系白血病細胞株に対する抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 による細胞傷害性を示した図である。

第 1 3 図は抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 をカニクイザルに投与した時の I L - 4 産生量の経時的変化を示した図である。

第 1 4 図は抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 をカニクイザルに投与した時の I L - 1 3 産生量の経時的変化を示した図である。

10

第 1 5 図は抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 をカニクイザルに投与した時の I F N - γ 産生量の経時的変化を示した図である。

第 1 6 図は h C C R 4 高発現マウス由来細胞 C C R 4 / E L - 4 細胞が皮下移植されたマウスに、抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 を投与した時の腫瘍体積の平均値の経時的変化を示した図である。

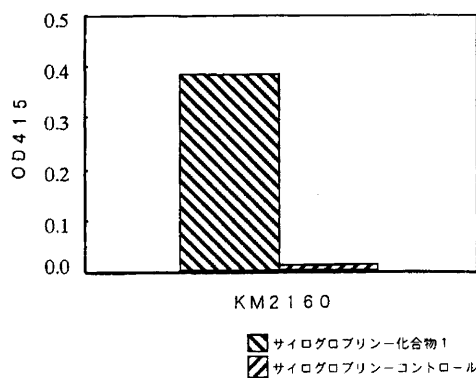
第 1 7 図は h C C R 4 高発現マウス由来細胞 C C R 4 / E L - 4 細胞が皮下移植されたマウスに、抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 を投与した時の投与群の腫瘍体積の平均値と非投与群の腫瘍体積の平均値の比の結果示した図である。

第 1 8 図は C C R 4 を発現しているヒト T 細胞白血病株 C C R F - C E M 細胞 (A T C C C C L 1 1 9) が皮下移植されたマウスに、抗 C C R 4 キメラ抗体 K M 2 7 6 0 を投与した時の腫瘍体積の平均値の経時的変化を示した図である。

20

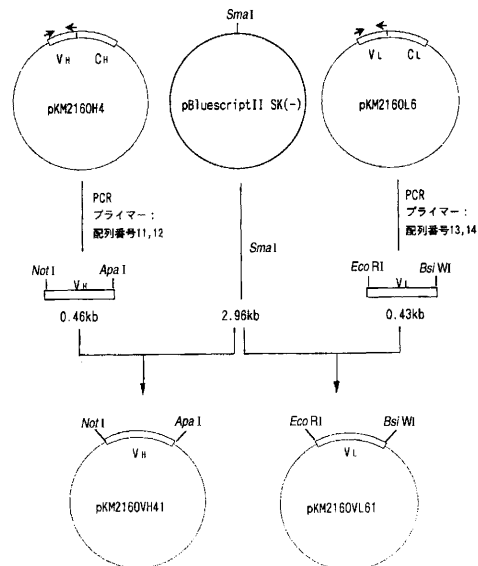
【 図 1 】

第 1 図



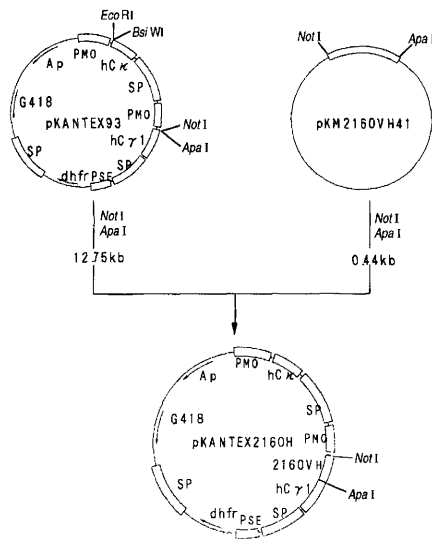
【 図 2 】

第 2 図



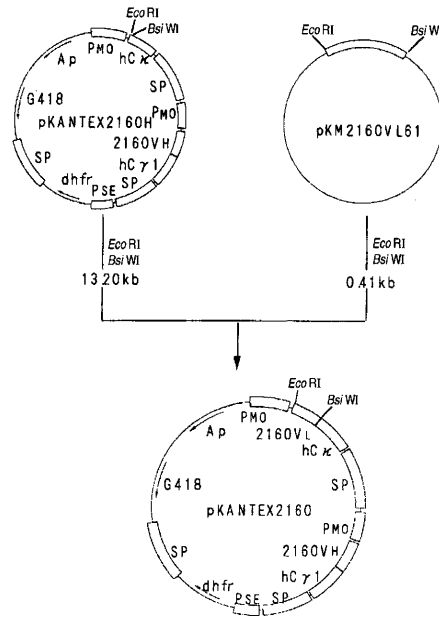
【図3】

第3図



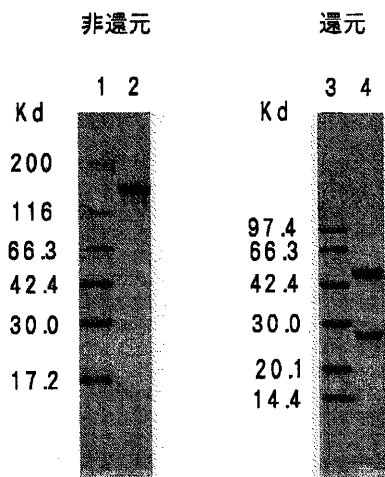
【図4】

第4図



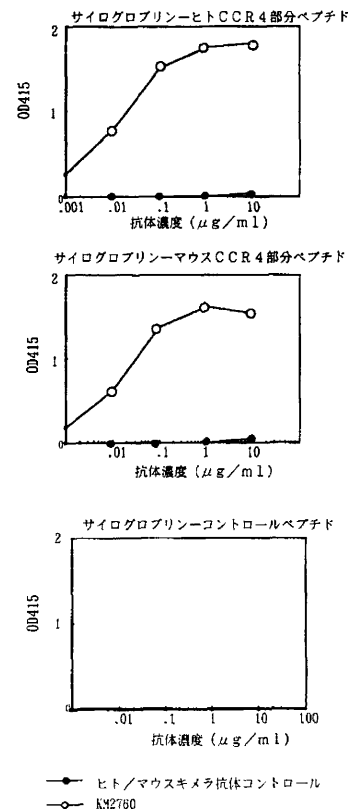
【図5】

第5図



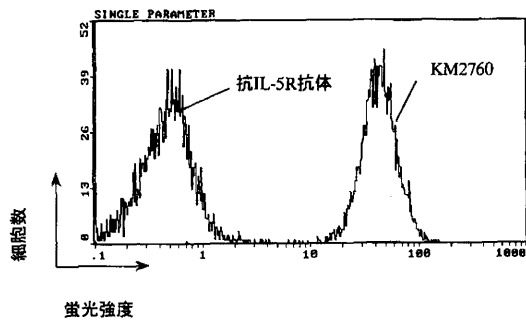
【図6】

第6図



【図 7】

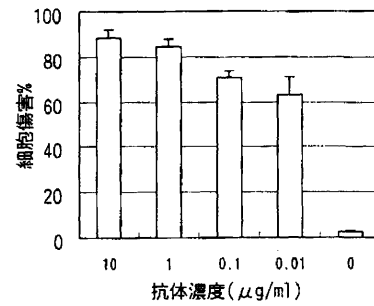
第 7 図



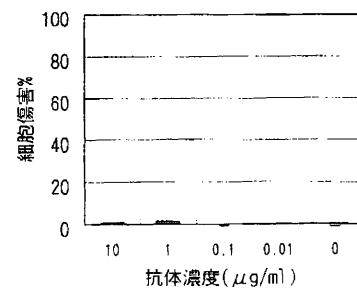
【図 8】

第 8 図

CCR4/EL-4細胞

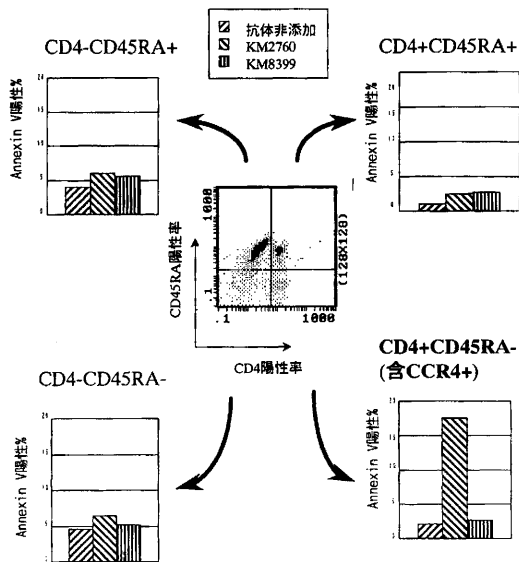


EL-4細胞



【図 9】

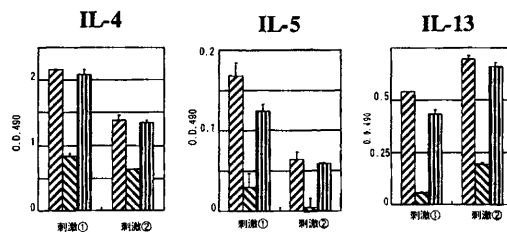
第 9 図



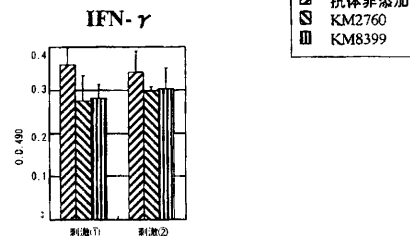
【図 10】

第 10 図

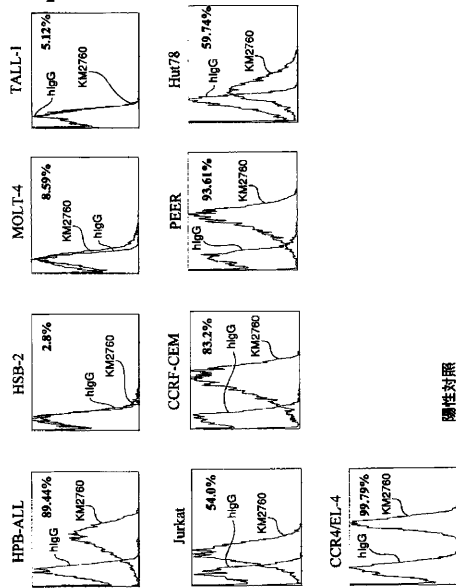
Th2サイトカイン



Th1サイトカイン

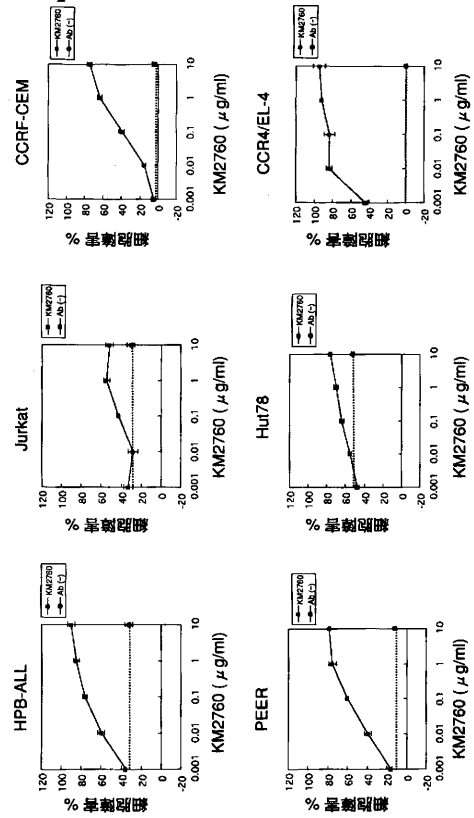


【図 1 1】



第11図

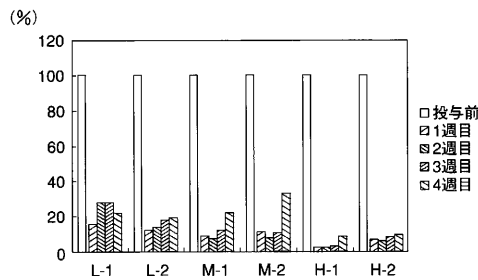
【図 1 2】



第12図

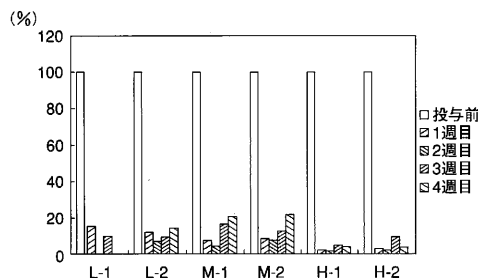
【図 1 3】

第13図



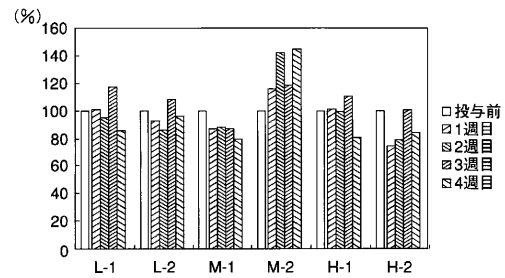
【図 1 4】

第14図



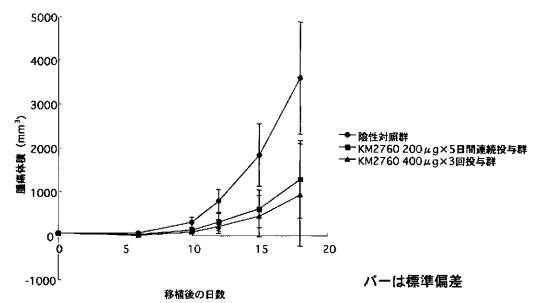
【図 1 5】

第15図



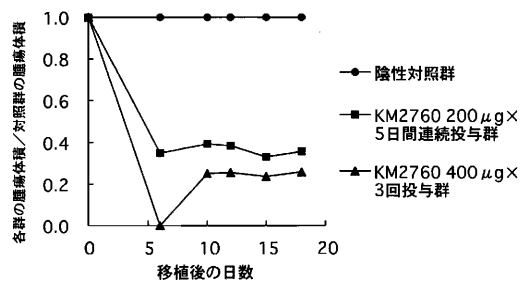
【図 1 6】

第16図



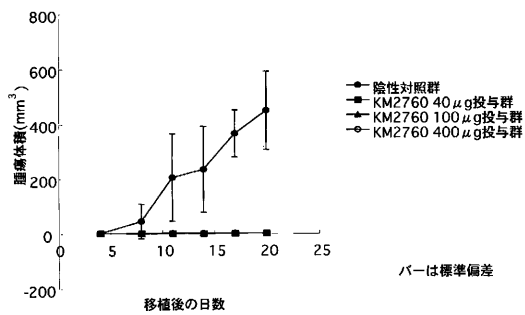
【図 17】

第 17 図



【図 18】

第 18 図



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	D
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		G 0 1 N 33/577	B
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 37/08 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
		A 6 1 P 37/08	

- (72)発明者 花井 陳雄
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 庄司 絵美
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 桜田 幹子
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 古谷 安希子
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 中村 和靖
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 丹羽 倫平
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 柴田 健志
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
- (72)発明者 山▲崎▼ 基生
東京都町田市旭町三丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 特表2002-539079(JP,A)
特表2002-544171(JP,A)
The Journal of Biological Chemistry, 1995, Vol.270, no.33, pp.19495-19500
免疫・Immunology Frontier, 1998, Vol.8, No.5, pp.311-325
Biotherapy, 1996, Vol.10, No.11, pp.1384-1391
臨床免疫, 1998, Vol.30, No.7, pp.947-955
Blood, 2000 July, Vol.96, No.2, pp.685-690

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
C07K 16/28
C07K 19/00
C12Q 1/02
C12N 5/10
G01N 33/53
G01N 33/574
G01N 33/577
A61K 39/395
A61P 35/02
A61P 37/08

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDream2)

专利名称(译)	基因工程抗体及其抗体片段		
公开(公告)号	JP3926153B2	公开(公告)日	2007-06-06
申请号	JP2001564247	申请日	2001-03-02
申请(专利权)人(译)	协和醣酵工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和醣酵工业株式会社		
[标]发明人	設楽研也 花井陳雄 庄司絵美 桜田幹子 古谷安希子 中村和靖 丹羽倫平 柴田健志 山崎基生		
发明人	設楽 研也 花井 陳雄 庄司 絵美 桜田 幹子 古谷 安希子 中村 和靖 丹羽 倫平 柴田 健志 山▲崎▼ 基生		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C07K19/00 C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577 A61K39/395 A61P35/02 A61P37/08 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/14 C12N15/13 C12P21/08 G01N33/543		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/00 A61P27/14 C07K16/2866 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/732 C07K2319/00 G01N33/543 G01N2333/78		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K19/00 C12N5/00.B C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/574.D G01N33/577.B A61K39/395.N A61P35/02 A61P37/08		
优先权	2000059508 2000-03-03 JP 2000401563 2000-12-28 JP		
其他公开文献	JPWO2001064754A1 JPWO2001064754A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

与人CCR4的胞外域特异性反应的重组抗体或其抗体片段； 编码重组抗体或其抗体片段的DNA； 生产重组抗体或其抗体片段的方法； 免疫学检测CCR4的方法，免疫学检测在细胞表面表达CCR4的细胞的方法，耗尽在细胞表面表达CCR4的细胞的方法和抑制Th2细胞因子产生的方法，包括使用 重组抗体或其抗体片段； Th2介导的免疫疾病的治疗剂或诊断剂； 以及血液癌症的治疗剂或诊断剂。

	生存日数 (日)	平均值 (日)	延命率 (%)
陰性对照群	14/14/16/18/20	16.4	
KM2760 投与群	21/22/23/29/36	26.2	59.8