

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500847

(P2004-500847A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 3
A 6 1 P 1/00	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 4
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 214 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-583805 (P2001-583805)	(71) 出願人	501392556 ゲーペーツェー バイオテック アーゲー ドイツ連邦共和国 ディー-8 2 1 5 2 マーティンスリード フラウンホファーシ ユトラーセ 2 0
(86) (22) 出願日	平成13年5月14日 (2001. 5. 14)	(71) 出願人	502249781 モルフォシス アクチェンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 マーティ ンスリード アム クロップファスピツ 1 9
(85) 翻訳文提出日	平成14年7月10日 (2002. 7. 10)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/015626	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02001/087338		
(87) 国際公開日	平成13年11月22日 (2001. 11. 22)		
(31) 優先権主張番号	00110063. 5		
(32) 優先日	平成12年5月12日 (2000. 5. 12)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	60/238, 762		
(32) 優先日	平成12年10月6日 (2000. 10. 6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫調節性のヒトMHCクラス I I 抗原結合ポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、免疫系の調節（モジュレーション）を生起しまたは導くヒトポリペプチドに関する。さらに本発明は、該ポリペプチドをコードする核酸、該ポリペプチドの産生方法、免疫抑制方法、医薬組成物および診断組成物、ならびに該ポリペプチドを含むキットおよび該ポリペプチドの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞の表面上に発現された抗原に対する結合特異性を有するヒト組成の抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチドを含有する組成物であって、1以上の前記ポリペプチドで前記抗原を発現する細胞を処理すると免疫応答抑制が生じまたは導かれ、かつ前記免疫応答抑制に対するIC50が1 μ M以下である、前記組成物。

【請求項 2】

ヒトHLA-D R抗原に対する結合特異性を有する抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドでHLA-D Rを発現する細胞を処理すると免疫応答抑制が生じまたは導かれ、前記抗体に基づく抗原結合ドメインはVHドメインとVLドメインとの組合せを含み、該組合せはMS-GPC-1、MS-GPC-2、MS-GPC-3、MS-GPC-4、MS-GPC-5、MS-GPC-6、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-14、MS-GPC-15、MS-GPC-16、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10及びMS-GPC-8-27-41から選択されるクローンの1つに見られるものである、前記組成物。

10

20

【請求項 3】

細胞の表面に発現された抗原がヒトMHCクラスII抗原である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

1 μ M以下の K_d でのヒトMHCクラスII抗原に対する結合特異性を有する抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチドを含有する組成物であって、前記ポリペプチドで前記抗原を発現する細胞を処理すると、免疫応答抑制が生じまたは導かれる、前記組成物。

【請求項 5】

1 μ M以下の K_d でのヒトMHCクラスII抗原に対する結合特異性を有する抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチドを含有する組成物であって、前記抗体に基づく抗原結合ドメインは、ヒトMHCクラスII抗原と結合する能力により組換え抗体ライブラリーからヒト組成のVL及びVHドメインを単離することを含む方法で単離されたものであり、前記ポリペプチドでMHCクラスIIを発現する細胞を処理すると、免疫応答抑制が生じまたは導かれる、前記組成物。

30

【請求項 6】

抗体に基づく抗原結合ドメインの単離方法が、さらに

a. VL及びVHドメインの一方または両方のCDR1、CDR2及びCDR3配列の少なくとも1つの変異体のライブラリーを作製し、及び、

b. 1 μ M以下の K_d でヒトMHCクラスII抗原と結合する能力により変異体ライブラリーからVL及びVHドメインを単離する、各ステップを含む、請求項5に記載の組成物。

40

【請求項 7】

抗体に基づく抗原結合ドメインがHLA-D Rに結合する、請求項3～6のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 8】

抗体に基づく抗原結合ドメインがHLA-D Rの鎖に結合する、請求項2～7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 9】

50

抗体に基づく抗原結合ドメインがHLA-DRの鎖の第1ドメインのエピトープに結合する、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

細胞がリンパ系細胞である、請求項1～9のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項11】

細胞が非リンパ系細胞で、かつMHCクラスII抗原を発現する、請求項1～9のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項12】

免疫応答抑制に対するIC50が1μM以下である、請求項1～11のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項13】

IL-2分泌阻害のIC50が1μM以下である、請求項1～11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

T細胞増殖阻害のIC50が1μM以下である、請求項1～11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項15】

抗体に基づく抗原結合ドメインが、DR1-0101、DR2-15021、DR3-0301、DR4Dw4-0401、DR4Dw10-0402、DR4Dw14-0404、DR6-1302、DR6-1401、DR8-8031、DR9-9012、DRw53-B4*0101及びDRw52-B3*0101からなる群から選択された1種以上のHLA-DRタイプに結合する、請求項1～14のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項16】

抗体に基づく抗原結合ドメインが、少なくとも3種の異なるHLA-DRタイプ、好ましくは少なくとも5種の異なるHLA-DRタイプ、より好ましくは少なくとも7種の異なるHLA-DRタイプに結合する、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

抗体に基づく抗原結合ドメインがVHドメイン及びVLドメインの組合せを含み、該組合せはMS-GPC-1、MS-GPC-2、MS-GPC-3、MS-GPC-4、MS-GPC-5、MS-GPC-6、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-14、MS-GPC-15、MS-GPC-16、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10及びMS-GPC-8-27-41から選択されるクローンの1つに見られるものである、請求項3～16のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項18】

抗体に基づく抗原結合ドメインがHuCAL VH2及びHuCAL V1の組合せを含み、VH CDR3、VL CDR1及びVL CDR3は、MS-GPC-1、MS-GPC-4、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10及びMS-GPC-8-27-41から選択されるクローンの1つに見られるものである、請求項3～16のいずれか1項に記載の組成物。

40

【請求項19】

50

抗体に基づく抗原結合ドメインが H u C A L V H 2 及び H u C A L V 1 の組合せを含み、V H C D R 3 配列がコンセンサス C D R 3 配列：

n n n n R G n F D n

(各 n は独立して任意のアミノ酸残基を表わす) から得られたものであり、及び/または V L C D R 3 配列がコンセンサス C D R 3 配列：

Q S Y D n n n n

(各 n は独立して任意のアミノ酸残基を表わす) から得られたものである、請求項 3 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 20】

V H C D R 3 配列が S P R Y G A F D Y であり、及び/または V L C D R 3 配列が Q S Y D L I R H または Q S Y D M N V H である、請求項 19 に記載の組成物。 10

【請求項 21】

抗体に基づく抗原結合ドメインが、H u C A L V H 2 及び H u C A L V 1 の組合せを含む抗体と抗原結合について競合し、V H C D R 3 配列がコンセンサス C D R 3 配列：

n n n n R G n F D n

(各 n は独立して任意のアミノ酸残基を表わす) から得られたものであり、及び/または V L C D R 3 配列がコンセンサス C D R 3 配列：

Q S Y D n n n n

(各 n は独立して任意のアミノ酸残基を表わす) から得られたものである、請求項 3 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。 20

【請求項 22】

V H C D R 3 配列が S P R Y G A F D Y であり、及び/または V L C D R 3 配列が Q S Y D L I R H または Q S Y D M N V H である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

抗体に基づく抗原結合ドメインが一般式：

S G S n n N I G n N Y V n

(各 n は独立して任意のアミノ酸残基を表わす) で表わされる V L C D R 1 配列を含む、請求項 3 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 24】

C D R 1 配列が S G S E S N I G N N Y V Q である、請求項 23 に記載の組成物。 30

【請求項 25】

免疫応答抑制が、細胞表面上に発現された抗原の発現のダウンレギュレーションによって引き起こされるかまたは前記ダウンレギュレーションにおいて現れる、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 26】

免疫応答抑制が、前記細胞とその他の細胞間の相互作用の阻害によって引き起こされるかまたは前記相互作用の阻害において現れ、通常であれば前記相互作用によって免疫応答が導かれうる、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 27】

免疫応答抑制が、細胞の死滅によって引き起こされるかまたは前記細胞の死滅において現れる、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の組成物。 40

【請求項 28】

死滅が複数の抗体に基づく抗原結合ドメインで抗原を発現する細胞を処理することによって媒介され、前記抗体に基づく抗原結合ドメインが少なくとも 1 つの多価ポリペプチドの一部であり、前記死滅を生じまたは導くのに細胞毒性物質も免疫学的メカニズムも必要としない、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

30% 未満、好ましくは 20% 未満、より好ましくは 10% 未満の非活性化細胞を死滅させるのに対して、少なくとも 50%、好ましくは少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 85% の活性化細胞を死滅させることに作用する、請求項 27 または 28 に記載の 50

組成物。

【請求項 30】

死滅が細胞の固有の予めプログラムされたプロセスによって媒介される、請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 31】

死滅がアポトーシスによるものではない、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

死滅が非カスパーゼプロテアーゼの作用に依存的である、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 33】

死滅が、z V A D - f m k または z D E V D - f m k によって阻害され得るカスパーゼに非依存的である、請求項 30 に記載の組成物。 10

【請求項 34】

組成物が、F v、s c F v、d s F v 及び F a b フラグメントから選択される抗体フラグメントを含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 35】

組成物が、F (a b ')₂ 抗体フラグメントまたはミニ抗体フラグメントを含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 36】

組成物が、クラス I g G 1、2 a、2 b、3、4、I g A 及び I g M の抗体から選択される少なくとも 1 つの完全な抗体を含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の組成物。 20

【請求項 37】

組成物がさらに 1 以上の架橋成分を含む、請求項 34 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 38】

抗原結合部位がポリマーに架橋されている、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

薬学的に許容される担体及び / または希釈剤中に製剤化された、請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 40】

ヒトなどの動物において免疫応答を抑制するのに十分な量で請求項 12 に記載の組成物を含む医薬製剤。 30

【請求項 41】

ヒトなどの動物において I L - 2 分泌を阻害するのに十分な量で請求項 13 に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 42】

ヒトなどの動物において T 細胞増殖を阻害するのに十分な量で請求項 14 に記載の組成物を含む医薬製剤。

【請求項 43】

請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む診断組成物。

【請求項 44】

ヒトなどの動物の治療用の医薬製剤を調製するための請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。 40

【請求項 45】

請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の組成物のポリペプチドに対するタンパク質コード配列を含む核酸。

【請求項 46】

請求項 45 に記載の核酸及びそれに機能的に連結された転写調節配列を含むベクター。

【請求項 47】

請求項 45 に記載の核酸または請求項 46 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 48】

核酸が発現される条件下で請求項 4 7 に記載の細胞を培養することを含む、免疫抑制組成物の産生方法。

【請求項 4 9】

免疫系細胞を請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物で処理することを含む、該細胞の活性化を抑制する方法。

【請求項 5 0】

免疫系細胞を請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物で処理することを含む、該細胞の増殖を抑制する方法。

【請求項 5 1】

免疫系細胞を請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物で処理することを含む、該細胞による I L - 2 分泌を抑制する方法。 10

【請求項 5 2】

免疫系細胞を請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させることを含む、該細胞と別の細胞との相互作用を抑制する方法。

【請求項 5 3】

患者に有効な量の請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与することを含む、患者を免疫抑制する方法。

【請求項 5 4】

表面上に抗原を発現する細胞を死滅させる方法であって、該細胞を、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の抗体に基づく抗原結合ドメインを複数含む組成物で処理するステップを含み、抗体に基づく抗原結合ドメインが少なくとも 1 つの多価ポリペプチドの一部であり、前記死滅を生じまたは導くのに細胞毒性物質も免疫学的メカニズムも必要としない、前記方法。 20

【請求項 5 5】

抗原が H L A - D R である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

治療が、慢性関節リウマチ、若年性関節炎、多発性硬化症、グレーブス病、インスリン依存性糖尿病、ナルコレプシー、乾癬、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、移植拒絶、移植片対宿主病、橋本病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、糸球体腎炎、甲状腺炎、膵臓炎、インスリン炎、原発性胆汁性肝硬変、過敏性大腸疾患及びシェーグレン症候群から選択される疾患の治療である、請求項 4 4 に記載の使用。 30

【請求項 5 7】

治療が、重症筋無力症、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、移植拒絶及び移植片対宿主病から選択される疾患の治療である、請求項 4 4 に記載の使用。

【請求項 5 8】

薬学的に許容される担体及び/または希釈剤中で製剤化された請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物により治療することができる患者を同定する方法であって、

- a . 患者から細胞を分離し、
 - b . 該細胞を請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物と接触させ、
 - c . 該細胞の死滅、免疫抑制、I L - 2 分泌または増殖の程度を測定する、 40
- 各ステップを含む、前記方法。

【請求項 5 9】

薬学的に許容される担体及び/または希釈剤中で製剤化された請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物により治療することができる患者を同定するためのキットであって、

- d . 請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物、及び
- e . 前記細胞の死滅、免疫抑制、I L - 2 分泌または増殖の程度を測定するための手段

を含む、前記キット。

【請求項 6 0】

- f . 請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物、及び g . 架橋成分、 50

を含むキット。

【請求項 6 1】

h . 請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物または請求項 4 3 に記載の診断組成物、

i . 検出可能な 1 以上の成分、及び

j . (i) と抗原との結合をもたらしかつ / または検出するための試薬及び / または溶液、

を含むキット。

【請求項 6 2】

細胞毒性物質と機能的に結合させた請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む細胞毒性組成物。 10

【請求項 6 3】

免疫原性物質と機能的に結合させた請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む免疫原性組成物。

【請求項 6 4】

細胞毒性物質または免疫原性物質と機能的に結合させた請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物を細胞に接触させることを含む、表面上に抗原を発現する細胞を死滅させる方法。

【請求項 6 5】

動物の治療用の医薬組成物を調製するための、細胞毒性物質または免疫原性物質と機能的に結合させた請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。 20

【請求項 6 6】

医薬ビジネスを行う方法であって、

(i) $1 \mu\text{M}$ 以下の K_d でヒト細胞の表面上に発現された M H C クラス I I と結合する、1 以上の抗体に基づく抗原結合ドメインを単離し、

(i i) 100 nM 以下の I C 5 0 を有する免疫抑制剤である、前記抗体に基づく抗原結合ドメインを含む組成物を生成し、

(i i i) 動物における効能及び毒性についての前記組成物の治療プロファイリングを行い、

(i v) 免疫抑制治療用の前記組成物の使用を説明したパッケージ同封用の説明書を作成し、及び 30

(v) 免疫抑制剤として使用する前記組成物を販売する、ことを含む、前記方法。

【請求項 6 7】

ライフサイエンスビジネスを行う方法であって、

(i) $1 \mu\text{M}$ 以下の K_d でヒト細胞の表面上に発現された M H C クラス I I と結合する、1 以上の抗体に基づく抗原結合ドメインを単離し、

(i i) 100 nM 以下の I C 5 0 を有する免疫抑制剤である、前記抗体に基づく抗原結合ドメインを含む組成物を生成し、

(i i i) 前記組成物を販売する権利を第三者にライセンスし、共同開発し、または売却する、 40

ことを含む、前記方法。

【請求項 6 8】

抗体に基づく抗原結合ドメインが、

a . H L A - D R と結合する能力により、組換え抗体ライブラリーからヒト組成の V L 及び V H ドメインを単離し、

b . V L 及び V H ドメインの一方または両方の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列の少なくとも 1 つの変異体のライブラリーを作製し、及び

c . $1 \mu\text{M}$ 以下の K_d で H L A - D R と結合する能力により、変異体のライブラリーから V L 及び V H ドメインを単離する、

ことを含む方法により単離される、請求項 66 または 67 に記載の方法。

【請求項 69】

抗体に基づく抗原結合ドメインが、MS - GPC - 1、MS - GPC - 2、MS - GPC - 3、MS - GPC - 4、MS - GPC - 5、MS - GPC - 6、MS - GPC - 7、MS - GPC - 8、MS - GPC - 10、MS - GPC - 11、MS - GPC - 14、MS - GPC - 15、MS - GPC - 16、MS - GPC - 8 - 1、MS - GPC - 8 - 6、MS - GPC - 8 - 9、MS - GPC - 8 - 10、MS - GPC - 8 - 17、MS - GPC - 8 - 18、MS - GPC - 8 - 27、MS - GPC - 8 - 6 - 2、MS - GPC - 8 - 6 - 19、MS - GPC - 8 - 6 - 27、MS - GPC - 8 - 6 - 45、MS - GPC - 8 - 6 - 13、MS - GPC - 8 - 6 - 47、MS - GPC - 8 - 10 - 57、MS - GPC - 8 - 27 - 7、MS - GPC - 8 - 27 - 10 及び MS - GPC - 8 - 27 - 41 から選択されるクローンに見られる VH 及び VL ドメインの組合せである、請求項 66 ~ 68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

免疫系が関与する疾患は、患者にはひどくこたえるものであって、今後 10 年間は罹患率が増大すると予測される。このような疾患には、慢性関節リウマチ (RA)、多発性硬化症 (MS)、I 型糖尿病、移植拒絶 (TR) 及び移植片対宿主病 (GvHD) が挙げられる。例えば、慢性関節リウマチの患者数は、2010 年までに世界中で 660 ~ 700 万人にのぼると思われる。1995 年に記録されたこれらの疾患の患者数、2010 年に予測される患者数及び対応する市場の大きさを下記に示す。

【0002】

疾患	患者数 (100 万人単位)		市場の大きさ (10 億\$単位)	
	1995	2010 (推定)	1994	2010 (推定)
慢性関節リウマチ	6.6	7	2.4	>3.7
多発性硬化症	0.62	0.65	0.3	>1.5
I 型糖尿病	1.8	1.9	1.5	>1.5
移植/GvHD	0.05	0.1	0.9	>1.5

【0003】

免疫系の疾患における現行の治療薬には、抗炎症薬、例えば NSAIDs (非ステロイド系抗炎症薬)、コルチコステロイド、細胞増殖抑制剤 (RA に対するメトトレキサート)、及びサイトカイン (MS に対するインターフェロン) が含まれる。これらの治療薬は対症療法薬であり、これらの治療薬のどれも疾患の完全な寛解傾向を誘導しない。また現在の薬剤のほとんど多くが抱える一般的な問題は、選択性の欠如である。これらの薬剤は免疫系全体を抑制し、従って治療を受けた患者は感染症に非常にかかりやすくなる。最後に、現在最も使用されている抗炎症剤は様々な副作用を伴うため、これらの疾患に対する新しい治療法の開発が望まれている。従って、RA および MS などの免疫系の疾患を治療するための、選択性のある、疾患メカニズムに基づく治療法に対する差し迫った満たされていない医学的必要性がある。

【0004】

TR 及び GvHD の根底にある免疫学的メカニズムは、その他の免疫系の疾患のものに類似している。TR においては、レシピエントの免疫系が外来臓器を攻撃し、一方で GvHD においては、免疫無防備状態のホストに導入された外来の造血細胞がホストを攻撃する。現在ではコルチコステロイド、アザチオプリン、シクロスポリン A 及びセルセプト (Cellcept) が拒絶反応防止に使用され、高用量のコルチコステロイド、OKT3 (全 T 細胞マーカーに対するモノクローナル抗体 (mAb)) 及び Zenapax (活性化 T 細胞上の IL-2R に対する mAb) が、その治療に使用される。GvHD においては

、コルチコステロイドが使用されるが、十分な治療は得ることができない。特にG v H Dの治療において、より一層許容される、より有効な免疫抑制剤に対する満たされていない医学的必要性がある。

【0005】

これまで研究されたあらゆる哺乳動物種は、いわゆる主要組織適合遺伝子複合体(MHC)をコードする遺伝子のクラスターを保有している。この強固にリンクされた遺伝子のクラスターは表面抗原をコードし、それらは体液及び細胞の両方を介する免疫応答の発生において中心的な役割を果たしている。ヒトにおいては、MHCによってコードされた産物はヒト白血球抗原(Human Leukocyte Antigen: HLA)と呼ばれる。MHC遺伝子は、クラスIからクラスIIIまでの3クラスの分子をコードする領域に配置されている。

10

【0006】

MHCクラスI分子は、45 kDの膜貫通糖タンパク質であり、これらは別の糖タンパク質である12 kDのβ-2ミクログロブリンと非共有結合している(Brownら, 1993)。後者は細胞膜に挿入されず、MHCの外側にコードされる。ヒトクラスI分子は異なる3種のアイソタイプがあり、HLA-A、-B及び-Cと命名されており、別々の遺伝子座にコードされている。クラスI分子の組織発現は遍在的で共優性である。MHCクラスI分子は細胞傷害性T細胞の活性化に必要なペプチド抗原を提示する。

【0007】

MHCクラスII分子は、2種の膜貫通糖タンパク質、35 kD α鎖と28 kD β鎖との非共有結合したヘテロダイマーである(Brownら, 1993)。ヒトにおいては、クラスII分子は、異なる3種のアイソタイプとして存在し、ヒト白血球抗原DR(HLA-DR)、HLA-DP及びHLA-DQと命名されている。DRにおける多形性は鎖に限定されているが、DP及びDQアイソタイプにおいては両方の鎖が多形性である。クラスII分子は共優性的に発現されるが、クラスIとは異なり、限定された組織分布を示し、それらは免疫系細胞、例えば樹状細胞、マクロファージ、Bリンパ細胞及び活性化Tリンパ細胞の表面にのみ存在する。それらはさらに正常な副腎の網状帯中のヒト副腎皮質細胞上及び正常な卵巣の黄体中の顆粒膜黄体細胞上にも発現される(Kahouryら, 1990)。その主要な生物学的役割は、CD4ヘルパー(T_H)リンパ細胞による認識のために、抗原性ペプチドと結合してそれらを抗原提示細胞(APC)の表面に存在させることである(Babbittら, 1985)。またMHCクラスII分子は、非免疫系細胞の表面上にも発現され得る。例えば、リンパ系細胞以外の臓器の細胞は病的な炎症応答の間中、MHCクラスII分子を発現することができる。これらの細胞には滑膜細胞、内皮細胞、甲状腺ストロマ細胞及び神経膠細胞が含まれうる。

20

30

【0008】

MHCクラスIII分子も免疫応答と関連するが、いくらか異なる産物をコードしている。そのようなものとしては、多数の可溶性血清タンパク質、酵素及びタンパク質、例えば腫瘍壊死因子やステロイド21-ヒドロキシラーゼ酵素が挙げられる。ヒトにおいては、クラスIII分子は3種の異なるアイソタイプとして存在し、Ca、C2及びBfと命名されている(Kuby, 1994、この参考文献の頁番号は不明である)。

40

【0009】

多くの疾患、特に免疫系の疾患に対する感受性は、主要組織適合遺伝子複合体の特定の対立遺伝子に強く関連するという大きな一連の証拠が示されている(Tiwariら, 1985において概説されている)。幾つかのクラスI関連疾患が存在するが、自己免疫症状の多くが、クラスII対立遺伝子と関連することがわかっている。例えば、クラスII対立遺伝子DRB1*0101、0401、0404及び0405は慢性関節リウマチ(RA)患者に高頻度で存在し(McMichaelら, 1977; Stasny, 1978; Ohtaら, 1982; Schiffrら, 1982)、一方DRB1*1501は多発性硬化症(MS)と関連しており、さらにDQ対立遺伝子の組合せDQA1*0301/B1*0302は、インスリン依存性糖尿病(insulin dependent

50

t diabetes mellitus : I D D M) に関連している。R A において、全体で 9 4 % を上回るリウマチ因子陽性患者が感受性対立遺伝子のうち 1 つを保有している (N e p o m ら , 1 9 8 9) 。

【 0 0 1 0 】

M H C クラス I I 分子は、以下の理由から免疫抑制介入処置に対する主要な標的である。第 1 に、M H C - I I 分子は免疫調節の中心にある T ヘルパー (T h) 細胞を活性化し、多くの炎症性疾患の免疫病理に関与している。第 2 に、免疫系の疾患の多くは、クラス I I 対立遺伝子に遺伝学的に関連している。第 3 に、M H C - I I 分子は免疫系細胞上だけに発現されており、一方 M H C - I 分子は多くの体細胞に存在している。

【 0 0 1 1 】

少なくとも 3 つのメカニズムが、M H C クラス I I 分子に結合するタンパク質によって媒介される免疫抑制において、何らかの役割を果たすと考えられている。第 1 に、T h 細胞はクラス I I 分子に結合した抗原性ペプチドを認識するので、クラス I I 分子に特異的なモノクローナル抗体 (m A b) は M H C クラス I I 分子と T 細胞受容体との相互作用を立体的に妨害し、それによって T h 細胞活性化を妨げる。実際に、このことは *i n v i t r o* 及び *i n v i v o* の両方で起きることが示されている (B a x e v a n i s ら , 1 9 8 0 ; N e p o m ら , 1 9 8 1 ; R o s e n b a u m ら , 1 9 8 3) 。第 2 に、M H C クラス I I 分子の細胞表面発現のダウンレギュレーションが、免疫抑制と関連することが特定のマウス抗 M H C クラス I I 抗体を用いて示されている (V i d o v i c ら , 1 9 9 5) 。第 3 に、特定の抗 M H C クラス I I 抗体が活性化リンパ系細胞の表面上に発現された抗原に結合すると、該細胞の死滅が起こる (V i d o v i c ら , 1 9 9 5 a) 。特定の M H C クラス I I 抗原を発現する細胞のみを特定のモノクローナル抗体によって標的とすることができ、それゆえにこれらのアロタイプによって媒介される免疫応答のみをモジュレートすることができるので、治療の選択性が高まる。他の M H C 分子によって媒介される宿主防御免疫反応は、この特定の抗体によっては標的とされず、従ってモジュレートされることもないし、免疫無防備状態になることもない。

【 0 0 1 2 】

これらの観察に基づいて、抗クラス I I m A b は長年、移植拒絶を含めた免疫系の疾患の免疫抑制治療に対する治療薬の候補として考えられてきた。実際、この仮説は、一連の動物疾患モデルにおけるマウス由来抗クラス I I m A b の有益な効果によって支持されている (W a l d o r ら , 1 9 8 3 ; J o n k e r ら , 1 9 8 8 ; S t e v e n s ら , 1 9 9 0 ; S m i t h ら , 1 9 9 4) 。

【 0 0 1 3 】

これらの初期の支持データにもかかわらず、これまで親和性、増殖阻害またはサイトカイン分泌の低減を含み得る所望の免疫調節特性およびその他の生物学的特性を示すヒト組成の抗 M H C クラス I I m A b は記載されていない。実際、マウス由来 m A b は比較的容易に得ることができるにもかかわらず、マウス由来 m A b を使用した研究からは、所望の生物学的特性を有する免疫調節抗体を得ることの困難性が示されている。例えば、異なるマウス抗クラス I I m A b の T 細胞阻害能力において、顕著ではあるが完全には解明されていない差異が観察された (N a q u e t ら , 1 9 8 3) 。さらに、特定のマウス由来 m A b を *i n v i v o* で適用すると、予想外の副作用が起こり、ときには実験用霊長類が死亡した (B i l l i n g ら , 1 9 8 3 ; J o n k e r ら , 1 9 9 1) 。

【 0 0 1 4 】

マウス由来 m A b (キメラ及びいわゆる「ヒト化」 m A b を含む) は、ヒト m A b による治療 (例えば V o s e ら , 2 0 0 0 ; K a s h m i r i ら , 2 0 0 1) と比較して、患者において有害な免疫応答 (ヒト抗マウス抗体、H A M A) を起こす危険性が高いことは一般に認められている。この危険性は、慢性関節リウマチや多発性硬化症のような慢性疾患をマウス由来 m A b で治療する場合において潜在的に増大する。すなわち、ヒト免疫系を非ヒト分子に長期間暴露すると、有害な免疫反応が発生することが多い。さらに、所望の抗原に対する所望の特異性または親和性を有するマウス由来抗体を得ることは非常に

10

20

30

40

50

困難であることが判っている (P i c h l a ら , 1 9 9 7) 。このような観察は、マウス由来 m A b によって提供される全体的な治療効果または利点にかなり影響し、または低減する可能性がある。マウス由来 m A b の不利益の例としては以下のものが挙げられる。第 1 に、マウス由来 m A b はそれらが適切である症状の治療の医学的条件または期間において限定され得る。第 2 に、マウス由来 m A b の投与量は、比較的低い親和性または治療効果を補うために比較的高くする必要がある場合があり (親和性または治療効果が低いことは、マウス起源であることに関係しない。しかしながらマウス m A b は血液からより迅速に取り除かれると考えられるので、人体における半減期が早い場合がある。またこのことにより投与量をより高くする必要がある) 、そのため投与量がより苛酷になるばかりでなく、潜在的に免疫原性がより高くなり、おそらくは危険性も高まる。第 3 に、好適な治療計画におけるそのような制限ならびに高生産量を必要とする高い投与量は、治療コストを顕著に高くし、また、そのようなマウス由来 m A b を商業的治療薬として開発することが不経済であることを意味し得る。最後に、たとえマウス m A b が所望の特異性または親和性を示すことが判ったとしても、これらの所望の特徴は免疫原性の可能性を低減するために必要な「ヒト化」または「キメラ化」手法の間に不利益に影響が及ぼされることが多い (S l a v i n - C h i o r i n i ら , 1 9 9 7) 。ひとたびマウス由来 m A b が「ヒト化」またはキメラ化されてしまうと、その特異性または親和性を最適化することは非常に困難である。

10

【 0 0 1 5 】

当技術分野では、ヒト治療用の医薬組成物に使用するのに適した免疫調節特性及びその他の生物学的特性を示すヒト組成の抗 M H C クラス I I m A b が長年求められてきた。当分野の研究者らは、最初にマウス由来 m A b を同定し、次にこの非ヒト分子のヒト患者に対する免疫寛容を改善する目的で前記 m A b の構造を改変する工程ステップを実施してきた (さらなる詳細については J o n e s ら , 1 9 8 6 ; R i e c h m a n n ら , 1 9 8 8 ; P r e s t a , 1 9 9 2 を参照されたい) 。この改変は通常いわゆる「ヒト化」法を使用するか、またはヒト - マウスキメラ m A b を製造することによって行われる。別の研究者らは、ヒト抗体多様性の天然のレパートリーの中から所望の特性を有するヒト抗原と結合するヒト抗体を同定しようと試みてきた。例えば、妊娠女性における胎児寛容メカニズムを調査することにより (B o n a g u r a ら , 1 9 8 7) 、または天然の多様な抗体のライブラリーをパンニングすることにより (S t a u s b o l - G r o n ら , 1 9 9 6 ; W i n t e r ら , 1 9 9 4) 行なわれてきた。しかしながら、これまで、免疫調節、特異性、低免疫原性及び親和性の所望の生物学的特性を示すヒト組成の抗 M H C クラス I I m A b が記載されたことはない。

20

30

【 0 0 1 6 】

発明の概要

本発明の 1 つの態様は、細胞の表面上に発現された抗原に対する結合特異性を有するヒト組成の抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも 1 つ含むポリペプチドを含有する組成物を提供する。好ましい実施形態において、1 以上の前記ポリペプチドで前記抗原を発現する細胞 (リンパ系細胞または非リンパ系細胞) を処理すると、免疫応答抑制が生じまたは導かれ、例えば、抑制活性に対する I C 5 0 は、1 μ M 以下であり、さらにより好ましくは 1 0 0 n M 、 1 0 n M 、または 1 n M 以下でさえある。

40

【 0 0 1 7 】

特定の好ましい実施形態において、抗体に基づく抗原結合ドメインは F v 、 s c F v 、 d s F v 及び F a b フラグメントから選択される一価の抗体フラグメントを含む。他の好ましい実施形態において、ポリペプチドは F (a b) ' ₂ 抗体フラグメントまたはミニ抗体フラグメントを含む。さらなる好ましい実施形態において、ポリペプチドは I g G 1 、 I g G 2 a 、 I g G 2 b 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g A 及び I g M から選択される少なくとも 1 つの完全な抗体を含む多価組成物である。

【 0 0 1 8 】

好ましい実施形態に従えば、ポリペプチドは、M H C クラス I I 分子を発現するリンパ系

50

細胞または非リンパ系細胞に向けられる。後者の細胞型は、例えば炎症及び/または免疫系の疾患の病的部位に存在する。前記細胞には、滑膜細胞、内皮細胞、甲状腺ストロマ細胞及び神経膠細胞が含まれうる。

【0019】

特定の実施形態において、ポリペプチドはHLA-DR分子の鎖にある少なくとも1つのエピトープに結合する。さらなる好ましい実施形態に従えば、ポリペプチドはHLA-DRの鎖の第1ドメインの少なくとも1つのエピトープに結合する。例えば、ポリペプチドはHLA-DRの鎖のGlu⁵⁵~Tyr⁷⁹に及び、ヘリックス内の少なくとも1つのエピトープに結合する。

【0020】

特定の好ましい実施形態において、ポリペプチドはHLA-DR分子の鎖にある少なくとも1つのエピトープに結合し、好ましくはHLA-DRの鎖の第1ドメインの少なくとも1つのエピトープに結合する。

【0021】

特定の好ましい実施形態において、本ポリペプチドは、1 μM以下、さらにより好ましくは100 nM、10 nMまたは1 nM以下でさえあるK_dで、ヒトMHCクラスII抗原に特異的に結合する抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ含む。さらに説明すると、抗体に基づく抗原結合ドメインはヒトHLA-DR抗原に特異的に結合する。例えば、抗体に基づく抗原結合ドメインはVHドメイン及びVLドメインの組合せを含むことができ、該組合せはMS-GPC-1、MS-GPC-2、MS-GPC-3、MS-GPC-4、MS-GPC-5、MS-GPC-6、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-14、MS-GPC-15、MS-GPC-16、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10及びMS-GPC-8-27-41から選択されるクローンの1つに見られるものである。

【0022】

特定の実施形態において、本発明は、1 μM以下、より好ましくは100 nM、10 nMまたは1 nM以下でさえあるK_dでHLA-DRのようなヒトMHCクラスII抗原に対する結合特異性を有する抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ有するポリペプチドを含有する組成物を提供する。抗体に基づく抗原結合ドメインは、ヒトMHCクラスII抗原と結合する能力によって組換え抗体ライブラリーからヒト組成のVL及びVHドメインを単離することを含む方法により単離することができる。また該方法は、さらに

a. VL及びVHドメインの一方または両方のCDR1、CDR2及びCDR3配列の少なくとも1つの変異体のライブラリーを作製し、

b. 1 μM以下のK_dでヒトMHCクラスII抗原と結合する能力により変異体ライブラリーからVL及びVHドメインを単離し、及び

c. さらなるCDR1、CDR2及びCDR3配列を用いてステップ(a)及び(b)を(任意に)繰り返す、
各ステップを含み得る。

【0023】

特定の好ましい実施形態において、本ポリペプチドの抗体に基づく抗原結合ドメインは、HLA-DRの鎖に結合し、さらにより好ましくはHLA-DRの鎖の第1ドメインのエピトープに結合する。

【0024】

本発明の1つの態様は、活性化細胞の細胞死を導くことができる本発明の少なくとも1つ

10

20

30

40

50

のポリペプチドの多価組成物であって、どのような付加的な手段も必要とせず、治療した患者に対する免疫原性副作用が限られている、前記組成物を提供する。さらに、本発明のポリペプチドを含む多価組成物は、標的抗原上の少なくとも1つのエピトープと結合する能力を有するが、幾つかのエピトープ結合部位を1つの分子に組合せてもよい。好ましい実施形態において、ポリペプチドはFv、scFv、dsFv及びFabフラグメントから選択される少なくとも2つの一価抗体フラグメントを含む多価組成物であり、さらに1以上の架橋成分を含む。

【0025】

さらなる好ましい実施形態において、ポリペプチドは、15%未満、好ましくは10%未満の非活性化細胞を死滅させるのに対して、少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%の活性化細胞を死滅させるように作用する。 10

【0026】

本発明の組成物を用いて、種々の細胞、例えばリンパ系細胞および非リンパ系細胞（好ましくは、後者の細胞の場合には、MHCクラスII抗原を発現する細胞）を処理することができる。

【0027】

特定の好ましい実施形態において、本組成物は、IL-2分泌阻害に対するIC50が1μM以下であり、さらにより好ましくは100nM、10nMまたは1nM以下でさえある。

【0028】

特定の好ましい実施形態において、本組成物は、T細胞増殖阻害に対するIC50が1μM以下であり、さらにより好ましくは100nM、10nMまたは1nM以下でさえある。 20

【0029】

本発明の組成物は、抗体に基づく抗原結合ドメインがDR1-0101、DR2-15021、DR3-0301、DR4Dw4-0401、DR4Dw10-0402、DR4Dw14-0404、DR6-1302、DR6-1401、DR8-8031、DR9-9012、DRw53-B4*0101及びDRw52-B3*0101からなる群から選択された1種以上のHLA-DRタイプに結合するポリペプチドを含有する。好ましい実施形態においては、本組成物の抗原結合ドメインは広範なDR反応性を提供し、すなわち所与の組成物の抗原結合ドメインは、前記HLA-DRタイプの少なくとも3種、より好ましくは少なくとも5種、または7種さえの異なるタイプにあるエピトープに結合する。特定の実施形態においては、本組成物のポリペプチドの抗原結合ドメインは、ヒト集団の少なくとも60%、より好ましくは少なくとも75%、さらにより好ましくは85%に関して、HLA-DR発現細胞と結合するように、複数のHLA-DRタイプと結合する。 30

【0030】

特定の実施形態においては、抗体に基づく抗原結合ドメインはVHドメイン及びVLドメインの組合せを含み、該組合せはMS-GPC-1、MS-GPC-2、MS-GPC-3、MS-GPC-4、MS-GPC-5、MS-GPC-6、MS-GPC-7、MS-GPC-8、MS-GPC-10、MS-GPC-11、MS-GPC-14、MS-GPC-15、MS-GPC-16、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10及びMS-GPC-8-27-41から選択されるクローンの1つに見られるものである。 40

【0031】

他の実施形態においては、抗体に基づく抗原結合ドメインはHuCAL VH2及びHu 50

C A L V 1の組合せを含み、ここでV H C D R 3、V L C D R 1及びV L C D R 3は、M S - G P C - 1、M S - G P C - 4、M S - G P C - 7、M S - G P C - 8、M S - G P C - 10、M S - G P C - 11、M S - G P C - 8 - 1、M S - G P C - 8 - 6、M S - G P C - 8 - 9、M S - G P C - 8 - 10、M S - G P C - 8 - 17、M S - G P C - 8 - 18、M S - G P C - 8 - 27、M S - G P C - 8 - 6 - 2、M S - G P C - 8 - 6 - 19、M S - G P C - 8 - 6 - 27、M S - G P C - 8 - 6 - 45、M S - G P C - 8 - 6 - 13、M S - G P C - 8 - 6 - 47、M S - G P C - 8 - 10 - 57、M S - G P C - 8 - 27 - 7、M S - G P C - 8 - 27 - 10及びM S - G P C - 8 - 27 - 41から選択されるクローンの1つに見られるものである。

【0032】

特定の好ましい実施形態においては、抗体に基づく抗原結合ドメインはH u C A L V H 2及びH u C A L V 1の組合せを含み、ここでV H C D R 3配列はコンセンサスC D R 3配列：

n n n n R G n F D n

(各nは独立して任意のアミノ酸残基を表わす)から得られたものであり、及び/またはV L C D R 3配列はコンセンサスC D R 3配列：

Q S Y D n n n n

(各nは独立して任意のアミノ酸残基を表わす)から得られたものである。好ましくはV H C D R 3配列はS P R Y G A F D Yであり、及び/またはV L C D R 3配列はQ S Y D L I R HまたはQ S Y D M N V Hである。

【0033】

特定の実施形態においては、抗体に基づく抗原結合ドメインは、H u C A L V H 2及びH u C A L V 1の組合せを含む抗体と抗原結合について競合する。好ましくは競合抗体のV H C D R 3配列はコンセンサスC D R 3配列：

n n n n R G n F D n

(各nは独立して任意のアミノ酸残基を表わす)から得られたものであり、及び/またはV L C D R 3配列はコンセンサスC D R 3配列：

Q S Y D n n n n

(各nは独立して任意のアミノ酸残基を表わす)から得られたものである。好ましい実施形態において、V H C D R 3配列はS P R Y G A F D Yであり、及び/またはV L C D R 3配列はQ S Y D L I R HまたはQ S Y D M N V Hである。

【0034】

本ポリペプチドの抗体に基づく抗原結合ドメインは一般式：

S G S n n N I G n N Y V n

(各nは独立して任意のアミノ酸残基を表わす)で表わされるV L C D R 1配列を含むことができる。好ましい実施形態において、C D R 1配列はS G S E S N I G N N Y V Qである。

【0035】

本発明の組成物の特定の実施形態において、免疫応答抑制は、細胞表面に発現された抗原の発現のダウンレギュレーションによって引き起こされるかまたは該ダウンレギュレーションにおいて現れる。また、あるいはさらに免疫応答抑制は前記細胞とその他の細胞間の相互作用の阻害によって引き起こされるかまたは該相互作用の阻害において現れる場合があり、通常であれば前記相互作用によって免疫応答または細胞の死滅が導かれうる。後者の例において、死滅は抗原を発現する細胞を複数の抗体に基づく抗原結合ドメインで処理することによって媒介することができ、各々の抗体に基づく抗原結合ドメインは少なくとも1つの多価ポリペプチドの一部である。このような例では、死滅を生じまたは導くのに細胞毒性物質も免疫学的メカニズムも必要としない。

【0036】

本ポリペプチド組成物の好ましい実施形態においては、30%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満の非活性化細胞を死滅させるのに対して、少なくとも50

10

20

30

40

50

%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%の活性化細胞を死滅させるように作用する。

【0037】

また本発明の組成物は、細胞の固有の予めプログラムされたプロセスによって媒介される細胞の死滅を誘導することを特徴とすることができる。細胞の死滅が本ポリペプチドの活性によるものである場合、死滅は好ましくはアポトーシスによるものではなく、非カスパーゼプロテアーゼの作用に依存的である。例えば、死滅はzVAD-fmkまたはzDEV D-fmkによって阻害され得るカスパーゼに非依存的である。

【0038】

特定の好ましい実施形態において、本発明の組成物はFv、scFv、dsFv、Fab フラグメント、F(ab')₂ 及びミニ抗体フラグメントから選択される抗体フラグメントを含む。また本組成物は、例えばクラスIgG1、2a、2b、3、4、IgA及びIgMの抗体から選択される少なくとも1つの完全な抗体を含むことができる。

【0039】

特定の例において、本組成物は1以上の架橋成分を含むことが望ましいこともあり、こうして抗原結合部位がポリマーに架橋される。

【0040】

好ましい実施形態において、本組成物を薬学的に許容される担体及び/または希釈剤中に製剤化することができる。例えば具体的には、本発明はヒトなどの動物において免疫応答を抑制するのに十分な量で本抗原結合組成物を含む医薬製剤を意図する。

【0041】

本発明は、ヒトなどの動物においてIL-2分泌を阻害するのに十分な量で本抗原結合組成物を含む医薬製剤を提供する。

【0042】

本発明は、ヒトなどの動物においてT細胞増殖を阻害するのに十分な量で本抗原結合組成物を含む医薬製剤を提供する。

【0043】

また本方法は、抗原結合組成物を含む診断組成物を提供する。

【0044】

また別の実施形態において、本方法はヒトなどの動物の治療用の医薬製剤を調製するために本発明の抗原結合組成物を利用する。

【0045】

また本発明は、細胞表面上に発現された抗原に対して結合特異性を有するヒト組成の抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチドに対するタンパク質コード配列を含む核酸を提供する。好ましい実施形態において、核酸によってコードされるポリペプチドで抗原を発現する細胞を処理すると、免疫応答抑制が生じまたは導かれる。ここで抑制活性に対するIC50は1µM以下、さらにより好ましくは100nM、10nM、または1nM以下でさえある。タンパク質コード配列及びそれに機能的に連結された転写調節配列を含むベクターは、該核酸もしくは該ベクターを含む細胞と同様に特に意図される。

【0046】

このような組換え宿主細胞を用いることで、核酸が発現される条件下で該細胞を培養することによって、免疫抑制組成物を産生することができる。

【0047】

本発明の別の態様は、細胞表面上に発現された抗原に対して結合特異性を有するヒト組成の抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチドの組成物で免疫系細胞を処理することによって、該細胞の活性化及び/または増殖を抑制する方法を提供することである。好ましい実施形態において、核酸によってコードされるポリペプチドで抗原を発現する細胞を処理すると、免疫応答抑制が生じまたは導かれる。ここで例えば抑制活性に対するIC50は、1µM以下、さらにより好ましくは100nM、10nM、ま

10

20

30

40

50

たは1 n M以下でさえある。同様の方法を用いて、免疫系細胞が関与するI L - 2発現及び/または細胞 - 細胞相互作用を阻害することができる。特定の好ましい実施形態において、本方法を用いて、例えば患者に有効な量の抗原結合組成物を投与することによって患者を免疫抑制することができる。

【0048】

また別の本発明の態様は、表面上に抗原を発現する細胞を死滅させる方法であって、該細胞を、例えば上記のような複数の抗体に基づく抗原結合ドメインで処理するステップを含み、抗体に基づく抗原結合ドメインは少なくとも1つの多価ポリペプチドの一部であり、前記死滅を生じまたは導くのに細胞毒性物質も免疫学的メカニズムも必要としない、前記方法を提供することである。好ましくは抗体に基づく抗原結合ドメインはH L A - D Rに結合する。

10

【0049】

このような方法を用いて、慢性関節リウマチ、若年性関節炎、多発性硬化症、グレーブス病、インスリン依存性糖尿病、ナルコレプシー、乾癬、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、移植拒絶、移植片対宿主病、橋本病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、糸球体腎炎、甲状腺炎、膵臓炎、インスリン炎、原発性胆汁性肝硬変、過敏性大腸疾患及びシェーグレン症候群から選択される疾患を治療することができる。

【0050】

また別の実施形態において、本発明の抗原結合組成物により治療することができる患者を同定する方法であって、

20

- a . 患者から細胞を分離し、
 - b . 該細胞を抗原結合ポリペプチドの組成物と接触させ、及び
 - c . 該細胞の死滅、免疫抑制、I L - 2分泌または増殖の程度を測定する、
- 各ステップを含む、前記方法が提供される。

【0051】

このような方法は、例えば

- a . 本発明の抗原結合組成物、及び
 - b . 架橋成分及び/または検出可能な1以上の成分(抗原との結合をもたらしかつ/または検出するための試薬及び/または溶液を任意に含む)、
- を含むキットを用いて行うことができる。

30

【0052】

また他の実施形態において、本方法は細胞毒性物質と機能的に結合させた本抗原結合組成物を含む細胞毒性組成物を提供する。

【0053】

別の実施形態は、免疫原性物質と機能的に結合させた本抗原結合組成物を含む免疫原性組成物を提供する。

【0054】

また別の本発明の態様は、細胞毒性物質または免疫原性物質と機能的に結合させた本発明の抗原結合組成物を細胞に接触させることを含む、表面上に抗原を発現する細胞を死滅させる方法を提供することである。これに関しては、また本発明は、動物の治療用の医薬組成物を調製するために細胞毒性物質または免疫原性物質と機能的に結合させた本抗原結合組成物を使用することを特に意図する。

40

【0055】

また別の本発明の態様は、医薬ビジネスを行う方法であって、

- (i) 1 μ M以下の K_d でヒト細胞の表面上に発現されたM H CクラスI Iと結合する、1以上の抗体に基づく抗原結合ドメインを単離し、
- (i i) 1 0 0 n M以下のI C 5 0を有する免疫抑制剤である、前記抗体に基づく抗原結合ドメインを含む組成物を生成し、
- (i i i) 動物における効能及び毒性についての前記組成物の治療プロファイリングを行い、

50

(iv) 免疫抑制治療用の前記組成物の使用を説明したパッケージ同封用の説明書を作成し、及び

(v) 免疫抑制剤として使用する前記組成物を販売する、ことを含む、前記方法を提供することである。

【0056】

ライフサイエンスビジネスを行う方法についての別の実施形態には、

(i) $1 \mu\text{M}$ 以下の K_d でヒト細胞の表面上に発現されたMHCクラスIIと結合する、1以上の抗体に基づく抗原結合ドメインを単離し、

(ii) 100 nM 以下のIC50を有する免疫抑制剤である、前記抗体に基づく抗原結合ドメインを含む組成物を生成し、

(iii) 前記組成物を販売する権利を第三者にライセンスし、共同開発し、または売却する、

ことが含まれる。

【0057】

本ビジネス方法に従えば、抗体に基づく抗原結合ドメインは、

a. HLA-D Rと結合する能力により、組換え抗体ライブラリーからヒト組成のV L及びV Hドメインを単離し、

b. V L及びV Hドメインの一方または両方のCDR 1、CDR 2及びCDR 3配列の少なくとも1つの変異体のライブラリーを作製し、及び

c. $1 \mu\text{M}$ 以下の K_d でHLA-D Rと結合する能力により、変異体のライブラリーからV L及びV Hドメインを単離する、

ことを含む方法により単離することができる。

【0058】

本ビジネス方法に従えば、抗原結合ドメインは、MS - GPC - 1、MS - GPC - 2、MS - GPC - 3、MS - GPC - 4、MS - GPC - 5、MS - GPC - 6、MS - GPC - 7、MS - GPC - 8、MS - GPC - 10、MS - GPC - 11、MS - GPC - 14、MS - GPC - 15、MS - GPC - 16、MS - GPC - 8 - 1、MS - GPC - 8 - 6、MS - GPC - 8 - 9、MS - GPC - 8 - 10、MS - GPC - 8 - 17、MS - GPC - 8 - 18、MS - GPC - 8 - 27、MS - GPC - 8 - 6 - 2、MS - GPC - 8 - 6 - 19、MS - GPC - 8 - 6 - 27、MS - GPC - 8 - 6 - 45、MS - GPC - 8 - 6 - 13、MS - GPC - 8 - 6 - 47、MS - GPC - 8 - 10 - 57、MS - GPC - 8 - 27 - 7、MS - GPC - 8 - 27 - 10及びMS - GPC - 8 - 27 - 41から選択されるクローンに見られるV Hドメイン及びV Lドメインの組合せであり得る。

【0059】

本明細書で使用する用語「ペプチド」は、ペプチド結合により結合した複数の、すなわち2個以上のアミノ酸の1以上の鎖からなる分子を意味する。

【0060】

用語「タンパク質」は、ペプチドの少なくとも一部が、1以上のペプチド鎖内及び/またはそれらの間で二次、三次あるいは四次構造を形成することにより所定の三次元構造を有するか獲得し得るペプチドを意味する。この定義は、天然または少なくとも部分的に人工的なタンパク質、ならびに完全なタンパク質の断片もしくはドメインを包含するが、ただし、そのような断片もしくはドメインは上記のような所定の三次元構造を獲得することができなければならない。

【0061】

用語「ポリペプチド」は、ペプチド及び/またはタンパク質を示すのに相互に交換可能に使用される。さらに、用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、前後関係から認められる場合、別々の重鎖及び軽鎖を有する免疫グロブリンポリペプチドのような複数鎖タンパク質複合体を含む。

【0062】

10

20

30

40

50

この文脈においては、「抗体に基づく抗原結合ドメインを少なくとも1つ含むポリペプチド」は、免疫グロブリン（例えばIgG、IgAもしくはIgM分子または抗体）またはその機能的なフラグメントを意味する。時折用いられ得る用語「機能的なフラグメント」または「抗体フラグメント」は、免疫グロブリンの抗原結合部分を保持する免疫グロブリンのフラグメントを意味する。本発明の機能的な免疫グロブリンフラグメントは、Fv (Skerra及びPluckthun, 1988)、scFv (Birdら, 1988; Hustonら, 1988)、ジスルフィド結合したFv (Glockshuberら, 1992; Brinkmannら, 1993)、Fab、F(ab')₂フラグメント、または免疫グロブリンもしくは機能的な免疫グロブリンフラグメントの可変ドメインを含む、当業者に周知なその他のフラグメントであり得る。

10

【0063】

1本の鎖からなるポリペプチドの例は一本鎖Fv抗体フラグメントであり、1本以上の鎖からなるポリペプチドの例はFab抗体フラグメントである。

【0064】

本明細書で使用する用語「抗体」は、特記しない限り、抗体分子及び種々の抗体由来分子の両方を指すために広く使用する。そのような抗体由来分子は、少なくとも1つの可変領域（重鎖または軽鎖可変領域）を含むものであり、例えば上記のようなフラグメント、並びに個々の抗体軽鎖、個々の抗体重鎖、抗体鎖とその他の分子間とのキメラ融合物などが挙げられる。

【0065】

本明細書においては、「価」とは、本発明のポリペプチドが有する抗原結合部位の数をいう。従って、二価のポリペプチドは、2つの結合部位を有するポリペプチドをいう。用語「多価ポリペプチド」は、ポリペプチドの二価、三価、四価などの形態を包含する。

20

【0066】

免疫グロブリン分子の「抗原結合部位」は、その分子の、抗原と特異的に結合するのに必要な部分をいう。抗原結合部位は、好ましくは1 μ M以下のKd、より好ましくは100nM、10nM、あるいはさらに場合によっては1nM未満のKdで抗原と結合する。抗原と特異的に結合するとは、その抗原に対して、他の抗原に対する結合よりも有意に高い親和性で抗原と結合することを包含するものとする。

【0067】

抗原結合部位は、重（「H」）鎖及び軽（「L」）鎖のN-末端可変（「V」）領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖及び軽鎖のV領域内にある高度に多様な部分は、「フレームワーク領域」すなわち「FR」として知られる保存された隣接部分に挟まれる「超可変領域」を指す。すなわち、用語「FR」は、天然において免疫グロブリン内の超可変領域の間で及びその領域に隣接して見出されるアミノ酸配列を指すものである。抗体分子においては、軽鎖の3つの超可変領域及び重鎖の3つの超可変領域が三次元空間にそれぞれ相対的に配置されて抗原結合表面を形成している。抗原結合表面は、結合する抗原の三次元表面に対し相補的であり、前記軽鎖及び重鎖の3つの超可変領域は「相補性決定領域（CDR）」と呼ばれる。

30

【0068】

従って、「抗体に基づく抗原結合ドメイン」は、抗体の構造的特徴の少なくともいくらか、例えば少なくとも1つのCDR配列を保持する抗原結合部位を形成する1またはそれ以上のポリペプチドをいう。ある好ましい実施形態においては、抗体に基づく抗原結合ドメインは、例えば3つのCDR領域及び散在するフレームワーク領域のような、可変ドメインと考えるに十分な構造を含む。抗体に基づく抗原結合ドメインは、VHまたはVLの配列に対応する単一のポリペプチド鎖により、あるいはVH及びVL配列の分子間または分子内結合によって形成され得る。

40

【0069】

用語「組換え抗体ライブラリー」は、例えば生物学的粒子のようなディスプレイパッケージであって、それぞれが（a）粒子表面上に少なくとも1の抗原結合ドメインを発現する

50

ための遺伝子情報、及び(b)複製する能力を粒子に与えるための遺伝子情報を有する、ディスプレイパッケージの集合体を指す。例えば、そのパッケージは、抗原結合ドメインを含む融合タンパク質をディスプレイしうる。融合タンパク質の抗原結合ドメイン部分は、抗原結合ドメインがディスプレイパッケージと接触する標的エピトープに結合可能とするような形でディスプレイパッケージによって提示される。ディスプレイパッケージは、一般的には、非常に変化に富む抗体ライブラリーをサンプリングすることが可能な系に由来する。ディスプレイパッケージは、例えば、増殖性のある細菌細胞、細菌孢子及び細菌ウイルスに由来するものとしてすることができる。

【0070】

本発明の典型的な実施形態においては、ディスプレイパッケージは被験抗原結合ドメインのアミノ酸配列を含むペプチド融合外殻タンパク質を含むファージ粒子である。すなわち、ペプチド融合外殻タンパク質のライブラリーをコードする複製可能なファージベクター、特にファージミド(本明細書で定義するもの)のライブラリーを作製し、適当な宿主細胞を形質転換するために使用する。キメラタンパク質から形成されたファージ粒子は、特定のファージ粒子に結合した抗原結合部位の、標的エピトープに特異的に結合する能力に基づいた親和性選択により分離することができる。好ましい実施形態においては、ライブラリーの個々のファージ粒子は、そのパッケージの表面にディスプレイされたペプチド融合外殻タンパク質をコードする、対応するファージミドのコピーを含む。本発明の変化に富むペプチドライブラリーを作製するためのファージの例としては、M13、f1、fd、If1、Ike、Xf、Pf1、Pf3、T4、T7、P2、P4、X-174、MS2及びf2が挙げられる。

【0071】

用語「CDR1、CDR2及びCDR3の少なくとも1つの変異体のライブラリーを作製する」とは、ライブラリーのメンバーが、例えばFR配列ではなく、CDR配列における1以上の変化により異なる、変異体抗原結合部位のライブラリーを作製するプロセスをいう。そのようなライブラリーは、選択された抗原結合部位からの1以上のCDR配列のランダムまたは半ランダム突然変異誘発によって作製することができる。

【0072】

本明細書で使用する「ヒト組成の抗体に基づく抗原結合ドメイン」は、好ましくは、少なくとも抗体VHドメイン及び抗体VLドメインを含むポリペプチドであって、免疫グロブリン配列を含むタンパク質配列のデータベースにおける相同性サーチにおいて、VH及びVLドメインの両方について、ヒト由来の免疫グロブリンドメインが最も高い配列同一性をもってヒットするポリペプチドを意味する。そのような相同性サーチは、BLASTサーチとすることができ、例えば、National Center for Biological Informationで利用可能な配列データベースにアクセスし、「blastp」ルーチンを使用して「BasicBLAST」サーチを行う。さらにAltschulet al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410も参照されたい。好ましくは、そのような組成は、ヒト受容者に投与したときに、それに対する有害な免疫反応を生じないものである。ある好ましい実施形態においては、本発明のヒト組成の抗原結合ドメインは、活性化ヒトB細胞からクローン化され得るようなネイティブヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域を含むが、必ずしもネイティブヒト抗体のCDRのすべてを含む必要はない。

【0073】

本明細書において使用する用語「ミニ抗体フラグメント」は、少なくとも2の抗原結合ドメインであってドメインのそれぞれに融合する自己結合ドメインにより多量体化されたものを含む多価抗体フラグメントを意味し(Pack, 1994)、例えば、自己結合ダイマー化ドメインにそれぞれ融合した2つのscFvフラグメントを含むダイマーである。特に好ましいダイマー化ドメインとしては、ロイシンジッパー(Pack and Pluckthun, 1992)またはヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフ(Pack et al., 1993)に由来するものが挙げられる。

【0074】

本明細書において使用する「活性化された細胞」または「活性化細胞」は、休止状態ではない、対象となる一定の集団の細胞を意味する。活性化は、抗原、マイトジェン（例えばリポ多糖、フィトヘマグルチニン）またはサイトカイン（例えばインターフェロン）によって誘発され得る。好ましくは、前記活性化は、免疫反応が生じる過程において、休止T細胞およびB細胞の刺激の際に起こるものである。活性化細胞は、特定のリンパ系腫瘍細胞でありうる。好ましくは、活性化細胞は、細胞表面上で発現されたMHCクラスII分子の特徴、及び1以上の別の特徴、例えば増大した細胞サイズ、細胞分裂、DNA複製、CD45またはCD11の発現及び免疫グロブリンの生成/分泌などを特徴とするものである。

10

【0075】

本明細書において使用する「活性化されていない細胞」または「非活性化細胞」は、その大部分が休止しており、分裂していない、対象となる一定の集団の細胞を意味する。活性化されていない細胞としては、健常なヒトの血液から精製されるような休止期のB細胞が挙げられる。そのような細胞は、好ましくは、細胞表面上に発現されるMHCクラスII分子の欠損またはそのレベルの低下、ならびに1以上の別の特徴、例えば増大した細胞サイズ、細胞分裂、DNA複製、CD45またはCD11の発現及び免疫グロブリンの生成/分泌などの欠損またはそのレベルの低下を特徴とするものである。

【0076】

「リンパ系細胞」は、細胞系または細胞に言及するのに使用する場合、その細胞系または細胞がリンパ系の系統に由来することを意味し、B及びTリンパ球系統の細胞及びマクロファージ系統の細胞の両方が含まれる。

20

【0077】

「非リンパ系細胞でありMHCクラスII分子を発現する」とは、例えば病的炎症応答の間にMHCクラスII分子を発現するリンパ系細胞以外の細胞である。例えば、そのような細胞としては、滑膜細胞、内皮細胞、甲状腺ストロマ細胞、神経膠細胞が挙げられ、またMHCクラスII分子を発現することができる遺伝的に改変された細胞もまた含まれる。

【0078】

本明細書において使用する用語「HLA-DRの鎖の第1ドメイン」は、鎖のN-末端ドメインを意味する。

30

【0079】

本明細書において使用する用語「HLA-DRの鎖の第1ドメイン」は、鎖のN-末端ドメインを意味する。

【0080】

本明細書において使用する用語「免疫反応の調節」とは、個体の免疫反応の活性の変化、または免疫系の一部を模倣する*in vitro*系の変化に関する。このような活性の変化は、免疫抑制を引き起こすまたは導くものである。

【0081】

用語「免疫抑制」は、放射線照射により、あるいは代謝拮抗剤、抗リンパ球血清または特定の抗体の投与によるような、免疫反応を防止しまたは減少させることをいう。

40

【0082】

用語「免疫反応」または「免疫応答」は、免疫系あるいは免疫系の一部を形成する細胞（リンパ球、顆粒球、マクロファージなど）の抗原刺激に対するの任意の反応をいい、限定するものではないが、抗体産生、細胞性免疫及び免疫寛容が挙げられる。

【0083】

本明細書で使用する、免疫抑制についての用語「IC50」は、例えばT細胞活性化（細胞性応答）またはB細胞活性化（体液性応答）により現れるような免疫反応の阻害などの、最大の反応または効果の50%をもたらす本発明の組成物の濃度をいう。

【0084】

50

用語「アポトーシス」、及び「アポトーシス活性」は、核及び細胞質の凝結、クロマチン凝集、原形質膜微絨毛の喪失、リボソーム、形態が無傷のミトコンドリア及び核物質を含む膜結合ベシクル（アポトーシス体）への細胞質と核の分配、染色体DNAの分解、ミトコンドリア機能の喪失などの形態学的及び生化学的特徴の1以上を伴う哺乳動物における細胞死の形態をいう。アポトーシスは非常に厳格な時間的経過をたどり、プロテアーゼの特定のグループであるカスパーゼにより引き起こされる。アポトーシス活性は、例えば、細胞生存性アッセイ、アネキシンV染色あるいはカスパーゼ阻害アッセイにより判定し測定することができる。アポトーシスは、実施例Hに記載するような抗CD95などの架橋抗体を使用して誘発することができる。

【0085】

用語「予めプログラムされた固有のプロセス」は、いったん開始されると細胞内のメカニズムの自律的なカスケードをたどるプロセスであって、そのプロセスを完結するのに、細胞の環境からの別の補助を何ら必要としないプロセスをいう。

【0086】

本明細書において使用する用語「HuCAL」は、Knappik et al. (2000)に記載のような完全に合成的なヒトのコンビナトリアル抗体ライブラリーをいう。

【0087】

本明細書において使用する用語「CDR3」は、抗体のVH及びVLドメインまたはそのフラグメントの第3の相補性決定領域であって、VH CDR3が位置95~102(100a~100zとして挙げた位置100の後に可能な挿入)を含み、VL CDR3が位置89~96(Vにおいて95a~95cとして挙げた位置95の後に可能な挿入)を含むものをいう(Knappik et al., 2000を参照)。

【0088】

免疫グロブリン分子に関して本明細書に使用される用語「可変領域」は、免疫学の実務にある通常の技術者がその用語に与える通常の意味を有する。抗体重鎖及び抗体軽鎖はいずれも「可変領域」及び「定常領域」に分けることができる。可変領域と重鎖領域との間の区分点は、抗体構造について記載する標準的なテキスト、例えばKabata et al. "Sequences of Proteins of Immunological Interest: 5th Edition" U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)を参照することにより当業者であれば容易に決定することができる。

【0089】

本明細書において使用する用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が通常は互いにハイブリダイズしたままとなるハイブリダイゼーション及び洗浄の条件をいう。好ましくは、該条件は、互いに少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、さらに好ましく少なくとも75%相同な配列が通常は互いにハイブリダイズしたままとなるものである。そのようなストリンジェントな条件は当業者に知られたものであり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York. (1989), 6.3.1-6.3.6に記載されている。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な好ましい例は、6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中で約45度のハイブリダイゼーションとその後の0.2xSSC、0.1% SDS中50~65度の1回以上の洗浄である。

【0090】

「タンパク質コード配列」あるいは特定のポリペプチドまたはペプチドを「コードする」配列は、適当な調節配列の制御下に置かれた場合、in vitroまたはin vivoで転写(DNAの場合)され、ポリペプチドに翻訳(mRNAの場合)される核酸配列である。コード配列の境界は5'(アミノ)末端の開始コドン及び3'(カルボキシ)末端の翻訳停止コドンによって規定される。コード配列には、限定するものではないが、原核

10

20

30

40

50

生物または真核生物の mRNA からの cDNA、原核生物または真核生物の DNA からのゲノム DNA 配列、さらには合成 DNA 配列が挙げられる。転写終結配列は通常コード配列の 3' 側に位置する。

【0091】

同様に、「コードする」は、その文脈から明らかでない場合は、その用語が通常使用されるように、ポリペプチドをコードする DNA 配列、並びに阻害性アンチセンス分子に転写される DNA 配列を意味する。

【0092】

本明細書において使用する用語「トランスフェクション」は、核酸を介する遺伝子導入による、例えば発現ベクターのような異種核酸の受容細胞中への導入を意味する。「一過性のトランスフェクション」とは、外来 DNA がトランスフェクト細胞のゲノムに組み込まれない場合、例えばエピソーム DNA が mRNA に転写されタンパク質に翻訳される場合をいう。核酸構築物が娘細胞に引き継がれる場合、細胞は該核酸構築物により「安定にトランスフェクトされた」ものである。

10

【0093】

「発現ベクター」は、所望のタンパク質をコードする DNA を発現するのに使用される複製可能な DNA 構築物であり、(1) 遺伝子発現において調節的な役割を有する作用因子、例えばプロモーター、オペレーターまたはエンハンサー、これが機能的に連結した(2) 所望のタンパク質(例えば本発明のポリペプチド)をコードし、mRNA に転写されてタンパク質に翻訳される DNA 配列、ならびに(3) 適当な転写及び翻訳開始及び終結配列、の組合せを含む転写ユニットを含むものである。プロモーター及びその他の調節エレメントの選択は、一般に、使用する宿主細胞により変更される。一般に、組換え DNA 技術に有用な発現ベクターは「プラスミド」の形態であることが多く、プラスミドとは、そのベクターの形態では染色体に結合しない環状の二本鎖 DNA ループをいう。本明細書においては、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるという理由から、「プラスミド」及び「ベクター」は互換的に使用される。しかしながら、本発明においては、同等な機能を果たし、今後当分野で知られることになるようなその他の形態の発現ベクターも包含するものとする。

20

【0094】

発現ベクターにおいて、転写または翻訳を制御する調節エレメントは一般に、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫の遺伝子に由来するものとすることができる。通常は複製起点により与えられる、宿主中で複製する能力、及び形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子をさらに組込むことができる。レトロウイルス、アデノウイルスなどのようなウイルスに由来するベクターも使用することができる。

30

【0095】

「転写調節配列」は、開始シグナル、エンハンサー、プロモーターなどの、それが機能的に連結したタンパク質コード配列の転写を誘導または制御する DNA 配列を指すために本明細書全体に使用する一般的な用語である。組換え遺伝子は、その遺伝子の天然形態の転写制御配列と同じまたは場合によっては異なる転写調節配列の制御下に置くことができることは理解されるであろう。

40

【0096】

2つの DNA 領域間の関係について記載する場合の「機能的に連結された」は、単に両者が互いに機能的に関連していることを意味するものである。例えば、プロモーターまたはその他の転写調節配列は、それがコード配列の転写を制御する場合には、該コード配列に機能的に連結されているといえる。

【0097】

本明細書において使用する用語「融合タンパク質」は、当分野で理解されているものであり、2以上の異なるタンパク質に由来するアミノ酸配列からなる単鎖タンパク質として少なくとも最初に発現されるキメラタンパク質をいう。例えば、融合タンパク質は融合遺伝子の遺伝子産物である。

50

【0098】

本明細書において使用する用語「動物」は、哺乳動物をいい、好ましくはヒトのような哺乳動物をいう。同様に、本発明の方法により処置される「患者」または「被験者」は、ヒトまたはヒト以外の動物を意味し得る。

【0099】

本発明の方法によれば、前記ペプチドは薬学的に許容される組成物中のものとして投与することができる。一般的には、モノクローナル抗体、抗体フラグメント及びペプチド用の薬学的に許容される担体は当業者によく知られている。本明細書で使用する用語「薬学的に許容される担体」には、あらゆる及び任意の溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤などが含まれる。好ましい実施形態においては、10
活性成分の生物学的活性の有効性を阻害せず、投与される濃度が宿主に対して過度に有毒ではない担体媒体である。投与は任意の適当な方法で行うことができ、皮下及び非経口投与が挙げられ、好ましくは非経口投与である。非経口投与の例としては、静脈内、動脈内、筋肉内及び腹腔内投与が挙げられ、好ましくは静脈内投与である。

【0100】

注射の用途に適当な医薬剤形は、滅菌水溶液または分散液、及び滅菌注射溶液または分散液の用時調製用の滅菌粉末である。いずれの場合においても、前記剤形は滅菌されたものでなければならず、容易に注射器により投与できる程度の流体でなければならない。また製造及び貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌や真菌などの微生物による汚染作用に対して保護されなければならない。前記担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール20
(例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適当な混合物、及び植物油などの溶媒または分散媒体とすることができる。適当な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング剤の使用、分散液の場合は必要な粒子サイズを維持すること、界面活性剤の使用等により維持することができる。微生物の作用の防御は、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどの種々の抗細菌剤及び抗真菌剤により行うことができる。多くの場合、例えば糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが望ましい。注射可能な組成物の長期間にわたる吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンのような吸収遅延剤を組成物中に使用することにより得られる。

【0101】

滅菌注射溶液は、活性化合物、例えば必要量の本発明のポリペプチドを、必要に応じて上記例示したような種々のその他の成分とともに適当な溶媒に加え、その後滅菌濾過することにより製造される。一般に、分散液は、ベースとなる分散媒を含む滅菌ビヒクルに、上記例示したものから選択される必要なその他の成分とともに種々の滅菌活性成分を加えることにより調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい製造方法は真空乾燥及び凍結乾燥法であり、これにより活性成分と任意の付加的な所望成分の予め濾過滅菌した溶液からそれらの粉末を得ることができる。

【0102】

経口投与用には、本発明のポリペプチドは、賦形剤と混合し、非摂取用の口内洗浄剤および歯磨剤の形態で使用してもよい。口内洗浄剤は、必要量の活性成分をホウ酸ナトリウム40
溶液(Dobell's Solution)のような適当な溶媒に加えることにより調製することができる。また、ゲル、ペースト、粉末、スラリーなどの歯磨剤中に活性成分を分散させることもできる。水、結合剤、研磨剤、香味剤、発泡剤、湿潤剤などを含み得るペースト状の歯磨剤に治療上有効な量の活性成分を加えることもできる。

【0103】

本発明の組成物は、中性の状態または塩の形態で配合することができる。薬学的に許容される塩は、酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基により形成されたもの)を含み、これは例えば塩酸またはリン酸のような無機酸、あるいは酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸で形成される。遊離のカルボキシル基から形成される塩も、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、鉄のような無機塩基、及びイソブ50

ロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から得ることができる。

【0104】

水溶液による非経口投与については、例えば、必要な場合には溶液を適当に緩衝化する必要がある、まず液体希釈剤を十分な生理食塩水またはグルコースにより等張化する。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内投与に特に適している。この場合、使用できる滅菌水性媒体は本明細書の開示内容から当業者に理解され得るであろう。例えば、1回の投与量を1 mlの等張NaCl溶液に溶解し、1000 mlの皮下注入液に加えるかあるいは注入に推奨される部位に注射する（例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 第15版, 1035-1038 10
頁および1570-1680頁参照）。治療対象の被験者の症状によっては投与量をいくらか変更することが必要な場合がある。いずれにしても、投与の責任者が個々の被験者に適当な投与量を決めることになる。さらに、ヒトへの投与に関しては、製剤は、FDA Office of Biologics standardsに規定される、無菌性、発熱源性、一般的安全性及び純度の基準を満たす必要がある。

【0105】

製剤化後、溶液は、投与製剤に適した方法で、治療上有効な量で投与することができる。製剤は、注射溶液、薬剤放出カプセルなどのような種々の投与剤形で容易に投与することができる。

【0106】

本明細書に使用される用語「予防的または治療的」処置は、例えば免疫抑制を引き起こすために、医学的症状を有する宿主に投与することをいう。症状が現れる前に投与する場合はその処置は予防的であり、感染後または発病の後に投与される場合は、その処置は治療的である。

【0107】

本発明のポリペプチドは、ヒトMHCクラスII抗原に対する結合特異性を有する、ヒト組成の抗体に基づく抗原結合ドメインの少なくとも1つを含む。このポリペプチドの細胞表面上に発現された抗原に対する結合は、免疫反応の調節を引き起こすまたは導くものである。

【0108】

本発明はさらに、本発明の少なくとも1つの抗原結合ポリペプチドと、場合により薬学的に許容される担体及び/または希釈剤を含む医薬組成物に関する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、動物、好ましくはヒトの治療用医薬組成物を調製するために用いられる。また好ましくは、本発明のポリペプチドは、T細胞および/またはB細胞のMHCクラスIIが媒介する活性化を特徴とする症状の治療または予防に有用である。さらに好ましい実施形態において、かかる処置は、炎症の病的部位におけるMHCクラスII発現を特徴とする症状の治療または予防である。さらに好ましい実施形態において、かかる処置は、免疫系の疾患の治療または予防である。

【0109】

好ましい実施形態において、本発明の抗原結合組成物は、免疫系の疾患の治療に用いることができ、そのような疾患としては、慢性関節リウマチ、若年性関節炎、多発性硬化症、グレーブス病、ナルコレプシー、乾癬、全身性エリテマトーデス、移植拒絶、移植片対宿主病、橋本病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、糸球体腎炎、甲状腺炎、インスリン炎、原発性胆汁性肝硬変、過敏性大腸疾患及びシェーグレン症候群などの症状が挙げられる。

【0110】

本発明はさらに、本発明の少なくとも1つのポリペプチドおよび/または核酸と、場合によりさらに、診断を行うための試薬、例えばバッファーを含む診断用組成物に関する。

【0111】

さらに、本発明は、(i)本発明のポリペプチド、(ii)検出可能な1以上の成分、及び(iii)ポリペプチド(i)と抗原との結合を行うおよび/またはその結合を検出す 50

るための試薬及び/または溶液、を含むキットに関する。

【0112】

詳細な説明

以下の実施例は、本発明を例示するものである。

【0113】

実施例

以下において、参考文献が明示されていないバッファー、溶液、手順はいずれも標準的なテキスト、例えばCurrent Protocols in Immunology (1997 and 1999)またはSambrook et al., 1989に記載されているものである。特に記載がない材料はいずれもSigma (Deisenhofen, DE)またはMerck (Darmstadt, DE)より購入したものであるか、または入手先が引用文献に示されているものである。ハイブリドーマ細胞系LB3.1及びL243は、LGC Reference Materials (Middlesex, UK)より入手し、8D1抗体に関するデータはMatyas Sandor博士 (University of Michigan, Madison, WI, USA)より寄贈された。

【0114】

1. ヒト抗原の作製

ヒト組成の細胞毒性抗原結合ドメインを同定できたことを示すため、まず、精製された形でのヒト抗原、すなわちPries細胞からのヒトMHCクラスII DRタンパク質 (DRA*0101/DRB1*0401) (Gorga et al., 1984; Gorga et al., 1986; Gorga et al., 1987; Stern et al., 1992)を以下のように作製した。

【0115】

まず、Pries細胞 (ECACC, Salisbury, UK)を標準的な条件下でRPMI及び10%ウシ胎児血清 (FCS) 中で培養し、1%NP-40 (BDH, Poole, UK)、25 mMヨードアセトアミド及び1 mMフェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) 並びにプロテアーゼインヒビター (キモスタチン、アンチパイン、ペプスタチンA、大豆トリプシンインヒビター及びロイペプチン各10 mg/l)を含むリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) (pH 7.5) 200 ml中に、 10^{10} 個の細胞を溶解した。この溶解液を10000×g (30分間、4℃)で遠心分離し、得られた遠心上清に5%デオキシコール酸ナトリウム、5 mMヨードアセトアミド及び上記プロテアーゼインヒビター各10 mg/lを含む水溶液40 mlを加えて、さらに2時間100,000×g (4℃)で遠心分離した。非特異的に結合する物質や内在性抗体を取り除くため、得られた遠心上清をPMSFで0.2 mMとし、0.2 ml/分の流速でウサギ血清Affigel-10カラム、その後Protein G Sepharose Fast Flowカラム (2 ml; Pharmacia)に終夜 (4℃)通過させた。ウサギ血清Affigel-10カラムは、5 ml:ウサギ血清 (Charles River, Wilmington, MA, USA)を、製造者の説明書に従って体積比3:1でAffigel-10 (BioRad, Munich, DE)と共にインキュベートし、洗浄して作製した。

【0116】

次に、前処理した溶解液をマウス抗HLA-DR抗体LB3.1 (ハイブリドーマ細胞系LB3.1の遠心上清をProtein G-Sepharose FF (Pharmacia)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにかけて得た) (Stern et al., 1993)と結合させたProtein G Sepharose Fast Flowビーズ5 mlと軽く混合しながら、4℃で終夜パッチとしてインキュベートし、これを小さなカラムに移し、以下の3つの溶液を使って十分に洗浄した: (1) 50 mMトリス塩酸 (pH 8.0)、150 mM塩化ナトリウム、0.5% NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、10%グリセロール及び0.03%アジ化ナトリウムを含

む溶液 100 ml (流速 0.6 ml/分)、(2) 50 mM トリス塩酸 (pH 9.0)、0.5 M 塩化ナトリウム、0.5% NP-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、10% グリセロール及び 0.03% アジ化ナトリウムを含む溶液 25 ml (流速 0.9 ml/分)、(3) 2 mM トリス塩酸 (pH 8.0)、1% オクチル-D-グルコピラノシド、10% グリセロール及び 0.03% アジ化ナトリウムを含む溶液 25 ml (流速 0.9 ml/分)。

【0117】

さらに、MHC クラス II DR タンパク質 (DRA*0101 / DRB1*0401) を、50 mM ジエチルアミン/塩酸 (pH 11.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1% オクチル-D-グルコピラノシド (Alexis Corp., Lausen, CH)、10% グリセロール、10 mM ヨードアセトアミド及び 0.03% アジ化ナトリウムを含む溶液 15 ml を用いて流速 0.4 ml/分で溶出した。得られた画分 800 µl を 1 M トリス塩酸 (pH 6.8)、150 mM NaCl 及び 1% オクチル-D-グルコピラノシドを含む溶液 100 µl で直ちに中和した。MHC タンパク質を溶解液から取り除けるまで、LB 3.1 結合 Protein G Sepharose Fast Flow ビーズと共に溶解液のインキュベーションを繰り返した。MHC クラス II DR タンパク質の純粋な溶出画分 (SDS-PAGE で分析) をプールし、これを 30 kDa 分子量カットオフで VivaSpin 濃縮器 (Greiner, Solingen, DE) を用いて 1.0 ~ 1.3 g/l に濃縮した。同じ VivaSpin 濃縮器を用いて、上記 MHC クラス II DR 調製物約 1 mg を 1% オクチル-D-グルコピラノシドを含む PBS で再び緩衝化し、このタンパク質を BIAcore CM5 チップに直接結合させた。

【0118】

2. HuCAL のスクリーニング

2.1. 序

最近明らかにされた新規の概念 (Knappik et al., 2000) に基いて、ヒト抗体ライブラリーから、ヒト抗原 (DRA*0101 / DRB1*0401) に対するヒト組成の特定の抗原結合抗体フラグメント (MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 及び 16) を同定した。ここで、合計 49 の異なるフレームワークを生じるコンセンサスフレームワークは、ヒト免疫反応に広く使われる VH 及び VL の各サブファミリーを表す。これらのマスター遺伝子は、タンパク質凝集を促進するような好ましくない残基を考慮してこれを除去し、遺伝子の模型組成を導く特有の制限部位を作製するように設計した。HuCAL-scFv において、49 のマスター遺伝子の VH-CDR3 及び VL-CDR3 をコードする領域は、いずれもランダムなものであった。

【0119】

2.2. ファージミドのレスキュー、ファージの増幅及び精製

大腸菌 TG-1 中のファージミドによるファージディスプレイベクター pMORPH13-scFv (図 11 参照) にクローン化した、HuCAL-scFv (Knappik et al., 2000) ライブラリーを 34 µg/ml クロラムフェニコール及び 1% グルコースを含む 2xTY 培地 (2xTY-CG) 中で増幅させた。OD₆₀₀ = 約 0.5 として 37 °C でヘルパーファージを感染させ (VCSM13)、遠心分離し、34 µg/ml クロラムフェニコール、50 µg/ml カナマイシン及び 0.1 mM IPTG を含む 2xTY 培地に再懸濁させた後、30 °C で終夜細胞増殖させた。ファージは遠心上清より PEG 沈殿させ (Ausubel et al., 1998)、20% グリセロールを含む PBS に再懸濁させ、-80 °C で保存した。2 回のパンニングの間に以下のとおりファージ増幅を行った。対数増殖期の TG1-細胞を溶出したファージに感染させ、1% グルコース及び 34 µg/ml クロラムフェニコールを加えた LB 寒天培地に塗布した。30 °C で終夜インキュベートした後、コロニーを削り取り、OD₆₀₀ = 0.5 として上記のとおりヘルパーファージを加えた。

10

20

30

40

50

【0120】

2.3. 手動固相パンニング

MHC - クラスII / DRA* 0101 / DRB1* 0401 (上記のとおり作製) を PBS に溶解し、MaxiSorpTM マイクロタイタープレート (Nunc, Roskilde, DK) のウェルにコーティングした (2 µg / ウェル)。PBS 中の 5% 無脂肪粉乳でブロッキングを行い、上記の如く精製した $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 個の HuCAL - scFv ファージを 20 で 1 時間にわたって加えた。数回洗浄ステップを行った後、100 mM トリエチルアミンによる pH 溶出、さらに 1 M トリス塩酸 (pH 7.0) による中和を行い、結合ファージを溶出した。上記のように各パンニングの間にファージ増幅を行いながら、3 回のパンニングを行った。

10

【0121】

2.4. 固相 / 全細胞混合パンニング

2 回目に 10 ml の Falcon チューブで 10% FCS を含む PBS 1 ml 中、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 個の Priess 細胞を使って全細胞パンニングを行った以外は、2.2 及び 2.3 に記載のとおり 3 回のパンニング及びファージ増幅を行った。ファージ調製物と 20 で 1 時間インキュベートした後、この細胞懸濁液を遠心分離 (2000 rpm、3 分間) し、非結合ファージを取り除き、細胞を PBS 10 ml で 3 回洗浄し、各洗浄ごとに上記のように遠心分離を行った。特異的に細胞に結合したファージを 100 mM 塩酸による pH 溶出で溶出した。あるいは、トリエチルアミン処理 (100 mM) 及び中和処理の後、懸濁液に大腸菌を直接加えて、結合ファージを増幅することもできる。

20

【0122】

2.5. HLA - DR 結合 scFv フラグメントの同定

3 回の固相パンニング (2.3) または固相 / 全細胞混合パンニング (2.4) によって得られたクローンを、Priess 細胞と細胞表面上の HLA - DR との結合について FACS 分析を行うことによってスクリーニングした。scFv を発現させるために、scFv フラグメントを XbaI / EcoRI を介して発現ベクターとしての pMx7_{FS} にクローン化した (図 12 参照)。発現条件は以下の実施例 3.2 に示すとおりである。

【0123】

10^6 個の Priess 細胞アリコート を 4 で 96 穴マイクロタイタープレートのウェルに移した。ブロッキングバッファー (5% FCS を含む PBS) に溶解した scFv を 60 分間にわたって加え、抗 FLAG M2 抗体 (Kodak) (5000 倍に希釈)、続いてポリクローナルヤギ抗マウス IgG 抗体 - R - フィコエリスリンコンジュゲート (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, Cat. No. 115 - 116 - 146, F(ab')₂ フラグメント) (200 倍に希釈) を用いて検出した。細胞は保存のため 4 で 4% パラホルムアルデヒドにより固定した。FACS - Calibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) を用いて各アッセイごとに 10^4 事象を回収した。

30

40

【0124】

500 を超える推定結合物質のうちわずか 15 のみが Priess 細胞に特異的に結合することが同定された。これらのクローンを、さらに以下のとおり免疫調節能および死滅活性について分析した。表 1 は、これによって特定されたクローンである MS - GPC - 1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 及び 16 の配列特性を示す。表に示した VH ファミリー、VL ファミリー及び CDR3 は、記載されたとおり (Knapik et al., 2000)、HuCAL コンセンサスに基いた抗体遺伝子であり、VH 及び VL CDR の配列を表 1 に示し、VH ドメイン及び VL ドメインの全配列は図 15 に示す。

【0125】

50

3. Fabフラグメントの作製

3.1. scFvからFabへの変換

Fabフラグメント抗原結合ポリペプチドであるMS-GPC-1-Fab、MS-GP-6-Fab、MS-GPC-8-Fab及びMS-GPC-10-Fabは、以下のとおりそれぞれ対応するscFvフラグメントから作製した。scFvフラグメントの重鎖及び軽鎖の可変ドメインは共にpMx9__Fabにクローン化し(図13)、重鎖可変ドメインはMfeI/StyI断片として、軽鎖の可変ドメインはEcoRV/BsiWI断片としてクローン化した。鎖はまず、対応するpMORPH13__scFvベクターを鋳型としてPCRプライマーCRT5(5'プライマー)及びCRT6(3'プライマー)を用いて増幅した。このときCRT6は特有のDraIII制限エンドヌクレアーゼ部位を導入する。

【0126】

CRT5: 5' GTGGTGGTTCCGATATC 3'

CRT6: 5' AGCGTCACACTCGGTGCGGCTTTCGGCTGGCCAAGAACGGGTTA 3'

PCR産物は、EcoRV/DraIIIで切断し、pMx9__Fabにクローン化した(図13参照)。Fab軽鎖は、ポリクローナルヤギ抗マウスIgG抗体-R-フィコエリスリンコンジュゲート(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, Cat. No 109-116-088, F(ab')₂フラグメント)(200倍に希釈)で検出することができた。

【0127】

3.2. 大腸菌におけるHuCAL抗体フラグメントの発現及び精製

pMx7__FSまたはpMx9__FabからのscFv及びFabフラグメントの大腸菌細胞(JM83)でのそれぞれの発現は、34 µg/mlクロラムフェニコールを加えた2xTY培地1L中で行った。0.5 mM IPTG(scFv)または0.1 mM IPTG(Fab)による誘導の後、22°Cで12時間細胞増殖させた。French Press(Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA)により、細胞ペレットを20 mMリン酸ナトリウム、0.5 M NaCl及び10 mMイミダゾール(pH 7.4)中に溶解した。細胞破砕物を遠心分離で取り除いた後、透明遠心上清を0.2 µm孔径のフィルターで濾過してから、Streptactinマトリックスを用いて、供給者(IBA GmbH, Göttingen, DE)の精製条件に従いSTREPタグ精製を行った。Reinnecker et al.(1996)に記載されたとおりに、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による精製を行った。校正標準を用いながらSECにより見かけ上の分子量を測定し、場合によっては液体クロマトグラフィーおよび質量分析の組合せ(TopLab GmbH, Martinsried, DE)により確認した。

【0128】

4. 抗体フラグメントの最適化

HLA-DR結合抗体フラグメントの特定の生物学的特性を最適化するため、Fabフラグメントの一つであるMS-GPC-8-Fabを使って、親VL₁鎖を、HuCALライブラリーからのCDR3においてランダム化された全鎖₁₋₃のプールに置き換えることによりFab抗体フラグメントのライブラリーを構築した(Knappik et al., 2000)。

【0129】

FabフラグメントMS-GPC-8-Fab(3.1参照)を、pMx9__Fab__GPC-8からFabフラグメントのファージディスプレイのためのファージミドベクターであるpMORPH18__FabにXbaI/EcoRIを介してクローン化し、pMORPH18__Fab__GPC-8を作製した(図14参照)。特有のDraIII制限エンドヌクレアーゼ部位を含む鎖のプール(Knappik et al., 2000)を、NsiI及びDraIIIで切断し、pMORPH18__Fab__GPC-8にクロ

ーン化した（図14におけるpMORPH18__Fab__GPC-8のベクターマップ参照）。

【0130】

2回目に、コーティングする抗原濃度を12 ng/ウェルに低減した以外は、2.3に記載のとおり、得られたFab最適化ライブラリーをMHC-クラスIIのDRA1*0101/DRB1*0401（上記のとおり作製）に対する2回のパンニングによりスクリーニングした。2.5に記載のとおりFACSで最適化クローンを同定した。これらのクローンのうち6つのクローン、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18及びMS-GPC-8-27をさらに特性決定し、またこれらは開始フラグメントであるMS-GPC-8に見られるような細胞死滅活性を示した。表1に、MS-GPC-8-1、MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-9、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-18及びMS-GPC-8-27の配列特性を示す。表に示したVHファミリー、VLファミリー及びCDR3は、記載されたように（Knappik et al., 2000）、HuCALコンセンサスペースの抗体遺伝子を表す。MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17及びMS-GPC-8-27のVHドメイン及びVLドメインの全配列を図15に示す。

10

【0131】

抗HLA-DR抗体フラグメントの最適化したFab形態であるMS-GPC-8-6及びMS-GPC-8-17は、開始MS-GPC-8に比べその特性が向上していた。例えば、最適化抗体のEC50は、15~20 nM及び5~20 nM（MS-GPC-8ではその濃度を二価の架橋Fabダイマーの濃度で表した場合20~40 nM）となった。MS-GPC-8-6及びMS-GPC-8-17のMHH-CALL 4細胞に対する最大死滅能はそれぞれ76%と78%（MS-GPC-8は65%）となった。

20

【0132】

さらに最適化するため、MS-GPC-8（MS-GPC-8-10及びMS-GPC-8-27を含む）由来の一群の抗HLA-DR抗体フラグメントのVL CDR1領域をトリヌクレオチド特異的変異誘発法を利用したカセット変異誘発法により最適化した（Virnekas et al., 1994）。簡単に説明すると、ランダムな6つの位置（全変動性： 7.43×10^6 ）を含むV11 CDR1ライブラリーのカセットを合成し、V11フレームワークにクローン化した。このCDR1ライブラリーをEcoRV及びBbsIで消化し、CDR1ライブラリーを含む断片をpMORPH18__Fabにおける上記MS-GPC-8由来のFab抗体フラグメントの軽鎖に（上記のように）連結し、EcoRV及びBbsIで消化した。得られたライブラリーを上記と同様にスクリーニングした。10個のクローンが上記のようにHLA-DRに特異的に結合することにより同定され（MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10及びMS-GPC-8-27-41）、開始フラグメントであるMS-GPC-8、MS-GPC-8-10及びMS-GPC-8-27に見られるような細胞死滅活性を示した。表1に、MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-19、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8-6-45、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10及びMS-GPC-8-27-41の配列の特徴を示す。表に示したVHファミリー、VLファミリー及びCDR3は、記載されたように（Knappik et al., 2000）、HuCALコンセンサスペースの抗体遺伝子を表し、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41のVHドメイン及びVLドメインの全配列を図15に示す。

30

40

【0133】

50

これら10個のクローンから、実施例10に記載のとおり細胞死滅のEC50が著しく向上した4個のFabフラグメントを選択した(MS-GPC-8-6-2、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41)。表1は、CDR1領域で最適化したクローンの配列を示す。

【0134】

最適化方法により、最適化工程で作製した抗HLA-DR抗体フラグメントの生物学的効力が高まっただけでなく、物理的特性、すなわち抗体フラグメントのHLA-DRタンパク質に対する親和性も実質的に向上した。例えば、MS-GPC-8のFab形態及びその最適化誘導体の親和性を、実施例7に従って、表面プラズモン共鳴装置(Biacore, Uppsala, Sweden)を用いて測定した。VL CDR3の最適化後、MS-GPC-8の親Fabの親和性が346 nMから約60 nMとなって100倍以上向上し、VL CDR3+1の最適化後には、親和性が一桁のナノモルレベル(3~9 nMの範囲)にまでさらに向上した(表2)。

10

【0135】

5. IgGの生成

5.1. HuCAL免疫グロブリン発現ベクターの構築

重鎖は、以下のようにクローン化した。pcDNA3.1+(Invitrogen)のマルチクローニング部位を取り除き(NheI/ApaI)、リーダー配列(NheI/EcoRI)、VHドメイン(EcoRI/BlpI)及び免疫グロブリン定常領域(BlpI/AnaI)の連結のために、HuCAL設計に用いた制限部位と一致するスタッファー(stuffer)を挿入した。上記リーダー配列(EMBL M83133)はコザック配列(Kozak, 1987)を備えていた。ヒトIgG1(PIR J00228)、IgG4(EMBL K01316)及び血清IgA1(EMBL J00220)の定常領域は、約70塩基の長さの重複オリゴヌクレオチドに分割した。HuCAL設計と一致しない制限部位を取り除くため、サイレント変異を導入した。上記オリゴヌクレオチドをオーバーラップ伸長PCRでスプライシングした。

20

【0136】

軽鎖は、以下のようにクローン化した。pcDNA3.1/Zeo+(Invitrogen)のマルチクローニング部位を2個の異なるスタッファーで置き換えた。スタッファーにより、リーダー(NheI/EcoRV)、HuCAL-scfVvドメイン(EcoRV/Bs1WI)及び鎖定常領域(Bs1WI/ApaI)の挿入のための制限部位が得られた。スタッファーにおける対応する制限部位は、NheI/EcoRV(リーダー)、EcoRV/HpaI(Vドメイン)及びHpaI/AnaI(鎖定常領域)である。リーダー(EMBL Z00022)及びリーダー(EMBL L27692)はともにコザック配列を備えていた。上記ヒト鎖(EMBL J00241)及び鎖(EMBL M18645)の定常領域は、上記のようにオーバーラップ伸長PCRで構築した。

30

【0137】

5.2. IgG発現CHO細胞の生成

すべての細胞を5%CO₂を含む加湿雰囲気下、供給者が推奨する培地中に37℃で維持した。CHO-K1(CRL-9618)はATCCから入手し、IgGの重鎖および軽鎖の発現ベクターの等モル混合液で共トランスフェクトした。二重耐性トランスフェクタントを600 µg/mlのG418及び300 µg/mlのゼオシン(Invitrogen)で選択してから、限界希釈を行った。単クローンの上清のIgG発現を捕捉ELISAで評価した。10% Ultra-low IgG-FCS(Life Technologies)を添加したRPMI-1640培地で陽性クローンを増殖させた。上清のpHを8.0に調節し、滅菌濾過した後、該溶液を標準プロテインAカラムクロマトグラフィー(Poros 20A, PE Biosystems)にかけた。

40

【0138】

抗HLA-DR抗原結合ドメインのIgG形態は、上記抗体フラグメントに比べて向上し

50

た特性を示している。これらの向上した特性として、親和性（実施例 7）及び死滅効率（実施例 9、10 及び 14）が挙げられる。

【0139】

6. HLA-DR 特異性アッセイ及びエピトープマッピング

HuCALライブラリーから選択した抗原結合ドメインが、レセプター架橋による細胞死滅という観点からはこれまで知られていなかった、主に対立遺伝子間で保存されているヒト MHC II レセプターの N 末端ドメインの結合部位に特異的に結合することを示すため、その結合特異性を評価し、結合エピトープの特性決定を行った。

【0140】

Fab 抗体フラグメントである MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8 及び MS-GPG-8-6 は、HLA-DR タンパク質に対する結合特異性を示したが、非 HLA-DR タンパク質に対しては示さなかった。HuCALライブラリーから選択した Fab フラグメントの下記の抗原、すなわち HLA-DR タンパク質 (DRA*0101 / DRB1*0401; 実施例 1 のように作製)、BSA、テストステロン BSA、リゾチーム、及びヒトアポトランスフェリンを含む一群の関連しない非 HLA-DR タンパク質との反応性を分析した。空のウェル (Plastic) を使って陰性対照とした。PBS (Nunc-MaxiSorp™) 中、MHC II 抗原を 1 µg / ウェルで一晩にわたってコーティングし、その他の抗原 (BSA、テストステロン BSA、リゾチーム、アポトランスフェリン) は 10 µg / ウェルで使用した。翌日、ウェルを 5% 無脂肪乳で 1 時間ブロッキングし、続いて各抗体 (抗 MHC II-Fab 及び関連しない Fab (Mac1-8A)) を 100 ng / ウェルで 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、TBS (5% w/v 無脂肪粉乳及び 0.05% v/v Tween 20 を添加) で 10000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG-F(ab')₂ を各ウェルに 1 時間加えた。最終洗浄を PBS で行った後、基質 POD (Roche) を加えた。ELISA リーダーを用いて 370 nM で発色を測定した。

【0141】

抗 HLA-DR 抗体フラグメントである MS-GPC-8-27-7、MS-GPC-8-27-10、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-6-47、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-6-27、MS-GPC-8 及び MS-GPC-8-6 は、これらの抗体フラグメントを HLA-DR 由来抗原と共にインキュベートしたことにより得られた蛍光強度が対照に比べはるかに高いことから明らかのように、いずれも HLA-DR に対する高い特異性を示した (図 1a)。同様の実験で、Fab フラグメントである MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 及び 16 は、DRA*0101 / DRB1*0401 (上記のとおり作製)、並びに DRA*0101 及び DRB1*0401 の各 N 末端ドメインを含み、残りがマウスクラス II IE d 相同体由来の分子を含むキメラ DR-IE (Ito et al., 1996) のいずれにも結合することがわかった (図 1b)。

【0142】

本発明の抗 HLA-DR 抗体フラグメント及び IgG の広範な DR 反応性を証明するため、MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 及び 16 の scFv 形態並びに MS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-51 及び MS-GPC-8-6-13 の IgG 形態を、それぞれがヒト集団においてもっとも頻りに現れる DR 対立遺伝子の 1 つの同型接合体である ECACC (Salisbury, UK) より入手した一連のエプスタイン-バーウィルスで形質転換した B 細胞系に対する反応性について試験した (細胞系及び対立遺伝子を図 2 に示す)。上記抗体フラグメントは、それぞれ DRB3*0101、DRB4*0101、DP0103/0402、DP0202/0201 及び DQ0201/0602 分子を発現する DRB1:L105.1、L257.6、L25.4、L256.12 及び L21.3 以外の

ヒトクラスIIのアイソタイプを発現させるためにトランスフェクトした一連のL細胞に対する反応性についても評価した(Klohe et al., 1988)。

【0143】

様々なMHCクラスII分子を発現する一連の細胞系に対する抗原結合フラグメントの反応性は、例えば、Ottens et al. (1997)に記載の方法のような免疫蛍光法を用いて証明された。各抗HLA-DR抗体フラグメントが保持するM2タグに対する2次試薬としての抗FLAG-M2抗体、及び染色試薬としてのフルオレセイン標識ヤギ抗マウスIg(BD Pharmingen, Torrey Pine, CA, USA)を用いて、 2×10^5 個の細胞を染色した。細胞を、抗HLA-DR抗体フラグメントの濃度を200 nMとし4で60分間インキュベートした後、2次および3次抗体を製造者により定められた濃度で用いてインキュベートした。IgG形態については、2次抗体を使用せず、IgGをFITC標識マウス抗ヒトIgG4(Serotec, Oxford, UK)を用いて検出した。インキュベートする毎に細胞を洗浄した。最後に、細胞を洗浄して、FACS Calibur(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)を用いて分析を行った。

10

【0144】

図2は、scFvフラグメントであるMS-GPC-1、2、5、6、7、8、10、11、14、15及び16並びにIgG形態のMS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-51及びMS-GPC-8-6-13が、試験したDRB1アロタイプすべてと反応するが、MS-GPC3及び4は試験した4つ以上のDRB1アロタイプと反応することを示す。この観察結果は、すべての抗HLA-DR抗体フラグメントがキメラDR-IEと反応するという観察結果とともに選択した抗HLA-DR抗体フラグメントの全てが単形性DR鎖の細胞外第1ドメインまたはDR鎖の細胞外第1ドメイン上の単形性エピトープを認識することを示唆している。

20

【0145】

その後、さらにHLA-DR上の結合ドメインが知られているマウス抗体との競合結合を検討することにより、MS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41の結合ドメインの位置決定を試みた。マウス抗体のL243及びLB3.1は1ドメインに、1-1C4及び8D1は1ドメインに、10F12は2ドメインに結合することが知られている(Vidovic et al., 1995b)。この目的のために、最初にIgG4形態のMS-GPC-8-10-57またはMS-GPC-8-27-41、Fab形態のMS-GPC-8-10-57またはFab形態のGPC-8及び関連しない対照抗体とともにDR発現細胞系(LG-2)をインキュベートするアッセイを開発した。次にマウス抗体を加え、マウス抗体を検出した。MS-GPC-8-10-57またはMS-GPC-8-27-41の結合部位がマウス抗体の結合と重複する場合は、マウス抗体の検出が減少することが予想される。

30

【0146】

IgG4形態のGPC-8-27-41及びMS-GPC-8-10-57並びにFab形態のMS-GPC-8-10-57の結合が実質的に1-1C4及び8D1の結合を阻害したが(平均蛍光強度が>90%減少)、L243、LB3.1及び10F12並びに対照はわずかに影響を受けたにすぎなかった。Fab形態のMS-GPC-8は1-1C4の結合を約50%減少させ(平均蛍光強度は244から118に低下)、8D1の結合を完全に消失させ、L243、LB3.1及び10F12または対照の結合はわずかに影響を与えたにすぎなかった。関連しない対照抗体は、いずれの結合にも影響を全く与えなかった。このように、MS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41は、対立形質HLA-DR分子において高度に保存されている1ドメインエピトープを認識しているようである。

40

【0147】

染色の手順はすべて氷上で行った。ヒトBリンパ芽球系細胞系LG-2の 1×10^7 個の細胞を2% FCS及び35 $\mu\text{g/ml}$ モルモットIgGを含むPBS(以下「FACS

50

バッファー」) 中で20分間プレブロックした。これらの細胞をそれぞれ約 3.3×10^6 個の細胞を含むA、B及びCの3つの部分(A、B及びC)に等分し、これらをA) $35 \mu\text{g}$ のIgG4形態のMS-GPC-8-10-57またはMS-GPC-8-27-41、B) $35 \mu\text{g}$ のFab形態のMS-GPC-8-10-57またはFab形態のMS-GPC-8、そしてC)陰性対照として $35 \mu\text{g}$ の関連しないIgG4抗体にそれぞれ加えて、90分間インキュベートした。続いて、A、B及びCをそれぞれ 5.5×10^5 個の細胞を含む6つの部分に等分し、それぞれのバイアルに以下のマウス抗体; 1)精製mIgG、2)L243、3)LB3.1、4)1-1C4、5)8D1、6)10F12を $2 \mu\text{g}$ 加え、30分間インキュベートした。次に、PBS 4 mlを各バイアルに加え、バイアルを300 gで8分間遠心分離にかけた。最終濃度が $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにヤギ抗マウスIg-FITCコンジュゲートの1~25倍希釈液を含む $50 \mu\text{l}$ のFACSバッファー(BD Pharmingen, Torrey Pines, CA, USA)に細胞ペレットを再懸濁した。細胞は遮光しながら30分間インキュベートした。その後、細胞を4 mlのPBSで洗浄し、上記のように遠心分離を行い、 $500 \mu\text{l}$ のPBSに再懸濁してフローサイトメーターで分析した(FACS Calibur, BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)。

【0148】

PepSpot法(US 6040423; Heiskanen et al., 1999)を用いて、さらにMS-GPC-8-10-57に対する結合エピトープを同定した。簡単に述べると、固相ペプチド合成スポットティング法(WO 00/12575)により、セルロース膜上に73個の重複した15アミノ酸長ペプチドのアレイを合成した。これらのペプチド配列は、HLA-DR4Dw14、HLA-DRA1*0101(残基1~81)及びHLA-DRB1*0401(残基2~92)の1ドメイン及び1ドメインの配列にそれぞれ由来し、2個のアミノ酸で重複している。次に、そのようなアレイを0.1% Tween 20/PBS(以下「PBS-T」)に浸して、5% BSAを含むPBS-Tを用いて室温で3時間ブロックを行い、続いてPBS-Tで3回洗浄した。さらに、作製したアレイをIgG形態のGPC-8-10-57の $5 \text{ mg}/\text{l}$ 溶液を含む1% BSA/PBS-T 50 ml を用いて室温で90分間インキュベートした。そして結合後、膜をPBS-Tで3回洗浄し、続いて1% BSA/PBS-Tで5000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト軽鎖抗体と室温で1時間インキュベートした。最後に、PBS-Tで膜を3回洗浄し、X線フィルム上における化学発光検出により全ての結合を測定した。ヤギ抗ヒト軽鎖抗体の非特異的結合の対照として、PBS-T(2回)、水、DMF、水、8M尿素含有水溶液、1% SDS、0.5% DTT、50%エタノール溶液、10%酢酸含有水(以上各3回)及び最後にメタノール(2回)で室温にて30分間別々に洗浄を行うことによりペプチドアレイを取り除いた。膜を再びブロックし、洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトI軽鎖抗体とインキュベートし、上記のように現像した。

【0149】

7. 抗HLA-DR抗体及び抗体フラグメントの親和性

本発明の抗HLA抗体フラグメントの優れた結合性を示すため、プラズモン共鳴の原理を使用した標準的な機器を用いて、ヒトMHCクラスII DRタンパク質(DRA*0101/DRB1*0401)に対する結合親和性を測定した。驚くべきことに、本発明の特定のIgG形態の抗HLA-DR抗体フラグメントについてナノモル未満のレベルの親和性が得られた。例えば、IgG形態のMS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-6-13及びMS-GPC-8-10-57の親和性は、それぞれ0.3、0.5及び0.6 nMと測定された(表3a)。また、CDR1及びCDR3軽鎖領域で成熟したFab形態の親和性として、2~8 nMの範囲の高い親和性が見られた(表3b)。CDR3軽鎖領域のみにおいて成熟したFab形態は40~100 nMの範囲の親和性を示し(表3c)、非最適化HuCAL抗原結合ドメインのFabフラグメントでさえも

μM より低い範囲の親和性を示した(表3d)。CDR3の最適化後、 K_{on} は中程度の増加のみ(2倍)見られ(抗体最適化プロセスを通じて K_{on} は $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオーダーでほぼ一定であった)、一方 K_{off} が大きく減少したのは最適化プロセスの特徴であり、非最適化Fab、CDR3最適化Fab、CDR3/CDR1最適化Fab及び本発明のIgG形態の抗HLA-DR抗体フラグメントについて、それぞれ 100 s^{-1} 未満、 10 s^{-1} 未満、 1 s^{-1} 未満及び 0.1 s^{-1} 未満であることが見られたのは驚きであった。

【0150】

本発明の抗HLA抗体フラグメントの親和性を以下のように測定した。すべての測定は、HBSバッファー(20 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4)中、流速 $20 \mu\text{l}/\text{分}$ 、25℃でBiacore 3000装置(Biacore AB, Sweden)を用いて行った。MHCクラスII DRタンパク質(実施例1において作製)を100 mM酢酸ナトリウム(pH 4.5)で50~100 mg/mlの濃度に希釈し、標準的なEDC-NHS化学結合法でCM5チップ(Biacore AB)に結合し、続いて製造者の指示どおりにエタノールアミン処理を行った。MHC-IIの塗布密度は500~4000 RUに調節した。5種の異なる濃度で異なる抗体を注入し、Biacore装置の標準ソフトを用いて親和性を測定した。結合表面の再生は10 mMグリシン(pH 2.3)及び7.5 mM水酸化ナトリウムを用いて行った。

【0151】

8. 抗HLA-DR抗体及び抗体フラグメントの多価死滅活性

細胞死滅に対する価数の効果を示すため、本発明の抗HLA-DR抗体フラグメントの一価、二価及び多価の組成物を用いて、GRANTA-519細胞に対し細胞死滅アッセイを行った。HuCALライブラリーからの抗HL1-DR抗体フラグメントは、抗FLAG-M2-mAbとともにインキュベートすることにより架橋して二価の組成物を形成した場合、一価組成物(抗体フラグメント濃度が200 nMのとき5~30%死滅)に比べ、はるかに高い細胞毒活性(抗体フラグメント濃度が200 nMのとき60~90%死滅)を示した(図3)。抗HLA-DR抗体フラグメントを加えることなく、細胞系のみで、または抗FLAG-M2-mAbのみの存在下でインキュベートした場合、細胞生存性によって測定されるような細胞毒性は示されなかった。抗FLAG-M2-mAbを加えていない、IgG4形態(天然では二価)の抗体フラグメントであるMS-GPC-8、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41を50 nMで用いる以外は上記のとおり細胞処理を行った場合、4時間のインキュベート後、それぞれ76%、78%、78%及び73%の死滅効率が示された。

【0152】

また、さらに高価数の抗HLA-DR抗体フラグメントはさらに細胞生存性を大きく減少させることが観察された。IgG形態の抗HLA-DR抗体フラグメントを含むインキュベーション混合液にタンパク質Gを加えると、形成された多価の複合体は、二価のIgG形態のみを有する抗HL4-DR抗体フラグメントのインキュベーションで形成した二価の組成物に比べ、さらに細胞生存性を減少させた。

【0153】

HuCALライブラリーから選択した抗HLA-DR抗体フラグメントの死滅効率をHLA-DR陽性腫瘍細胞系GRANTA-519(DSMZ, Germany)で試験した。加熱により不活性化した2.5% FBS(Biowhitaker Europe, BE)、2 mM L-グルタミン、1%非必須アミノ酸、1 mMピルビン酸ナトリウム及び $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ カナマイシンを添加したRPMI 1640培地(PAA, Germany)中、200 nM抗HLA-DR抗体フラグメントとともに 2×10^5 個の細胞を6% CO_2 下37℃で4時間インキュベートした。100 nMの二価の架橋抗FLAG-M2-mAbを加えて、各抗HLA-DR抗体フラグメントを、一価の抗HLA-DR抗体フラグメントまたは二価の組成物としての活性化腫瘍細胞を死滅する能力について試験した。6% CO_2 下37℃で4時間インキュベートした後、トリパンブルー

10

20

30

40

50

染色を行い、残った生存細胞数を測定して細胞生存性を測定した (Current Protocols in Immunology, 1997)。

【0154】

細菌タンパク質であるタンパク質Gの連続希釈物とプレインキュベートして作製したIgG形態のMS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41の多価形態に対して、KARPAS-422細胞を用いて上記の実験を繰り返した。タンパク質Gは、IgG抗体に対して高い親和性及び2ヶ所の結合部位を有し、効果的にこれらを架橋して総結合価数4を与える。タンパク質Gとのプレインキュベートを行わず、IgGのみを用いた対照では、約55%の細胞が死滅し、一方タンパク質GとプレインキュベートしたIgGを用いた細胞死滅では、IgG抗体/タンパク質Gの分子比が~6(28.5kDのタンパク質Gの分子量に基づく)のとき最高で約75%になった。IgG抗体/タンパク質G分子比がこれより高いか低いときは、純粋なIgG抗体の細胞死滅効率に近づいた。

10

【0155】

9. 抗HLA-DR抗体フラグメントの死滅効率

HLA-DR分子を発現するその他の腫瘍細胞系に対する抗HLA-DR架橋抗体フラグメントの死滅効率を測定するための実験を実施例8と同様に行った。4時間のインキュベート後MS-GPC-8架橋Fab形態により50%以上の細胞死滅を示す腫瘍細胞系は、MHH-CALL4、MN60、BJAB、BONNA-12であり、それぞれB細胞急性リンパ性白血病、B細胞急性リンパ性白血病、バーキットリンパ腫及びヘアリーセル白血病を表す。抗HLA-DR抗体フラグメントMS-GPC-1、MS-GPC-6及びMS-GPC-10の架橋Fab形態を用いると、上記の腫瘍細胞系に対して、架橋抗FLAG-M2-mAbを用いて二価物質として形成した場合と同様の細胞毒活性を示した。

20

【0156】

実施例8に記載した方法を用いて、Priess細胞に対する各架橋二価抗HLA-DR抗体フラグメントの最大死滅能を測定した。MS-GPC-1、MS-GPC-6、MS-GPC-8及びMS-GPC-10に見られた最大死滅能は、それぞれ83%、88%、84%及び88%と測定された。実施例4に従い生成した抗体フラグメントは、上記のように抗FLAG-M2-mAbを用いて架橋した場合、GRANTA及びPriess細胞に対しても同様に向上した死滅能を示した(表4)。

30

【0157】

10. ヒト組成の抗HLA-DR-IgG抗体の死滅効率

対応するマウス抗体(Vidovic et al., 1995b; Nagy & Vidovic, 1996; Vidovic & Toral, 1998)と比べ、驚くべきことに、本発明の特定のIgG形態の抗HLA-DR抗体フラグメントの死滅効率が大きく向上していることがわかった(表5)。50nMとした以外は実施例8及び9記載の方法に従い、本発明の特定のIgG形態の抗体フラグメントの死滅効率の測定を繰り返した(3回から5回の複製実験で、各実験で細胞数を2回測定)。50nMだけの最終濃度を適用すると、IgGの抗体フラグメントMS-GPC-8、MS-GPC-8-6-13、MS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41は、実施例11で測定されるように10蛍光単位より高いレベルでHLA-DR抗原を発現する24個のヒト腫瘍細胞系のパネルのそれぞれ16、22、19及び20からの細胞の50%超を死滅させた。2種のマウス抗HLA-DR抗体L243(Vidovic et al., 1995b)及び8D1(Vidovic & Toral, 1998)でmAbの最終濃度を有意に高くして(200nM)細胞を処理すると、24のHLA-DR発現細胞系のうち13及び12のみでそれぞれ細胞生存性が生存細胞50%というレベル未満に低下した。MHH-PREB1細胞系は、蛍光単位10より高いレベルでHLA-DR抗原を発現するが、上記の抗体がいずれも有意な細胞生存性の低下を誘発することができないため、除外して24細胞系のパネルの一つとして考慮しなかった。このことはさらに実施例12で述べる。

40

50

【0158】

実際に、濃度を有意に増加させた場合でも、200 nMで2種のマウス抗体は本発明のIgG形態の抗HLA-DR抗体フラグメントに比べ、有意に高い死滅効率を示した。マウス抗体に比べ、本発明のIgG形態のヒト抗HLA-DR抗体フラグメントは細胞死滅の全体的な増強を示すのみならず、異なる細胞系の間での死滅効率の変動が少なかった。死滅変動係数は、マウス抗体では62%（平均死滅率% = 49 ± 31 % (SD)）を超えるのに比べ、本実施例におけるヒト抗体では32%（平均死滅率% = 68 ± 22 % (SD)）であった。この結果は、ロジスティック回帰モデルをlog（平均HLA-DR発現）に対する平均死滅パーセンテージにあてはめた、HLA発現による死滅効率の効果についての統計的調整により裏付けられた（図4）。マウス抗体の至適曲線がヒトの場合に比べ常に低いだけでなく、ヒト抗体データの残差における変動（16%）に比べ、マウス抗体データからの残差にはより大きな変動（SD = 28%）が見られた。

10

【0159】

11. ヒト抗原に対する抗原結合ドメインの活性化細胞対非活性化細胞の死滅選択性

ヒト末梢B細胞を用いて、ヒト抗HLA-DR-mAbを介した細胞死滅が細胞活性化に依存することを示した。ヘパリン化静脈血50 mlをHLA-DRタイプの健康な供与者から採取し、Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc.; 1999)に記載のとおりFicoll-Hypaque Gradient Centrifugation (Histopaque-1077; Sigma)を用いて新鮮な末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。B細胞単離キット及びMACS LS⁺/VS⁺カラム (Miltenyi Biotec, Germany)を用いて、製造者のガイドラインに従い、約 5×10^7 個のPBMCから精製したB細胞（末梢血白血球の約5%）を得た。非B細胞が成功裏に枯渇したことを単離したB細胞（HLA-DR陽性及びCD19陽性）のアリコートのFACS分析により検証した。標準的な手順、例えば、Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc.; 1999)に記載のものを用いて、市販の抗体 (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)で二重染色分析を行った。10% FCS (Biowhitaker Europe, BE)、2 mM L-グルタミン、1%非必須アミノ酸、1 mMピルピン酸ナトリウム及び0.1 mg/mlカナマイシンを添加したRPMI-1640培地 (PAA, Germany)中6%CO₂下37℃で3日間インキュベートすることにより、25倍に希釈したPokeweed マイトジェン (PWM) (Gibco BRL, Cat. No. 15360-019)での刺激により細胞が活性化する能力について単離したB細胞のアリコートを試験した。活性化の成功は、細胞表面上のHLA-DR発現のFACS分析で検証した (Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc.; 1999)。

20

30

【0160】

非活性化細胞に対し、10%の代わりに2.5%の加熱により不活性化したFCSを添加した上記の培地または上記の培地のみにそれぞれ50 nMずつIgG形態のMS-GPC-8-10-57、MS-GPC-8-27-41またはマウスIgG 10F12 (Vidovic et al., 1995b)を加えて上記のように活性化した 1×10^6 個/mlのB細胞をインキュベートし、活性化細胞または非活性化細胞の死滅選択性を示した。6%CO₂下37℃での1時間または4時間のインキュベートの後、生存細胞のフルオロセインジアセテート染色 (FDA) 及び死細胞のヨウ化プロピジウム染色 (PI)を行い、蛍光顕微鏡 (Leica, Germany)を用いて標準的な手順 (Current Protocols in Immunology, 1997)により緑 (FDA) 及び赤 (PI)の蛍光発光細胞数を測定し、細胞生存性を測定した。

40

【0161】

50

B細胞の活性化が細胞死滅に必要なことが示された。抗HLA-DR抗体との1時間のインキュベート後の非活性化細胞においては、培地中の生存細胞の数は、MS-GPC-8-10-57(IgG)、MS-GPC-8-27-41(IgG)、10F12及び培地のみの場合について、インキュベート前細胞密度の81%、117%、126%及び96%にそれぞれ対応した。これに対し、インキュベート1時間後の生存活性化B細胞の数は、MS-GPC-8-10-57(IgG)、MS-GPC-8-27-41(IgG)、10F12及び培地のみの場合について、インキュベート前細胞密度の23%、42%、83%及び66%にそれぞれ対応した。4時間のインキュベート後では、MS-GPC-8-10-57(IgG)、MS-GPC-8-27-41(IgG)、10F12及び培地のみの場合について、インキュベート前細胞密度の78%、83%、95%及び97%が非活性化細胞においては生存可能であり、一方、活性化細胞では、細胞密度がMS-GPC-8-10-57(IgG)、MS-GPC-8-27-41(IgG)、10F12及び培地のみの場合について、それぞれインキュベート前細胞密度の23%、24%、53%及び67%に低下した。

【0162】

12. MHH-PreB1細胞系に対する抗HLA抗体フラグメントの死滅活性

表5から明らかなどおり、本発明の架橋抗HLA-DR抗体フラグメントまたはIgGが、HLA-DRを発現する特定の腫瘍細胞系を有意なレベルで容易に死滅させないことがわかった。安定した細胞系として確立しているものの、この培養における細胞が十分に活性化されなかったためという仮説を立てた。そこで、HLA-DR分子の細胞表面上における発現の増加を活性化の指標として、以下のとおりMHH-PreB1細胞系の活性を刺激するための実験を行うことにした。

【0163】

非附着性増殖MHH-PreB1細胞を、10% FCS、2 mM L-グルタミン、1%非必須アミノ酸、1 mMピルビン酸ナトリウム及び1xカナマイシン(すべてGibco BRL及びBio Whittaker)を含むRPMI培地で培養した。アリコート、リポ多糖類(LPS、10 µg/ml)、ガンマインターフェロン(IFN-、Roche、40 ng/ml)及びフィトヘマグルチニン(PHA、5 µg/ml)と1日インキュベートして活性化し、HLA-DR分子の発現を増加させた。HLA-DR分子の細胞表面上の発現を、FITC標識mAb L243(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)を使ったフローサイトメトリーでモニターした。LPS、IFN-及びPHA存在下においてMHH-PreB1を1日インキュベートすることにより、HLA-DR表面密度が2倍に増加した(平均蛍光強度が190から390に変化した)。細胞死滅は、濃度を低くした(2.5%)FCSを含む上記の培地中で4時間行った。非活性化及び活性化細胞の各アリコートで最終抗体濃度3300、550、92、15、2.5、0.42及び0.07 nMを含むIgG形態のMS-GPC-8-27-41及びMS-GPC-8-10-57の濃度系列を採用した。生存細胞は、トリパンブルーの排除により顕微鏡で同定した。非活性化細胞の生存性は採用した最高抗体濃度まで抗体の影響を受けなかったのに対し、活性化MHH-ProB1細胞では、細胞生存性が抗体濃度の増加とともに著しく減少した(図5)。

【0164】

13. ex vivo慢性リンパ性白血病細胞に対するヒト組成の抗HLA-DR IgG抗体の死滅効率

慢性リンパ性白血病(CLL)患者10名から単離され、精製されたB細胞を用いて、本発明のIgG形態の抗HLA-DR抗体フラグメントが、臨床的に関連する細胞を死滅する効能を示すことをex vivoアッセイで示した。標準的な手順(Scandinavian J. of Immunology 1968)に従い、10名の関連のないCLL患者からB細胞を単離し、精製した(試料はProf Hallek, Ludwig Maximilian University, Munichの好意により分譲された

)。2 x 10⁵ 個の細胞を I g G 形態の抗 H L A - D R 抗体フラグメント M S - G P C - 8、M S - G P C - 8 - 10 - 57 または M S - G P C - 8 - 27 - 41 の 100 n M で処理し、実施例 8 及び 9 と同様に 4 時間または 24 時間インキュベートした。抗体で処理する前に C D 40 リガンドを表面上に発現する H e L a 細胞を加えて 3 日間インキュベートして細胞培養の一連の複製を作成し、活性化した (B u h m a n n e t a l . , 1999)。対照としては、マウス I g G 10 F 12 (V i d o v i c e t a l . , 1995 b) を用いるか、全く抗体を用いなかった。各実験について細胞生存性を実施例 12 に記載のように測定した。

【0165】

驚くべきことに、このような多様な患者試料を通じて、本発明の I g G 形態の抗 H L A - D R 抗体フラグメントは、非常に効率的で均一な死滅を示した。わずか 4 時間のみの処理で、3 つすべてのヒト I g G 抗体で細胞生存性が対照に比べ有意に減少した。24 時間後では、細胞の 33 % のみが生存性を維持した (図 6)。B u h m a n n e t a l . (1999) に従い、さらに前記 e x v i v o 細胞を刺激すると、ヒト抗体を加えてわずか 4 時間培養した後でも死滅速度が増加し、すべての患者試料及び本発明の抗体フラグメントに対して平均してわずか 24 % の細胞のみが生存していることがわかった。

【0166】

14. 抗 H L A - D R 抗体フラグメントの E C 50 の測定

H u C A L ライブラリーから選択した抗 H L A - D R 抗体フラグメントの特定の形態の、細胞毒性マウス抗 H L A - D R 抗体に比べて、より高い 50 % 有効濃度 (E C 50) 値が細胞死滅アッセイにおいて示された (表 6)。

【0167】

H u C A L ライブラリーから選択した抗 H L A - D R 抗体フラグメントの E C 50 値を、H L A - D R 陽性細胞系 P r i e s s または L G 2 (E C A C C , S a l i s b u r y , U K) を用いて推定した。加熱により不活性化した 2.5 % F B S (B i o w h i t t a k e r E u r o p e , B E)、2 m M L - グルタミン、1 % 非必須アミノ酸、1 m M ピルビン酸ナトリウム及び 0.1 m g / m l カナマイシンを添加した R P M I - 1640 培地 (P A A , G e r m a n y) 中に、二価の抗 H L A - D R 抗体フラグメントの連続希釈物とともに 2 x 10⁵ 個の細胞を 6 % C O₂ 下 37 °C で 4 時間インキュベートした。F a b 抗体フラグメントの連続希釈物として、適切な濃度の F a b フラグメント及び抗 F L A G - M 2 抗体を予備混合して抗 H L A - D R 抗体フラグメントの二価組成物を生成した。ここに挙げられた濃度は、I g G 及び F a b の E C 50 値が比較できるように二価組成物としての濃度を示す。

【0168】

二価抗体フラグメントとの 6 % C O₂ 下 37 °C で 4 時間インキュベートの後、フルオロセインジアセテート染色を行い、残った生存細胞数を測定することにより (C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , 1997)、細胞生存性を測定した。標準的な統計ソフト (R ; <http://cran.r-project.org>) を用いて、非線形ロジスティック回帰曲線を複製データポイント及び各抗体フラグメントの推定 E C 50 値に当てはめた。

【0169】

抗 F L A G - M 2 抗体を用いて架橋した場合、H u C A L ライブラリーから選択した F a b フラグメントである M S - G P C - 1、M S - G P C - 8 及び M S - G P C - 10 (実施例 4) は、一価フラグメントの濃度として表して 120 n M 未満の E C 50 値を示し、これは抗 F L A G - M 2 標識した二価の架橋 (F a b) ダイマーでは、60 n M の E C 50 値に相当する (図 7 a)。抗 F L A G - M 2 抗体を用いて架橋した場合、C D R 3 領域内での親和性について最適化した抗 H L A - D R 抗体フラグメント (実施例 4) は、50 n M 未満のさらに向上した E C 50 値、すなわち二価の架橋フラグメントでは 25 n M を示し (図 7 b)、C D R 1 領域内の親和性についてさらに最適化したものは 30 n M (二価フラグメントでは 15 n M) 未満の E C 50 値を示した。これに対し、細胞毒

性マウス抗HLA-DR抗体8D1 (Vidovic & Toral, 1998) 及びL243 (Vidovic et al, 1995b) は、同じアッセイ中でそれぞれ30 nM及び40 nMを超えるEC50値を示した(図7c)。

【0170】

驚くべきことに、マウス抗体に比べ、本発明のIgG形態の特定の抗体フラグメントは、約1.5のオーダーの大きさでEC50値が向上した(図7d)。例えば、IgG形態のMS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41は、それぞれ1.2 nM及び1.2 nMのEC50を示した。さらに、親和性についての最適化を行っていないにもかかわらず、IgG形態のMS-GPC-8は10 nM未満のEC50値を示した。

10

【0171】

実施例11及び12に示したとおり、非活性化細胞(それぞれ正常末梢B細胞及びMHH-PreB細胞)の死滅効率は非常に低かった。50 nMのIgG形態のMS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41で処理後、正常末梢B細胞のそれぞれ78%及び83%が4時間後も生存していた。さらに、いずれかのIgG抗体の濃度が50 nMであるときのみ、実質的に100%の生存性がMHH-PreB1細胞に見られた。実際、50%未満への細胞生存性レベルの低下は、適度な濃度範囲(0.1~300 nM)のIgGまたは二価の架橋Fab形態の本発明の抗HLA-DR抗体フラグメントを用いた場合、これらの非活性化細胞では達成できなかった。従って、非活性化細胞型のEC50値は、非最適化Fab形態の値(架橋二価フラグメントでは約60 nMのEC50値)よりも少なくとも5倍高いことが推定され、VHCDR3最適化FabのEG50値(架橋二価フラグメントでは約25 nM)並びにIgG形態のMS-GPC-8-10-57(約1.2 nM)及びMS-GPC-8-27-41(約1.2 nM)よりも少なくともそれぞれ10倍及び100倍高いことが推定される。

20

【0172】

15. 細胞死滅のメカニズム

上記の実施例では、活性化細胞を死滅させるためには特定の多価抗HLA-DR抗体フラグメントのみを必要として細胞死が起きることが示された。細胞死を引き起こすには、細胞毒性物質または免疫学的メカニズムをこの他に必要としないため、細胞死は、活性化細胞の生得的な予めプログラムされたメカニズムを介して起こることが示された。アポトーシスのメカニズムは、予めプログラムされた細胞死のプロセスとして広く理解されている。本発明のヒト抗HLA-DR抗体フラグメントに曝露された活性化細胞の死滅メカニズムが、当業者の間で「アポトーシス」として理解されているものとは異なっているということを示唆する、特定の細胞死滅特性が観察されたということは驚くべきことである。例えば、観察した細胞死滅速度は、免疫細胞のアポトーシスに関して報告されている速度より有意に高いようであった。非アポトーシス性メカニズムにより細胞死滅メカニズムが進行したことを示すために2つの実験を行った。

30

【0173】

まず、アネキシン-V-FITC及びヨウ化プロピジウム(PI)染色法を使用して細胞死をアポトーシス性または非アポトーシス性に区別した。すなわちアポトーシスを起こしている細胞、「アポトーシス性細胞」(アネキシン-V陽性/PI陰性)は、壊死性(「死亡」)(アネキシン-V陽性/PI陽性)及び完全に機能する細胞(アネキシン-V陰性/PI陰性)から区別できる。アネキシン-V及びPIアッセイの製造者により推奨される手順を用いて、200 nM抗HLA-DR抗体フラグメントMS-GPC-8を加えるかまたは加えないで、加熱により不活性化した2.5% FCS (Biowhitaker Europe, BE)、2 mM L-グルタミン、1% 非必須アミノ酸、1 mM ビルビン酸ナトリウム及び0.1 mg/ml カナマイシンを添加したRPMI-1640培地(PAA, DE)中で100 nMの架橋抗FLAG-M2-mAbとともに 1×10^6 個/mlのPriess細胞を6% CO₂ 下37°Cでインキュベートした。アポトーシス性細胞培養を対照として得るため、上記の培地中に10 µg/mlのタンパ

40

50

ク質Gで架橋した50 µg/mlのアポトーシス誘導抗CD95-mAb-DX2 (BD Pharmingen, Torrey Pine, CA, USA)とともに 1×10^6 個/mlのPriess細胞を6%CO₂下37℃でインキュベートして、アポトーシスを誘導した。様々なインキュベート時間で(1分間、15分間、60分間、3時間、5時間)、200 µlの試料を採取し、2回洗浄し、製造者のプロトコルに従い、アネキシン-V結合バッファーを用いてアネキシン-V-FITC (BD Pharmingen, Torrey Pine, CA, USA)及びPIで染色した。細胞の各群のアネキシン-V-FITC及びPI染色量を、FACS Calibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)を用いて分析した。

10

【0174】

架橋抗HLA-DR抗体フラグメントによって誘導された細胞死は、抗CD95アポトーシス誘導抗体または抗FLAG-M2-mAbのみとインキュベートした細胞培養のパターンとは有意に異なる細胞死のパターンを示す。抗HLA-DR抗体フラグメント/抗FLAG-M2-mAb処理細胞の死細胞のパーセンテージ(アネキシン-V陽性/PI陽性染色によって測定した)は、抗CD95抗体または対照細胞よりもはるかに早く増加した(図8a)。これに対し、架橋抗HLA-DR抗体フラグメントまたは対照細胞に比べ、抗CD95抗体処理細胞のアポトーシス性細胞のパーセンテージ(アネキシン-V陽性/PI陰性染色により測定)は、より早く増加した(図8b)。

20

【0175】

次に、不可逆性カスパーゼ3阻害剤であるzDEVd-fmk及び広域スペクトルカスパーゼ阻害剤であるzVAD-fmk(ともにBioRad, Munich, DE)を用いて、カスパーゼ活性を阻害した。アポトーシスのメカニズムは、カスパーゼ活性によって特徴付けられ、抗HLA-DR媒介による細胞死にカスパーゼが不必要であるなら、これらのカスパーゼ阻害剤がない場合と比較して、阻害剤の存在下で細胞死を起こす細胞の生存性に変化がないという仮説を立てた。加熱により不活性化された2.5%FCS (Biowhitaker Europe, BE)、2 mM L-グルタミン、1%非必須アミノ酸、1 mMピルビン酸ナトリウム及び0.1 mg/mlカナマイシンを添加したRPMI-1640培地(PAA, DE)中に180 µMから10 mMの範囲の2種のカスパーゼ阻害剤の連続希釈物とともに 2×10^5 個のPriess細胞を6%CO₂下37℃で3時間プレインキュベートした。200 nMのヒト抗HLA-DR抗体フラグメントMS-GPC-8及び100 nMの架橋抗M2-mAbを加えることによりHLA-DR媒介による細胞死を誘導した。抗CD95抗体誘導アポトーシス性細胞培養を阻害剤活性の対照とした(Drenou et al., 1999)。さらに6%CO₂下37℃で4時間及び24時間インキュベートした後、トリパンブルー染色を行い、非染色細胞数を計数することにより細胞生存性を測定した。予測したとおり、抗HLA-DR処理細胞培養の細胞生存性は、カスパーゼ阻害剤の存在により有意に変化せず、一方、抗CD95抗体処理によって誘導した細胞死は、カスパーゼ阻害剤を加えてプレインキュベートした細胞培養で有意に減少した。この結果は、HLA-DR媒介による細胞死が、zDEVd-fmkまたはzVAD-fmkで阻害することができるカスパーゼタンパク質分解酵素とは独立した非アポトーシス性メカニズムに由来するという我々の仮説を支持している。

30

40

【0176】

16. HLA-DR特異抗体を用いたin vivo癌療法

ここでは、ヒト組成の抗原結合ドメインを癌治療のための治療薬として好適に用いることができることを示す。SCID、ヌードまたはRag-1ノックアウトなどの免疫無防備状態のマウスを対象のDR+ヒトリンパ腫または白血病細胞系を接種する。腫瘍細胞の接種量は通常1匹につき 1×10^6 から 1×10^7 個で、試験対象腫瘍ごとに決定し、皮下注射(s.c.)または静脈注射(i.v.)で投与する。マウスは、上記のように作製した本発明のIgG形態のMS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57、MS

50

- G P C - 8 - 2 7 - 4 1 またはその他の抗 H L A - D R 抗体フラグメントで i . v . または s . c で 5 日間 に わた り 1 ~ 2 5 m g / k g の 用 量 で 治 療 し た 。 抗 H L A - D R 治 療 マウ ス 及 び 対 照 未 治 療 マウ ス の 生 存 を 治 療 終 了 後 8 週 間 ま で モ ニ タ ー し た 。 s . c . 接 種 マウ ス に お け る 腫 瘍 の 進 行 を 、 腫 瘍 表 面 積 を 測 定 す る こ と に よ っ て さ ら に 定 量 し た 。 8 0 % ま で の 抗 H L A - D R 治 療 マウ ス に 有 意 な 生 存 延 長 が 実 験 中 に 見 ら れ 、 実 験 終 了 時 に 5 0 % ま で の マウ ス 生 存 が 見 ら れ た 。 s . c . 接 種 か つ 未 治 療 マウ ス で は 、 腫 瘍 の 表 面 積 が 2 ~ 3 c m ² に 達 し て い た が 、 抗 H L A - D R 治 療 し た 動 物 の 腫 瘍 表 面 積 は 有 意 に 小 さ か っ た 。

【 0 1 7 7 】

1 7 . I L - 2 分 泌 減 少 に よ り 測 定 し た 抗 H L A - D R 抗 体 フ ラ グ メ ン ト の 免 疫 抑 制

不 死 化 T 細 胞 か ら の I L - 2 分 泌 を 測 定 す る ア ッ セ イ に お い て 本 発 明 の 抗 H L A - D R 抗 体 フ ラ グ メ ン ト は 実 質 的 な 免 疫 調 節 性 を 示 し た 。 こ の ア ッ セ イ で I g G 形 態 の 抗 体 フ ラ グ メ ン ト で あ る M S - G P C - 8 - 6 - 1 3 、 M S - G P C - 8 - 1 0 - 5 7 及 び M S - G P C - 8 - 2 7 - 4 1 は ナ ノ モ ル 未 満 の レ ベ ル の I C 5 0 値 と 実 質 的 に 1 0 0 % の 最 大 阻 害 率 で 非 常 に 強 い 免 疫 抑 制 性 を 示 し た (図 9 a) 。 驚 く べ き こ と に 、 本 発 明 の 抗 体 フ ラ グ メ ン ト の 一 価 組 成 物 で す ら 同 じ ア ッ セ イ で 、 I L - 2 分 泌 を 強 く 阻 害 す る こ と が で き た 。 例 え ば 、 F a b 形 態 の V H C D R 3 選 択 抗 体 フ ラ グ メ ン ト 及 び V L C D R 3 / V L C D R 1 最 適 化 抗 体 フ ラ グ メ ン ト は 、 低 い 一 価 の ナ ノ モ ル レ ベ ル の I C 5 0 値 及 び ほ ぼ 1 0 0 % の 最 大 阻 害 率 を 示 し た (図 9 b) 。 対 照 の I g G 抗 体 及 び F a b フ ラ グ メ ン ト と 比 較 し て 、 本 発 明 の 他 の 一 価 抗 H L A - D R 抗 体 フ ラ グ メ ン ト は 、 該 ア ッ セ イ で 有 意 な 免 疫 抑 制 性 を 示 し た (表 7) 。

【 0 1 7 8 】

抗 H L A - D R 抗 体 フ ラ グ メ ン ト の 免 疫 調 節 性 を 、 半 最 大 量 の 抗 原 刺 激 の 条 件 で D R ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク 抗 原 提 示 細 胞 (A P C) に よ っ て 刺 激 し た ハ イ ブ リ ド ー マ 細 胞 系 T - H y b 1 か ら の I L - 2 分 泌 を 測 定 す る こ と に よ り 検 討 し た 。 O p t i E I A マウ ス I L - 2 キ ャ ッ プ チ ュ ア ン ト 本 体 (P h a r m i n g e n , T o r r e y P i n e , C A , U S A) に よ る 標 準 的 E L I S A 法 に よ っ て I L - 2 分 泌 を 検 出 し 測 定 し た 。 A P C は 、 標 準 的 手 順 に 従 っ て 非 免 疫 化 キ メ ラ 0 4 0 1 - I E ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク マウ ス の 脾 臓 か ら 単 離 し た (I t o e t a l . , 1 9 9 6) 。 1.5×10^5 個 の A P C を 、 1 0 % F C S 、 2 m M L - グ ル タ ミ ン 、 1 % 非 必 須 ア ミ ノ 酸 、 1 m M ピ ル ピ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 及 び 0 . 1 g / l カ ナ マ イ シ ン (す べ て G i b c o B R L 及 び P A A) を 含 む R P M I 培 地 に 、 9 6 穴 プ レ ー ト の 0 . 2 m l ウ ェ ル 中 で 加 え た 。 鶏 卵 の オ ボ ア ル ブ ミ ン を 最 終 濃 度 2 0 0 μ g / m l で 加 え 、 上 記 の 培 地 を 最 終 容 量 1 0 0 μ l と し 、 細 胞 を こ の 抗 原 と 6 % C O ₂ 下 3 7 ° C で 3 0 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 抗 H L A - D R 抗 体 フ ラ グ メ ン ト を さ ま ざ ま な 濃 度 (一 般 的 に は 0 . 1 ~ 2 0 0 n M の 範 圍) で 各 ウ ェ ル に 加 え 、 プ レ ー ト を 6 % C O ₂ 下 3 7 ° C で 1 時 間 イ ン キュベートし、上記培地に 2×10^5 個 の T - H y b - 1 細 胞 を 加 え 、 最 終 容 量 2 0 0 μ l と し た 。 2 4 時 間 の イ ン キュベート後、上清 1 0 0 μ l を I L - 2 C a p t u r e A n t i b o d y (B D P h a r m i n g e n , T o r r e y P i n e , C A , U S A) を 予 め 塗 布 し た E L I S A プ レ ー ト (N u n c - I m m u n o P l a t e M a x i S o r p s u r f a c e , N u n c , R o s k i l d e , U K) に 移 し 、 O p t i E I A M o u s e I L - 2 キ ャ ッ プ チ ュ ア ン ト 本 体 を 用 い て 製 造 者 の 指 示 に 従 い I L - 2 量 を 定 量 し 、 V i c t o r V リ ー ダ ー (W a l l a c , F i n l a n d) を 用 い て プ レ ー ト を 読 ん だ 。 分 泌 さ れ た I L - 2 (p g / m l) を キ ャ ッ プ チ ュ ア ン ト 本 体 に 含 ま れ る I L - 2 標 準 を 用 い て 較 正 し た 。

【 0 1 7 9 】

T 細 胞 ハ イ ブ リ ド ー マ 系 T - H y b 1 を 、 胸 腺 腫 系 B W - 5 1 4 7 (A T C C) の T 細 胞 レ セ プ タ ー 陰 性 変 異 株 及 び 鶏 卵 の オ ボ ア ル ブ ミ ン で 予 め 免 疫 化 し た キ メ ラ 0 4 0 1 - I E ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク マウ ス か ら の リ ン パ 節 細 胞 の 融 合 に よ り 確 立 し た (I t o e t a l . , 1 9 9 6) 。 ク ロ ー ン T - H y b 1 が 抗 原 特 異 刺 激 に 反 応 し て I L - 2 を 多 く 分 泌 し た た め 、 こ れ を ア ッ セ イ の た め に 選 択 し た 。

10

20

30

40

50

【0180】

18. T細胞増殖により測定したHLA-DR特異抗体を用いた免疫抑制

抗HLA-DR抗体フラグメントの免疫調節性がT細胞増殖を測定する第2アッセイを使用して確認された。IgG形態のMS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41のT細胞増殖阻害のIC50値は、それぞれ11 nM及び20 nMであった(図10)。抗HLA-DR抗体フラグメントを、以下のとおり試験し、RA関連ペプチド結合部位とのキメラマウス-ヒトクラスIIトランスジェーンをもつマウスの抗原感作リンパ節細胞に対する増殖T細胞の反応を阻害し、マウスクラスII分子を欠損させた(Muller et al., 1990; Woods et al., 1994; Current Protocols in Immunology, Vol. 2, 7.21; Ito et al., 1996)。ここでは、免疫化は*in vivo*で行われているが、阻害及び読み出しは*ex vivo*である。RA関連分子の結合部位を有するMHCクラスII分子DRB*0401を発現するトランスジェニックマウスは従前に作出した(Ito et al., 1996)。これらのマウスは、マウスMHCクラスIIを欠損し、従ってすべてのTh反応は単一のヒトRA関連MHCクラスII分子を介している(Ito et al., 1996)。これらのトランスジェニックマウスは、ヒトクラスIIアンタゴニストを試験するためのモデルとなる。

10

【0181】

鶏卵のオボアルブミンによって予め免疫したキメラ0401-IEトランスジェニックマウス(Taconic, USA)のリンパ節から単離したキメラT細胞及び抗原提示細胞を用いて測定したT細胞増殖について、抗HLQ-DR抗体フラグメント及びそのIgG形態の阻害効果を標準的手順に従って試験した(Ito et al., 1996)。 1.5×10^5 個の細胞を、オボアルブミン(ウェルにつき30 µg、半最大刺激濃度)及び試験対象の抗HLA-DR抗体フラグメントまたはIgG形態の連続希釈物(0.1 nM~200 nM)の存在下、96-穴組織培養プレートの0.2 mlのウェルで、2 mM L-グルタミン及び0.1 g/lカナマイシンを含む無血清HL-1培地を加えて3日間インキュベートした。培養の最後の16時間の間に³H-メチルチミジン(1 µCi/ウェル)の取り込みにより抗原特異的な増殖を測定する(Falcioni et al., 1999)。細胞を回収し、シンチレーションカウンターを用いて³Hの取り込みを測定する(TopCount, Wallac, Finland)。抗HLI DR抗体フラグメント及びIgG形態での処理におけるT細胞増殖の阻害は、抗原を含む対照ウェルとの比較により観察してもよい。

20

30

【0182】

19. 癌治療に有用なポリペプチドの選択

最も適切なタンパク質/ペプチドを選択してさらに実験を行い、癌治療のための治療用組成物への使用の適性を試験するために、さらにデータを収集する。各IgG形態の抗HLA抗原抗体フラグメントのこのようなデータとしては、結合親和性、複数の腫瘍細胞系のパネルについてのEC50値で測定される*in vitro*死滅効率及び細胞毒性、*in vitro*で推定される最大細胞死滅率、並びに*in vivo*動物モデルから得られる腫瘍減少データ及びマウス生存データが挙げられる。

40

【0183】

最も高い親和性、最も低い死滅EC50値、最も高い最大細胞死滅率及び各腫瘍細胞系について最も広く、最良の腫瘍減少データ及び/または最良のマウス生存データを示したIgG形態の抗HLA抗原抗体フラグメントを選択してさらに実験することができる。このような実験としては、例えば、動物における治療プロファイリング及び毒性学並びにヒトにおけるフェーズI臨床試験を挙げることができる。

【0184】

20. 免疫系疾患の治療に有用なポリペプチドの選択

最も適切なタンパク質/ペプチドを選択してさらに実験を行い、免疫系疾患治療のための治療用組成物への使用の適性を試験するために、さらにデータを収集する。一価抗体フラ

50

グメントまたはI g G形態の抗H L A抗原抗体フラグメントに関するこのようなデータには、親和性、反応性、特異性、I L - 2分泌及びT細胞増殖の阻害についてのI C 5 0値、またはE C 5 0値で測定されるi n v i t r o死滅効率及びi n v i t r o及び移植拒絶及び移植片対宿主病のD Rトランスジェニックモデルで推定される最大細胞死滅率が挙げられる。

【 0 1 8 5 】

最も低いE C 5 0値、最も高い親和性、最も高い死滅、最良の特異性及び/またはT細胞増殖もしくはI L - 2分泌の最大阻害、並びに適切なモデルにおける移植拒絶及び/または移植片対宿主病の阻害に高い効能を示す、抗体フラグメントまたはI g G形態の抗H L A抗原抗体フラグメントを選択してさらに実験することができる。このような実験としては、例えば、動物における治療プロファイリング及び毒性学並びにヒトにおけるフェーズI臨床試験を挙げることができる。

10

【 0 1 8 6 】

【 表 1 】

表1: HLA-DR 特異的ポリペプチドの VH 及び VL ファミリー、VL CDR1 及び VH/VL CDR3 配列

クローン	VH	CDR3 長さ	VH-CDR3-配列	VL	VL-CDR1-配列	CDR3 長さ	VL-CDR3-配列	ファミリー
MS-GPC-1	H2	10	QYGHRRGGFDH	λ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDFNES	H2 λ 1
MS-GPC2	H6	19	SHNKKWRFYNLY SLYDFDF	κ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQESGFPY	H6 κ 3
MS-GPC3	H1B	7	LSTRMDP	κ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQDDNFPI	H1B κ 3
MS-GPC4	H2	16	YYVYSVGYGVTHY DDV	κ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQDYSYPS	H2 κ 3
MS-GPC5	H1A	6	HSFFDY	λ 3		9	QSYDNVDIS	H1A λ 3
MS-GPC-6	H3	9	GYGRYSPDL	K3	RASQSVSSSYLA	8	QQYSNLPF	H3 K 3
MS-GPC7	H2	13	SQNGFYGGNLDI	λ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSRDPSNV	H2 λ 1
MS-GPC-8	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDMPQA	H2 λ 1
MS-GPC-10	H2	10	QLHYRGGFDL	λ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDLTMG	H2 λ 1
MS-GPC11	H2	10	SQGYRGGLDV	λ 1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDYGII	H2 λ 1

MS-GPC14	H3	12	SSMPMYGEGFDL	λ3		10	QSYDFGVSHS	H3λ3
MS-GPC15	H3	10	FYSHVLAMDN	λ3		10	QSRDIHIHNE	H3λ3
MS-GPC16	H6	8	TQLYFYDY	κ2		8	QQYNSYPR	H6κ2
MS-GPC-8-1	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDFSHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-9	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDIQLH	H2 λ 1
MS-GPC-8-10	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDLIRH	H2 λ 1
MS-GPC-8-17	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDFSVY	H2 λ 1
MS-GPC-8-18	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDFSII	H2 λ 1
MS-GPC-8-27	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIGSNYVS	8	QSYDMNVH	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-2	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIGSNYVH	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-19	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIGSNYVA	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-27	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSDSNIGANYVT	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-45	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSEPNIIGSNYVF	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-13	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIGANYVT	8	QSYDYDHY	H2 λ 1
MS-GPC-8-6-47	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIGSNYVS	8	QSYDYDHY	H2 λ 1

MS-GPC-8-10-57	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNNNYVQ	8	QSYDLIRH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-7	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNNNYVG	8	QSYDMNVH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-10	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNANYVN	8	QSYDMNVH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-41	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNNNYVQ	8	QSYDMNVH	H2 λ 1

10

20

30

40

【 0 1 8 7 】

【 表 2 】

表 2 :

抗体最適化の ステップ	Fab	$k_{on} [s^{-1}M^{-1}] \times 10^5$ +/- SD	$k_{off} [s^{-1}] \times 10^3$ +/- SD	$K_D [nM]$ +/- SD	L-CDR3	L-CDR1
親 Fab	MS-GPC-8	0.99 ± 0.40	29.0 ± 8.40	$346.1 \pm 140.5^a)$	QSYDMPOA	SGSSSNIGSNYSVS
L-CDR3-最適化	-8-1	1.93	20.9	$108^e)$		
L-CDR3-最適化	-8-6	0.96 ± 0.14	5.48 ± 0.73	$58.6 \pm 11.7^b)$		
L-CDR3-最適化	-8-9	1.85	16.6	$90.1^e)$		
L-CDR3-最適化	-8-10	nd	$7.0^e)$	nd		
L-CDR3-最適化	-8-17	1.0	5.48	$54.7^e)$		
L-CDR3-最適化	-8-18	1.06	8.3	$78.3^e)$		
L-CDR3-最適化	-8-27	nd	$6.6^e)$	nd		
L-CDR3-最適化	-8-6	0.96 ± 0.14	5.48 ± 0.73	$58.6 \pm 11.7^b)$	QSYDYDHY	SGSSSNIGSNYSVS
L-CDR3+1-最適化	-8-6-2	1.23 ± 0.11	0.94 ± 0.07	$7.61 \pm 0.25^c)$	QSYDYDHY	SGSESNIIGSNYSVH
L-CDR3+1-最適化	-8-6-19	1.10 ± 0.08	0.96 ± 0.15	$8.74 \pm 1.33^c)$	QSYDYDHY	SGSESNIIGSNYSVA
L-CDR3+1-最適化	-8-6-27	1.80 ± 0.24	1.10 ± 0.15	$6.30 \pm 0.63^d)$	QSYDYDHY	SGSDSNIGANYSVT
L-CDR3+1-最適化	-8-6-45	1.20 ± 0.07	1.03 ± 0.04	$8.63 \pm 0.61^c)$	QSYDYDHY	SGSEPNIGSNYSVF
L-CDR3+1-最適化	-8-6-13	1.90 ± 0.26	0.55 ± 0.05	$2.96 \pm 0.46^c)$	QSYDYDHY	SGSESNIIGANYSVT
L-CDR3+1-最適化	-8-6-47	1.97 ± 0.29	0.62 ± 0.04	$3.18 \pm 0.33^c)$	QSYDYDHY	SGSESNIIGSNYSVS
L-CDR3+1-最適化	-8-10-57	1.65 ± 0.21	0.44 ± 0.06	$2.67 \pm 0.25^c)$	QSYDLIRH	SGSESNIIGNYSVQ
L-CDR3+1-最適化	-8-27-7	1.74 ± 0.21	0.57 ± 0.07	$3.30 \pm 0.34^d)$	QSYDMNVH	SGSESNIIGNYSVG
L-CDR3+1-最適化	-8-27-10	1.76 ± 0.21	0.53 ± 0.05	$3.01 \pm 0.21^c)$	QSYDMNVH	SGSESNIIGANYSVN

L-CDR3+1-最適化	-8-27-41	1.67 ± 0.16	0.49 ± 0.03	2.93 ± 0.27 ^{d)}	QSYDMNVH	SGSESIGNNYYVQ
--------------	----------	-------------	-------------	---------------------------	----------	---------------

- a) MS-GPC-8 の親和性データは 8 つの異なる Fab 調製物に基づくものでありこれらは 4 つの異なるチップ上で測定した (2 x 500, 1000 および 4000 RU)。
- b) MS-GPC-8-6 については、3 つの異なるチップ (500, 4000, 3000 RU) 上で測定された 3 つの異なる調製物の平均及び標準偏差を示す。
- c) 3000 RU MHCII を CM5 チップ上に固定した。各測定について、1 μM から 16 nM の 7 種の異なる濃度で表面に注入した。解離時間: 150 秒、6 μl 10 mM グリシン、pH2.3 及びその後の 8 μl 7.5 mM NaOH により再生を得た。MS-GPC-8-6-19 については、4 つの異なる調製物の平均及び標準偏差を示し、他のすべてのバインダーについては 3 つの異なる調製物の平均及び標準偏差を示す。
- d) 1 つのタンパク質調製物を 3 つの異なるチップ (3000, 2800 および 6500 RU) 上で測定する。
- e) 4000 RU 濃度チップ上での成熟 MHCII の親和性測定。単回測定、分子量はサイズ排除クロマトグラフィーの後に測定し、45~48 kDa の間の正しい分子量を有する 100% のモノマーと判明した。

【 0 1 8 8 】
【 排 3 】

10

20

30

40

表 3 a

Fab から構築された、選択された IgG4 モノクローナル抗体の親和性。
誤差は標準偏差を示す。

バインダー (IgG ₄)	$k_{on} [M^{-1} s^{-1}] \times 10^5$	$k_{off} [s^{-1}] \times 10^{-5}$	$K_D [nM]$
MS-GPC-8-27-41	1.1 ± 0.2	3.1 ± 0.4	0.31 ± 0.06
MS-GPC-8-6-13	0.7 ± 0.1	3 ± 1	0.5 ± 0.2
MS-GPC-8-10-57	0.7 ± 0.2	4 ± 1	0.6 ± 0.2

10

表 3 b

CDR3 重鎖最適化後の CDR1 軽鎖最適化の親和性 成熟化から得たバインダーの親和性。
誤差は標準偏差を示す。

バインダー (F _{ab})	$k_{on} [M^{-1} s^{-1}] \times 10^5$	$k_{off} [s^{-1}] \times 10^{-3}$	$K_D [nM]$
MS-GPC-8-6-2	1.2 ± 0.1	0.94 ± 0.07	7.6 ± 0.3
MS-GPC-8-6-19	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2	9 ± 1
MS-GPC-8-6-27	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.2	6.3 ± 0.6
MS-GPC-8-6-45	1.20 ± 0.07	1.03 ± 0.04	8.6 ± 0.6
MS-GPC-8-6-13	1.9 ± 0.3	0.55 ± 0.05	3.0 ± 0.5
MS-GPC-8-6-47	2.0 ± 0.3	0.62 ± 0.04	3.2 ± 0.3
MS-GPC-8-10-57	1.7 ± 0.2	0.44 ± 0.06	2.7 ± 0.3
MS-GPC-8-27-7	1.7 ± 0.2	0.57 ± 0.07	3.3 ± 0.3
MS-GPC-8-27-10	1.8 ± 0.2	0.53 ± 0.05	3.0 ± 0.2
MS-GPC-8-27-41	1.7 ± 0.2	0.49 ± 0.03	2.9 ± 0.3

20

30

表 3 c

CDR3 軽鎖最適化による GPC8 の親和性 成熟化から得たバインダー

バインダー (F _{ab})	k _{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] x10 ⁵	k _{off} [s ⁻¹] x10 ⁻³	K _D [nM]
MS-GPC 8-18	1.06	8.3	78.3
MS-GPC 8-9	1.85	16.6	90.1
MS-GPC 8-1	1.93	20.9	108
MS-GPC 8-17	1.0	5.48	54.7
MS-GPC-8-6 ^{a)}	1.2 +/- 0.1	5.5 +/- 0.7	8 +/- 12

チップ密度 4000 RU MHCII

a) MS-GPC-8-6 については、3 種の異なるチップ (500、4000、3000 RU) 上での 3 種の異なる調製物の平均及び標準偏差を示す。

10

表 3 d

scFv 形態及びその変換 Fab における HuCAL から得たバインダー

バインダー	scFv			F _{ab}		
	k _{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] x10 ⁵	k _{off} [s ⁻¹] x10 ⁻³	K _D [nM]	k _{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] x10 ⁵	k _{off} [s ⁻¹] x10 ⁻³	K _D [nM]
MS-GPC 1	0.413	61	1500	0.639	53	820
MS-GPC 3	0.445	530	11800			
MS-GPC 4	0.55	550	10000			
MS-GPC 6	0.435	200	4600	0.135	114	8470 (1 curve)
MS-GPC 7	0.312	254	8140	0.783	190	2410
MS-GPC 8	0.114	76	560	0.99 +/- 0.40	29.0 +/- 8.4	346 ^{a)} +/- 141
MS-GPC 10	0.187	180	9625	0.22	63	2860
MS-GPC 11	0.384	100	2500	0.361	65	1800

チップ密度 500RU MHCII

a) MS-GPC-8 の親和性 データは、4 種の異なるチップ (2 x 500、1000、4000 RU) 上の 8 種の異なる Fab 調製物に基づくものであり、標準偏差とともに示す。

20

30

40

【 0 1 8 9 】

【 表 4 】

表 4

架橋抗-HLA-DR 抗体断片との細胞の4時間のインキュベーションの後の死滅効率及び
24時間のインキュベーションの後の最大死滅

架橋 Fab 断片	GRANTA に対する死滅効率	Priess に対する最大死滅
MS-GPC-1	+	+
MS-GPC-6	+	+
MS-GPC-8	+	+
MS-GPC-10	+	+
MS-GPC-8-6	++	++
MS-GPC-8-17	++	++
MS-GPC-8-6-13	+++	+++
MS-GPC-8-10-57	+++	+++
MS-GPC-8-27-41	+++	+++

10

20

【 0 1 9 0 】

【 表 5 】

表 5

マウス抗-III A-DR 抗体と比較した、リンパ系腫瘍細胞系のパネルに対するヒト組成の抗-HLA-DR IgG 抗体の死滅効率

名称	DR 種類	細胞系	HLA-DR 発現 平均 FL	mAb による死滅%		ヒト mAbs				
				マウス mAbs		MS-GPC-8	8-27-41	8-10-57	8-6-13	
				L243	8D1					
LG-2	1,1	種類	L243	L243	8D1	MS-GPC-8	8-27-41	8-10-57	8-6-13	
Priess	4,4	B-リンパ芽球	458	79	85	86	87	88	82	
ARH-77	12	B-リンパ芽球	621	87	83	85	88	93	74	
GRANTA-519	2,11	B-リンパ芽球	301	88	73	84	85	88	87	
KARPAS-422	2,4	B細胞非ホジキン	1465	83	56	76	78	78	73	
KARPAS-299	1,2	B細胞非ホジキン	186	25	32	51	66	68	71	
DOHH-2	1,2	T細胞非ホジキン	919	78	25	81	82	79	76	
SR-786	1,2	B細胞リンパ腫	444	29	23	58	59	60	53	
MHH-CALL-4	1,2	T細胞リンパ腫	142	3	8	1	53	44	26	
MN-60	10,13	B-A L L	348	35	41	43	63	46	43	
BJAB	12,13	B-A L L	1120	46	22	71	69	66	67	
RAJI	10, 17	パーキットリンパ腫	338	53	59	49	71	67	64	
L-428	12	パーキットリンパ腫	617	69	64	81	84	86	83	
HDLM-2		ホジキンリンパ腫	244	82	81	82	91	91	92	
		ホジキンリンパ腫	326	77	73	89	88	84	90	

HD-MY-Z		ホジキンリンパ腫	79	35	39	49	69	57	72
KM-H2		ホジキンリンパ腫	619	81	56	75	86	88	87
L1236		ホジキンリンパ腫	41	52	62	44	63	66	66
BONNA-12		ヘアリーセル白血病	2431	92	91	91	92	91	86
HC-1		ヘアリーセル白血病	372	88	89	89	93	86	93
NALM-1	1,4	CML	1078	44	4	83	82	78	65
L-363		形質細胞白血病	49	6	5	26	26	24	19
EOL-1		AML (好酸球)	536	22	13	36	69	49	53
LP-1		多発性骨髄腫	315	12	0	61	73	70	73
RPMI-8226		多発性骨髄腫	19	6	0	14	29	26	19
MHH-PREB-1		B細胞非ホジキン	175	3	3	2	4	8	11
MHH-CALL-2		B細胞前駆白血病	+	5	5				
OPM-2		多発性骨髄腫	3	13	0	8	1	4	5
KASUMI-1		AML	5	0	0	8	10	10	6
HL-60		AML	3	18	0	3	15	9	22
LAMA-84		CML	7	7	9	5	11	5	7

死滅%: 100 - (37°Cで200 nM マウスまたは50 nM ヒト mAbでの4時間の処理後の生存細胞の%)

【 0 1 9 1 】

【 表 6 】

表 6

リンパ性腫瘍細胞に対する細胞死滅アッセイにおける本発明の抗-HLA-DR 抗体断片の EC50 値。全ての EC50 は、二価の物質 (IgG または 架橋 Fab) の nM 濃度で示し、架橋 Fab 及び IgG 形態の値を比較できるようにした。

抗体断片	形態	試験細胞系	二価物質の細胞死滅の EC50 (nM) ± SE
MS-GPC-1	Fab	PRIESS	54 ± 14
MS-GPC-8	Fab	PRIESS	31 ± 9
MS-GPC-10	Fab	PRIESS	33 ± 5
MS-GPC-8-17	Fab	PRIESS	16 ± 4
MS-GPC-8-6-2	Fab	PRIESS	8 ± 2
MS-GPC-8-10-57	Fab	LG2	7.2
MS-GPC-8-27-41	Fab	LG2	7.2
MS-GPC-8-27-41	Fab	PRIESS	7.7
MS-GPC-8	IgG4	PRIESS	8.3
MS-GPC-8-27-41	IgG4	PRIESS	1.1 ± 0.1
MS-GPC-8-10-57	IgG4	PRIESS	1.1 ± 0.2
MS-GPC-8-27-41	IgG4	LG2	1.23 ± 0.2
MS-GPC-8-10-57	IgG4	LG2	1.0 ± 0.1
8D1	mIgG	PRIESS	33
L243	mIgG	PRIESS	47

10

20

30

【 0 1 9 2 】

【 表 7 】

表 7

T-Hyb 1 細胞の抗原特異的刺激後の IL-2 分泌を測定するアッセイにおける本発明の抗-HLA-DR 抗体断片の IC50 値。IgG 形態 (二価) についての IC50 はモル濃度で示し、比較を容易にするため、Fab 形態 (一価) の IC50 は Fab の濃度の半分で示し IgG 形態と直接比較できるようにした。

抗-HLA-DR 抗体断片	形態	IC50		最大阻害 (%)
		(IgG/nM) ((Fab)/2/nM)		
		平均	SE	
MS-GPC-8-10-57	IgG	0.31	0.01	100
MS-GPC-8-27-41	IgG	0.28	0.07	100
MS-GPC-8-6-13	IgG	0.42	0.06	100
MS-GPC-8-6-2	IgG	3.6	1.1	100
MS-GPC-8-6	IgG	6.7	2.0	100
MS-GPC-8	IgG	11.0	0.8	100
MS-GPC-8-6-2	Fab	4.7	1.9	100
MS-GPC-8-6-13	Fab	2.1	0.8	100
MS-GPC-8-6-19	Fab	5.3	0.2	100
MS-GPC-8-10-57	Fab	2.9	1.0	100
MS-GPC-8-6-27	Fab	3.0	1.2	100
MS-GPC-8-6-47	Fab	2.6	0.6	100
MS-GPC-8-27-7	Fab	5.9	2.2	100
MS-GPC-8-27-10	Fab	7.3	1.9	100
MS-GPC-8-27-41	Fab	3.6	0.7	100
MS-GPC-8-6	Fab	20		100
MS-GPC-8	Fab	110		100

10

20

30

【 0 1 9 3 】

参考文献

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1998) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, U.S.A.

Babbitt B, Allen PM, Matsueda G, Habe E, Unanue ER, (1985), Nature 317:359.

Baxevanis, C.N., Wernet, D., Nagy, Z.A., Maurer, P.H., and Klein, J. (1980). Immunogenetics, 11, 617.

Billing, R., and Chatterjee, S. (1983). Transplant. Proc. 15, 649.

10

Bird, R.E. et al. Single-chain antigen-binding proteins [published erratum appears in Science 1989 Apr 28;244(4903):409]. Science 242, 423-6 (1988).

Bonagura, V.R., Ma, a., McDowell, J., Lewison, A., King, D.W. and Suci-Foca, N. (1987). Cell. Immunolo., 108(2), 356.

Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S., Lee, B. & Pastan, I. (1993). A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7538-7542.

20

Brown JH, Jardetsky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC., (1993), Nature 364: 33.

Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M., (1999) Blood 93: 1992

Current Protocols in Immunology, Vol. 2, 7.21.

Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, Fauchet R, Charron DJ, Mooney NA., (1999), J. Immunol. 163: 4115.

Falcioni et al. (1999). Nat Biotechnol. 17: 562-567.

30

Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1990). A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. Biochemistry 29, 1362-1367.

Gorga J.C., Foran, J., Burakoff, S.J., Strominger, J.L., (1984) Meth Emzym., 108, 607-613.

Gorga, J.C., Horejsi, V., Johnson, D.R., Raghupathy, R., Strominger, J.L., J.Biol. Chem. 262 (1987)16087-94.

Gorga, J.C., Knudsen, P.J., Foran, J.A., Strominger, J.L., Burakoff, S.J., (1986), Cell. Immunol. 103 160-73.

40

- Heiskanen T, Lundkvist A, Soliymani R, Koivunen E, Vaheri A, Lankinen H (1999) *Virology*, 262(2), 321.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L. & Conlon, P.J. (1988), *Bio/Technology* 6, 1204-1210.
- Huston, J.S. et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5879-83 (1988). 10
- Ito K, Bian H.-J, Molina M, Han J, Magram J, Saar E, Belunis C, Bolin DR, Arceo R, Campbell R, Falcioni F, Vidovic' D, Nagy ZA., (1996), *J. Exp. Med.* 183: 2635-2644.
- Jones et al., (1986), *Nature* 321: 522-525.
- Jonker, M., Schellekens, P.T., Harpprecht, J., and Slingerland, W. (1991), *Transplant. Proc.*, 23, 264.
- Jonker, M., van Lambalgen, R., Mitchell, D.J., Durham, S.K., and Steinman, L. (1988), *Autoimmunity*, 1, 399. 20
- Kahoury E.L. and Marshall L.A., (1990) *Cell. Tissue Res.*, 262(2):217-24
- Kashmiri S.V., Iwahashi, M., Tamura., Padlan, E.A., Milenic, D.E. & Sclom, J (2001) *Crit Rev Oncol Hematol.* 38: 3-16.
- Klohe EP, Watts R, Bahl M, Alber C, Yu W-Y, Anderson R, Silver J, Gregersen PK, Karr RK., (1988), *J. Immunol.* 141: 2158-2164.
- Knappik, A. & Plückthun, A., (1994), *Biotechniques* 17, 754-761.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess A., Wölle, J., Plückthun, A. and Virnekäs, B., (2000), *J. Mol. Biol.* 296, 55. 30
- Kozak, M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 947.
- Kuby, J. *Immunology:1994*, 2nd edition.
- McMichael, S.J., Sasazuki, T., McDevitt, H.O., and Payne, R.O., (1977), *Arthritis Rheum.*, 20, 1037.
- Muller et al., (1990), *J. Immunol.*, 145: 4006. 40
- Nagy, Z & Vidovic, D. (1996) WO9617874.
- Naquet, P., Marchetto, S., and Pierres, M., (1983), *Immunogenetics*, 18, 559.
- Nepom, G.T., Benacerraf, B., and Germain, R.N., (1981), *J. Immunol.*, 127, 31.

- Nepom, G.T., Byers, P., Seyfried, C., Healey, L.A., Wilske, K.R., Stage, D., and Nepom, B.S., (1989), *Arthritis Rheum.*, 32,15.
- Ohta, N., Nishimura, Y.K., Tanimoto, K., Horiuchi, Y., Abe, C., Shiokawa, Y., Abe, T., Katigari, M., Yoshiki, T., and Sasazuki, T., (1982), *Hum. Immunol.*, 5, 123.
- Otten et al (1997) pp 5.4.1 - 5.4.19 in *Current Protocols in Immunology*, Eds. Coligan et al. Green & Wiley, New York.
- Pack, P. and Plückthun, A., (1992), *Biochemistry* 31, 1579-1584. 10
- Pack, P., (1994), Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Riesenberger D. and Plückthun, A. (1993), *Bio/Technology* 11, 1271-1277.
- Pichla, S.L., Murali, R. & Burnett, R.M (1997) *J Struct Biol.* 119: 6-16.
- Presta, (1992), *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596.
- Riechmann et al., (1988), *Nature* 332: 323-329.
- Rheinhecker, M., Hardt, C., Ilag, L.L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Plückthun, A. and Pack, P., (1996), *J. Immunol.* 157, 2989. 20
- Rosenbaum, J.T., Adelman, N.E., and McDevitt, H.O., (1983), *J. Exp. Med.*, 154, 1694.
- Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed.
- Schiff, B., Mizrahi, Y., Orgad, S., Yaron, M., and Gazit, I., (1982), *Ann. Rheum. Dis.*, 41, 403.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (1993). *Prot. Engineering* 6, 109-122. 30
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (1994). *J. Chromatogr. A* 676, 337-345.
- Schmidt, T. G. M. et al. (1996). *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.
- Skerra, A. and Plückthun, A. (1988). *Science* 240, 1038.
- Slavin-Chiorini, D.C., Kashmiri, S.V., Milenic, D.E., Poole, D.J., Bernono, E., Schlom, J. & Hand, P.H (1997) *Cancer Biother Radiopharm* 12: 305-316.
- Smith, R.M., Morgan, A., and Wraith, D.C. (1994). *Immunology*, 83, 1.
- Stasny, P. (1978). *N. Engl. J. Med.*, 298, 869. 40
- Stausbøl-Grøn, B., Wind, T., Kjær, S., Kahns, L., Hansen, N.J.V., Kristensen, P. and Clark, B.F.C. (1996) *FEBS Lett.* 391, 71.

Stern, A.S: and Podlaski, F.J, (1993) Techniques in Protein Chemistry IV, Academic Press Inc., San Diego, CA.

Stevens, H.P., Roche, N., Hovius, S.E., and Jonker, M., (1990), Transplant. Proc., 22, 1783.

Tiwari, J., and Terasaki, P., (1985), HLA and disease association. (New York: Springer Verlag).

Vidovic D, Falcioni F, Bolin DR, Nagy ZA., (1995a), Eur. J. Immunol., 25: 1326. 10

Vidovic D, Falcioni F, Siklodi B, Belunis CJ, Bolin DR, Ito K, Nagy ZA., (1995b), Eur J. Immunol., 25:3349.

Vidovic D, & Toral, J. (1998) Cancer Letters 128: 127-135.

Virnekás, B., Ge, L., Plukthun, A., Schneider, K.C., Wellenhofer, G. & Moroney, S.E. (1994) Nucleic Acids Res 22 : 5600-5607.

Vose, J.M., Colcher, D., Gobar, L., Bierman, P.J., Augustine, S., Tempero, M., Lechner, P., Lynch, J.C., Goldenberg, D. & Armitage, J.O. (2000) Leuk Lymphoma 38 : 91-101. 20

Voss, S. & Skerra, A. (1997). Protein Eng. 10, 975-982.

Waldor, M.K., Sriram, S., McDevitt, H.O., and Steinman, L. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2713.

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. Annu. Rev. Immunol. 12, 433.

Woods et al., (1994), J Exp Med. 180: 173-81. 30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

a . 抗 H I A - D R 抗体フラグメントの特異性 : M S - G P C - 8 - 2 7 - 7、M S - G P C - 8 - 2 7 - 1 0、M S - G P C - 8 - 6 - 1 3、M S - G P C - 8 - 2 7 - 4 1、M S - G P C - 8 - 6 - 4 7、M S - G P C - 8 - 1 0 - 5 7、M 5 - G P C - 8 - 6 - 2 7、M S - G P C - 8 及び M S - G P C - 8 - 6 の、H L A - D R タンパク質、陰性対照タンパク質 (B S A、テストステロン - B S A、リゾチーム及びヒトアポトランスフェリン)、及び空のマイクロタイタープレートウェル (プラスチック) への結合。特異性は標準的な E L I S A 法を使用して評価した。 40

b . H u C A L ライブラリーから単離された抗 H L A - D R 抗体フラグメント (M S - G P C - 1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 及び 16) の、H L A - D R タンパク質、マウス - ヒトキメラ H L A タンパク質及び陰性対照タンパク質 (リゾチーム、トランスフェリン、B S A 及びヒト - グロブリン) に対する特異性。特異性は標準的な E L I S A 法を使用して評価した。関係のない抗体フラグメント (i r r . s c F v) を対照として使用した。

【図 2】

抗 H L A - D R 抗体フラグメント (M S - G P C - 1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 及び 16)、ならびに M S - G P C - 8、M S - G P C - 8 - 1 0 50

- 57、MS-GPC-8-27-41及びMS-GPC-8-6-17のIgG形態の、MHCクラスII分子を発現する種々の細胞系に対する反応性。標準的な免疫蛍光法を使用して検出された抗HLA-DR抗体フラグメントまたはIgGと特定の細胞系との間の反応性に関し、「+」は強い反応性を表し、「+/-」は弱い反応性を表し、「-」は反応性が検出されなかったことを示す。

【図3】

トリパンブルー染色により評価された、1価または架橋抗HLA-DR抗体フラグメントの存在下での癌細胞の生存性。GRANTA-519細胞の生存性は、架橋剤としての抗FLAG M2 mAbの存在下または非存在下で抗HLA-DR抗体フラグメント(MS-GPC-1、6、8及び10)と4時間インキュベートした後に評価した。

10

【図4】

マウス抗体の200 nM溶液による処理と比較して改善された、IgG形態の本発明のヒト抗体フラグメントの50 nM溶液処理の死滅効率を示す表5のデータの散布図及び至適ロジスティック曲線。白丸はマウス抗体L243及び8D1で処理された細胞系のデータを表し、黒丸はヒト抗体MS-GPC-8、MS-GPC-8-27-41、MS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-6-13で処理された細胞系のデータを表す。ヒト(実線)及びマウス(破線)mAb細胞死滅データの至適ロジスティック曲線は、マウスmAbでは200 nMの最終濃度で処理されたにもかかわらず、それに対して50 nMでのヒトmAbによる処理が全体的に優れていることを示している。

【図5】

活性化及び非活性化細胞の死滅。MHH-PREB-1細胞は、リポ多糖、インターフェロン- γ 及びフィトヘマグルチニンで活性化し、その後抗HLA-DR抗体フラグメントMS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41のIgG形態の0.07~3300 nMとともに4時間インキュベートした。対照の非活性化MHH-PREB-1細胞においては生存性は失われていない。

20

【図6】

患者から単離したCLL細胞に対する、対照(抗体なし、非細胞毒性マウスIgG 10 F12:ライトグレー)、及び抗HLA-DR抗体フラグメントのヒト(MS-GPC-8、MS-GPC-8-10-57及びMS-GPC-8-27-41:ダークグレー)のIgG形態の死滅効率。左図は、4時間(h4)及び24時間(h24)のインキュベート後の抗体に対する、10人の患者から得た休止期細胞培養物からの生存性データのボックスプロットを示す。右図は、4時間(h4)及び24時間(h24)のインキュベート後の抗体に対する、6人の患者から得た活性化細胞培養物からの生存性データのボックスプロットを示す。

30

【図7】

本発明の特定の抗HLA-DR抗体フラグメントについての濃度依存的な細胞生存性。縦軸は、抗体フラグメントのそれぞれについて得られたレプリカデータについてのロジスティック非線形回帰により算定されたEC50値を示す。

a) 架橋二価抗HLA-DR抗体F(ab)フラグメントダイマーMS-GPC10(、実線)、MS-GPC-8(、破線)、及びMS-GPC-1(+、点線)の死滅曲線。

40

b) 架橋二価抗HLA-DR抗体F(ab)フラグメントダイマーMS-GPC-8-17(、実線)、マウスIgG 8D1(、破線)、及びL243(+、点線)の死滅曲線。

c) 架橋二価抗HLA-DR抗体F(ab)フラグメントダイマーGPC-8-6-2(、破線)、マウスIgG 8D1(、実線)、及びL243(+、点線)の死滅曲線。

d) ヒト抗HLA-DR抗体フラグメントMS-GPC-8-10-57(+、点線)、MS-GPC-8-27-41(x、一点鎖線)、マウスIgG 8D1(、実線)、及びL243(、破線)の死滅曲線。濃度はすべて二価の物質(IgGまたは架橋F(

50

a b) ダイマー) の n M で表す。

【図 8】

a. Priess 細胞を、抗 FLAG M2 mAb を使用して架橋した抗 HLA - DR 抗体フラグメント MS - GPC - 8 とインキュベートすると、抗 CD95 mAb を使用してアポトーシスに誘導された Priess 細胞の培養よりも迅速な細胞死滅が見られる。アネキシン V / PI 染色法において、アネキシン V 陽性及び PI 陽性染色によって壊死細胞が識別される。 b. Priess 細胞を、抗 FLAG M2 mAb を使用して架橋した抗 HLA - DR 抗体フラグメント MS - GPC - 8 とインキュベートすると、抗 CD95 mAb を使用して誘導された Priess 細胞のアポトーシス性培養と比較してアポトーシスのメカニズムを示す証拠はほとんど認められない。アネキシン V / PI 染色法において、アネキシン V 陽性及び PI 陰性染色によってアポトーシス細胞が識別される。

10

【図 9】

a. T - ハイブリドーマ細胞からの IL - 2 分泌の阻害を測定するアッセイを使用した、抗 HLA - DR 抗体フラグメント、MS - GPC - 8 - 10 - 57、MS - GPC - 8 - 27 - 41 及び MS - GPC - 8 - 6 - 13 の IgG 形態の免疫抑制性。

b. T - ハイブリドーマ細胞からの IL - 2 分泌の阻害を測定するアッセイを使用した、抗 HLA - DR 抗体フラグメント、MS - GPC - 8 - 27 - 41 及び MS - GPC - 8 - 6 - 19 の一価 Fab 形態の免疫抑制性。

IgG 形態 (二価) の濃度はモル濃度として表すが、Fab 形態 (一価) の濃度は、IgG 形態の濃度と直接比較することができるように、Fab 形態の濃度の半分として表す。

20

【図 10】

T 細胞増殖の阻害を測定するアッセイにおける、抗 HLA - DR 抗体フラグメント MS - GPC - 8 - 10 - 57 及び MS - GPC - 8 - 27 - 41 の IgG 形態の免疫抑制性。

【図 11】

s c F v ファージディスプレイベクター pMORPH13 __ s c F v のベクターマップ及び配列。

ベクター pMORPH13 __ s c F v は、繊維状ファージの遺伝子 III タンパク質の C - 末端ドメインと HuCAL s c F v との融合物をコードする遺伝子を含むファージミドベクターである。図 11 には、モデル s c F v 遺伝子 (VH1A 及び VH3 の組合せ (Knappik et al., 2000) を含むベクターを示す。

30

元の HuCAL マスター遺伝子 (Knappik et al., 2000、その中の図 3 を参照) は、それらの本来の N - 末端、第 1 のアミノ酸として Q (= CAG) を有する VH1A、VH1B、VH2、VH4 及び VH6 から構築された。VH3 及び VH5 は第 1 のアミノ酸として E (= GAA) を有する。ベクター pMORPH13 __ s c F v は、VH 鎖に融合した短い FLAG ペプチド配列 (DYKD) を含み、従ってこのベクター中の、そしてそれから直接誘導される HuCAL VH 鎖はいずれも最初の位置に E (= GAA) を有する (例えば、pMx7 __ FS ベクターにおいて、図 12 を参照)。

【図 12】

s c F v 発現ベクター pMx7 __ FS __ 5D2 のベクターマップ及び配列。

40

発現ベクター pMx7 __ FS __ 5D2 は、VH - CH1 が FLAG タグ (Hopp et al., 1988; Knappik and Pluckthun, 1994) と STREP タグ II (WSHPQFEK) (IBA GmbH, Göttingen, Germany, Schmidt and Skerra, 1993; Schmidt and Skerra, 1994; Schmidt et al., 1996; Voss and Skerra, 1997 参照) との組合せに融合される場合、HuCAL s c F v フラグメント (図 12 では、ベクターが「5D2」と呼ばれる「ダミーの」抗体フラグメントをコードする遺伝子を含む) の発現を導く。

【図 13】

Fab 発現ベクター pMx9 __ Fab __ GPC8 のベクターマップ及び配列。

50

発現ベクター pMx9__Fab__GPC8 は、VH-CH1 が FLAG タグ (Hopp et al., 1988; Knappik and Pluckthun, 1994) と STREP タグ II (WSHPQFEK) (IBA GmbH, Goettingen, Germany、Schmidt and Skerra, 1993; Schmidt and Skerra, 1994; Schmidt et al., 1996; Voss and Skerra, 1997 参照) との組合せに融合される場合、HuCAL Fab フラグメント (図 13 では、ベクターが Fab フラグメント MS-GPC8 を含む) の発現を導く。

pMx9__Fab ベクターにおいては、scFv フラグメントからクローン化された HuCAL Fab フラグメント (図 11 の図面の説明を参照) は、VH 鎖に融合した短い FLAG ペプチド配列 (DYKD) を有しておらず、このベクター中の、そしてそれから直接誘導される HuCAL VH 鎖はいずれも最初の位置に Q (= CAG) を有する。

10

【図 14】

Fab ファージディスプレイベクター pMORPH18__Fab__GPC8 のベクターマップ及び配列。

ベクター pMORPH18 の誘导体は、繊維状ファージの遺伝子 III タンパク質の C-末端ドメインと HuCAL 抗体の VH-CH1 鎖との融合物をコードする遺伝子を含むファージミドベクターである。さらにこのベクターは別にコードされる VL-CL 鎖を含む。図 14 には、Fab フラグメント MS-GPC-8 を含むベクターを示す。

pMORPH18__Fab ベクターにおいては、scFv フラグメントからクローン化された HuCAL Fab フラグメント (図 11 の図面の説明を参照) は、VH 鎖に融合した短い FLAG ペプチド配列 (DYKD) を有しておらず、このベクター中の、そしてそれから直接誘導される HuCAL VH 鎖はいずれも最初の位置に Q (= CAG) を有する。

20

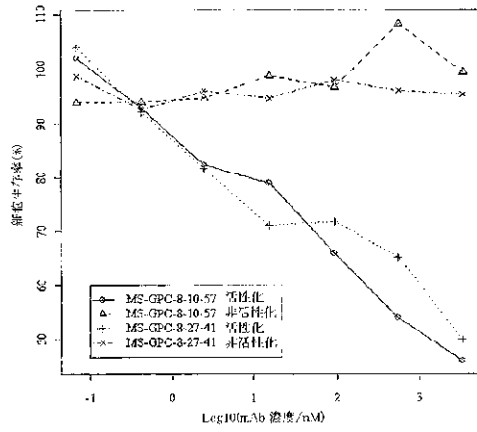
【図 15】

MS-GPC-1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、15 及び 16、ならびに MS-GPC-8-6、MS-GPC-8-10、MS-GPC-8-17、MS-GPC-8-27、MS-GPC-8-6-13、MSGPC-8-10-57 及び MS-GPC-8-27-41 の VH 及び VL ドメインのアミノ酸配列。

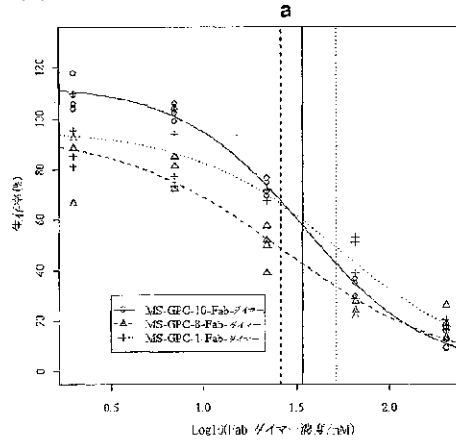
図 15 中の配列は、元の HuCAL マスター遺伝子 (Knappik et al., 2000、その中の図 3 参照) 中で構築される VH のアミノ酸 1 を示す。本明細書に記載したように、scFv 構築物中、VH のアミノ酸 1 は常に E であり (図 11 の図面の説明を参照)、また本明細書に記載したように、Fab 構築物中、VH のアミノ酸 1 は常に Q である (図 13 の図面の説明を参照)。

30

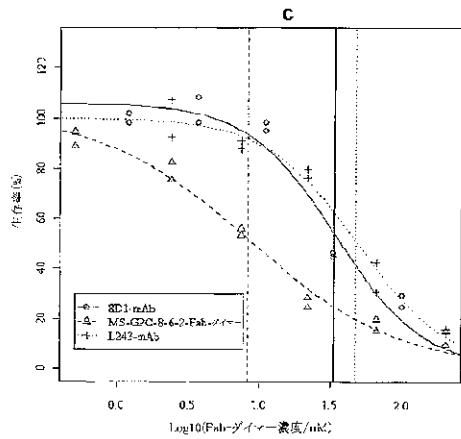
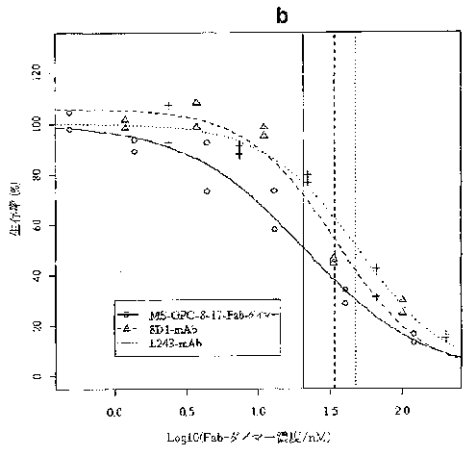
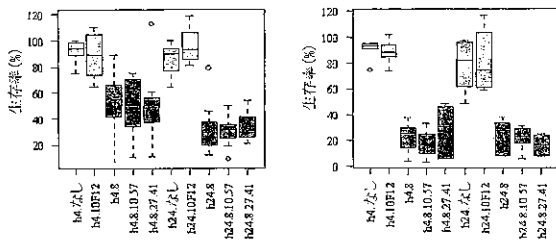
【 図 5 】



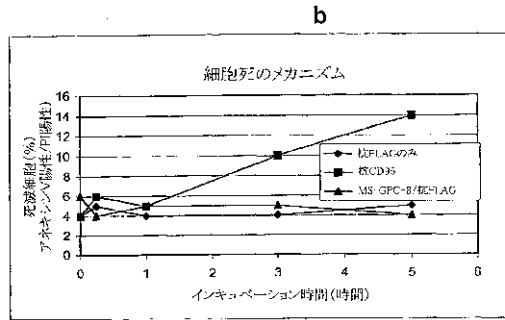
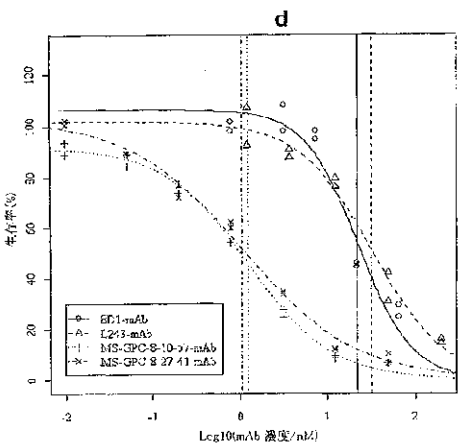
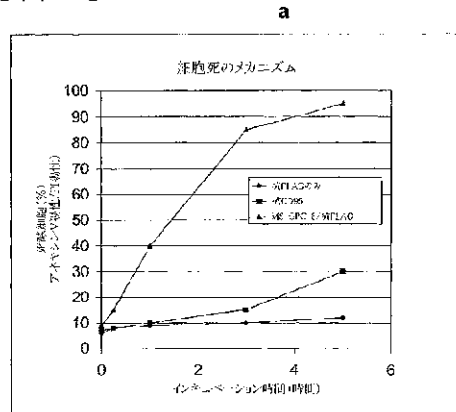
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



ACGGCCACCA CCAAGGCTAT AGCTTGACTG GGTCGGCGGA AGTCACTGCG

SexaI

551 TTGCACCAGS TCAGACCAGC GGTATCTCGT GTAGCGGCGA TGGCTTGGGC
AAGCTGGTCC AGCTGCGGCG GCATAGAGCA CATCGCGGCT ACGCGACCCG

KpnI

SmaI

Aac65I

AvaI

601 GATAAATACG CGAGCTGSGTA CCAGCGAAA CCGCGGCGAG CGCCACTTCT
CTATTTATGC GCTGACCAT GGTCTGCTTT GGGCCCTCC GCGTCAAGA

Bsu36I

651 GGTGATTTAT GATGATTCG ACCGTCCCTC AGGCATCCCG GAACGCTTTA
CCACTAAATA CTACTAGAC TGGCAGGGAG TCCGTAGGGC CTTGCGAAAT

BamHI

701 GCGGATCCAA CAGCGGCAAC ACCGCGACCC TGACCATTAG CGGCACTCAG
CGCTTAGGTT GTCCGCGTGG TGGCGTGGG ACTGTAATC GCCGTGAGTC

BpuAI

BbsI

751 GCGGAGACG AAGCGGATTA TTATTGCCAG AGCTATGACG CTCATATGCG
CGCCTCTGCG TTCGCTTAAT AATAAGGTC TCGATACCTG GAGTATACGC

HpaI

MscI

EcoRI

801 TCCGTGTTTT GCGCGGCGCA CGAAGTTAAC CGTCTTGGC CAGGAATTCG
AGGACACAAA CCGCCCGCGT GCTTCAATTG GCAAGAACCG GTCCCTAAGC

851 AGCAGAAGCT GATCTCTGAG GAGGATCTGA ACTAGGGTGG TGGCTCTGTT
TCGTCTCGA CTAGAGACTC CTCCTAGACT TGATCCACCC ACCGAGACCA

901 TCCGGTGATT TTGATTATGA AAAGMTGGCA AAGCGTAATA AGGGGCGTAT
AGGCCACTAA AACTAATACT TTCTACCGT TTGCGATTAT TCCCCCGATA
qIIIseq9 100.0%

951 GACCGAAAAA CGCGATGAAA ACGCGCTACA GTCTGACGCT AAAGGCAAAC
CTGGCTTTTA CGGCTACTTT TCGCGGATGT CAGACTGCGA TTTCCGTTTG

ClaI

1001 TTGATTCGT CGCTACTGAT TACGGTCTG CTATCGATGG TTTCATGGT
AACTAAGACA CGGATGACTA ATGCCACGAC GATAGCTACC AAAGTAACCA

1051 GACGTTTCCG CCCTTGCTAA TGGTAATGTT GCTACTGGTG ATTTTGTGCG
CTGCAAGGCG CGGAACGATT ACCATTACCA CGATGACCAC TAAAACGACC

2001 CAGAGGTGEC GAAACCCGAC AGCACTATAA AGATACCAGG CGTTCCCCCC
GTCCTCACCC CTTTGGGCGT TCCGTGATTT TCTATGGTCC GCNAAAGGGG

2051 TGAAGCTCC CCGCTGGGCT CTCCGTTCC GACCCCTGCG CTTACCGGAT
ACCTTCGAGG GAGCACAGCA GAGGACAGG CTGGGACCGG GATGGCGCTA

2101 ACCTGTCCCG CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA
TGGACAGGCG GAAAGAGGGA AGCCCTTCCG ACCCGGAAAG AGTATCGAGT

2151 CCGTGTAGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG
CGCATCTCCA TAGAGTCAAG CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCCGAC

ApaI

2201 TGTGACGAA CCCCCTGTC AGTCCGACCG CTGCGGCTTA TCCGTAACCT
ACACGTGCTT GGGGGGCAAG TCAGGCTGGC GAOGCGGART AGGCCAATGA

2251 ATCGCTTGA GTCCAAACCCG GTAAGACAGG ACTTATCGCC ACTGSCACCA
TAGCAGAACT CAGGTTGGGC CATCTCTGCG TGAATAGCGG TGACCGTGGT

2301 GCCACTGCTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGAGGCG GTGCTACAGA
CGGTGACCAT TGTCTTATTC GTCTCGCTCC ATACATCCCG CAGATGTCCT

2351 GTTCTGTAAG TGGTGGCCCTA ACTAGGCTCA CACTAGAAGA ACAGTATTTG
CAGGAACCTC ACCACCGGAT TGATGCCGAT GTGATCTTCT TGTCAFAAAC

2401 GTATCTGCGC TGTGCTGTAG CCAAGTACCT TCGGAAAAAG AGTTGTGAGC
CTAGAGCGCG AGACGACATC GGTCAATGGA AGCCTTTTTC TCAACCATCG

2451 TCTTGTATCC GCAACAACAC CACCGTGGT AGCGGGTGGT TTTTGTGTTG
AGAAGTACCG CGTTTGTGTT GTGGCGACCA TCGCCACCAA AAAAAACAAAC

2501 CAGACGACAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCCTTGA
GTTCGTCGTC TAATGCGCGT CTTTPTTTC TAGAGTCTCT CTAGGAAACT

2551 TCTTTTCTAC GGGCTCTGAC GCTCAGTGA ACGAAAACCT ACGTAAAGGG
AGAAAAGATG CCCCAGACTG CGAGTCACTT TGCTTTTGAG TGCATTCCTC

2601 ATTTTGTGTA GATCTAGCAC CAGGCGTTTA AGGGACCAA TAACTGCTTT
TAAAACCACT CTAGATCGTG GTCCGCAAT TCCCGTGGT ATTGACGGAA

2651 AAAAAAATTA CCCCCCGCC TGGCACTCAT CCGAGTACTG TTGTAATICA
TTTTTTTAA TCGGGGCGGG ACGGTGAGTA CGGTCAATGAC AACATTAGT

2701 TTAGCATTC TCCGACATG GAAGCCATCA CAAACCGCAT GATGAACCTG
AATTCGTAAG ACGGCTGTAC CTTGCGTAGT GTTTGCGGTA CTACTTGGAC

2751 AATCGCCAGC GGCATCAGCA CTTTGTCCCG TTGCGTAAFA TATTGCCCCA
TTAGCGGTGC CCGTGTGCTG GAACCGCGG AACCCATATT AAAAAAGGAT

2801 TGTGTAAAC GGGGGCGAAG AAGTTCTCCA TATTGGCTAC GTTTAAATCA
ATCACTTTG CCCCCTCTTC TTCAACAGT ATAACCGATG CAAATTTACT

2851 AACTGTGTA AACTCACCA GGGATGGCT GAGACGAAA ACATATTTCT
TTGACCACT TTGAGTGGT CCGTACCGCA CTCTGCTTT TGIATAAGAG

1101 CTCTAATTC CAAATGGCTC AGTCGGTGA CGGTGATAAT TCACCTTAA
GAGATTAAGG GTTACCGGAG TTCAGCCACT GCCACTATTA AGTGGAAAT

1151 TGAATAATTT CCGTCAATAT TTACCTTCCC TCCCTCAACT GGTGAAATGT
ACTTATTAAG GGCAGTTATA AATGGAAGGG AGGAGTATAG CCAACTTACA

1201 CGCCCTTTTG TCTTTGGGCG TGGTAAACCA TATGAATTTT CTATTGATGT
CGCGGAAAAC AGAAACCGCG ACCATTGTGT ATACTTAAAA GATFACATAAC

1251 TGACAAATA AACTTATTCG GTGGTGTCTT TGGCTTTCTT TTATATGTTG
ACTGTTTTAT TTGAATAGG CACCACAGAA ACGCAAGAAA AATATACAAAC

1301 CCACCTTTAT GTATGTATTT TCTACGTTTG CTACCAACT CTGTAATAAG
GGTGGAAATA CATACATAAA AGATGCAAAC GATTGTATGA CGCATTTATC

HindIII

1351 GAGTCTTGAT AGCTTGACC TGTGAAGTGA AAAATGGCGC AGATTGTGCG
CTCAGAACTA TTCGACTGAG ACACCTTCACT TTTTACCGCG TCTAACACCG
CGII13 100.0%

1401 ACATTTTTTT TGTCTGCGCT TTAATGAAAT TGTAAACCGT AATATTTGT
TGTAAAAAAA ACAGAAGGCA AATTACTTTA ACATTTGCAA ATATAAACA

1451 TAAAATTCGC GTTAAATTTT TGTAAATCA GCTCATTTTT TAACCAATAG
ATTTAAGCG CAATTAATAA ACAATTTAGT CGAGTAAAAA ATTGTTATC

1501 CCGGAAATCG CCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAAATGA CCGAGATAGG
CGGCTTAGC CTTTTTAGG AATATTTAGT TTCTTATCT

1551 GTTGTGTTT GTTCCAGTTT GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTTG
CAACTCACAA CAGGCTCAA CCTTGTCTC AGGTGATAAT TTCTTGACCC

1601 ACTCCAACGT CAAAGGCGCA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA TGGCCCACTA
TGAGGTTGCA GTTCCCGCT TTTTGGCAGA TAGTCCGCT ACCTGGGAT

1651 CGAGAACCAT CCCCCTAATC AAGTTTTTGG GGTGCGAGGT GCCGTAAAGC
GCTCTTGGTA GTGGGATTAG TTGAAAACAC CCGACGCTCA CGCATTTTC

1701 ACTAAATCGG AACCTAAAG GAGACCCCGC ATTTAGAGCT TGAAGGGGAA
TGATTAGCC TTGGGATTTT CACTGCGGCG CTTCTTATCGA CTGGCCCTT

1751 AGCCGCGCAA CGTGGCGAGA AAGSAAAGGA AGAAAGCCAA AGGAGCGGCG
TGGCGGCTT GCACCGCTCT TTCTTCCCT TCTTTCGCTT TCTGCGCCG

1801 GCTAGGCGCG TGGCAGTGT AGCCGTCAGC CTGCGGCTAA CCAACACAGC
CGATCCCGCG ACCGTTACA TCGCCAGTGC GATCCGCTAT GGTGGTGTGG

1851 CGCCGCGCTT AATGCGCCCG TACAGGCGCG GTCTACSCCA TGTGACAAA
GCGGCGGAA TTACCGCGCG ATGCTCCGCG CAGCATGCTT ACACCTGTTT

1901 AGGCCAGCAA AAGCCAGGA ACCGTAAAA GGCCTGCTG CTGGCCTTTT
TCCGCTGCTT TTCCGCTCT TGGCATTTTT CCGGCGCAAC GACCGCAAA

1951 TCCATAGGCT CCGCCCGCTT GACGAGCATC AAAAAATCG ACCTCAAGT
AGGTATCCGA GCGGGGGGGA CTGCTCGTAG TGTTTTTAGC TGGAGTTCA

2901 AATAAACCTT TTAGGAAAT AGGCGGCTT TCCCGCTAA CAGCGCACAT
TTATTTGGGA AATCCCTTTA TCCGCTCAA AAGTGGCAAT GTGGCTGTA

2951 CTGGCAATA TATGTGTAGA AACTGCGCA TATGCTGTG GTATTCTCT
GAACCTTTAT ATACACATCT TTGAGCGGCT TTAGCAGCAC CTAAGTGTG

3001 CAGAGCGATG AAAACGTTTC AGTTTGTCTA TGGAAAACGG TGTAAACMAG
GTCTGCTAC TTTTGCNAG TCAAAAGAGT ACCTTTTGCC ACATTTGCTC

3051 GTGAACACTA TCCCATATCA CCACTCACCG GTCTTTTATT GCATACGGA
CACTTGTGA AGGSTATAGT GSPCGATGG CAGAAAGTGA CGGTATGCTT

3101 ACTCCGGGTC AGCATTCATC ACGCGGCGAA GAATGTGAAAT AAAGGCGGGA
TGAGACCCAC TCGTAAGTAG TCGCCCGGCT CTTACACTIA TTTCCGCTC

3151 TAAAACCTGT GCTTATTTTT CPTTAGGCTU TTTAAAAAG CCGTAATATC
ATTTTGAACA CGAATAAAA GAATGCGCAC AAATTTTCCC GGCATTATAG

3201 CAGCTGAACG GTCTGTTTAT AGGTACATTT AGCAACTGAC TGAATGCTC
GTGACTTTC CAGACCAATA TCCATGTAAC TCGTACTGCT ACTTATCGGA

3251 CAAAAATGTC TTTACGATGC CATTGGGATA TATCAACGCT GGTATATCCA
GTTTTACAG AAATGCTACG GTAACCTTAT ATAGTTGCCA CCATATAGGT

3301 GTGATTTTT TCTCCATTT AGCTTCTTCT GCTCTGAAA TTCGCGATA
CACTAAAAAA AGAGGTAAAA TCGAAGGAAT CGAGGACTTT TAGAGTATT

3351 CTCAAAAAT ACGCCCGGTA GTGATCTTAT TTCTATGAG TGAAGTGTGG
GAGTTTTTAA TCGGGGCGAT CACTAGAATA AACATATACC ACTTTCNACC

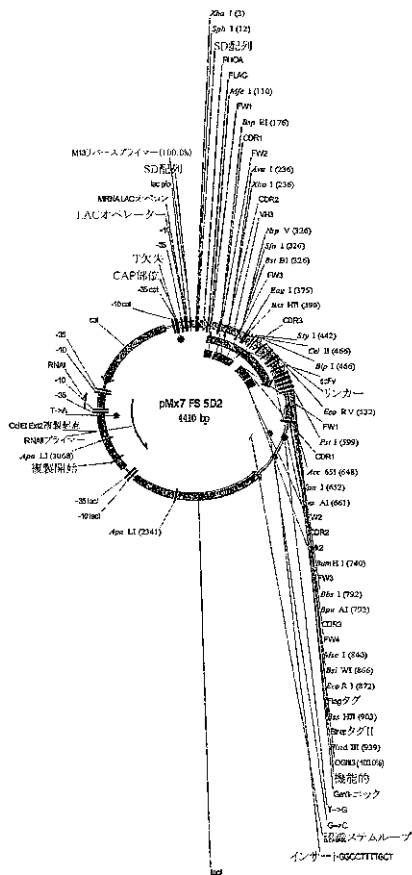
3401 AACCTCACCC GACCTCTAAT CTGAGTATG TCACTCATTA GGCACCCAG
TTGGAGTGG CTGCAATTA CACTCAATCG AGTGAATAT CCGTGGGTC

3451 GCTTACACTT TTATGCTTCC GCTCTGTGTT TTGTTGGGAA TTGTGAGCGG
CGAATGTGA ATACGAAAG CCGAGCTAC AACACACTTT AACACTCGCC

N13 リバースプライマー 100.0% XbaI

3501 ATAAACATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATAC GAATTTCT
TACTGTAAA GTGTGCTCTT TGTCTACTAT GGTACTAATG CTTAAGA

【 図 1 2 】



XbaI SphI
 1 TCTAGAGCAT GCCTAGGAGA AAATAAAATG AAACAAGCA CTATTGCACT
 AGACTCTGTA CGCATCCTCT TTTATTTTAC TTTGTTTGT GATAACGTGA

51 GGCACCTCTTA CCGTTGCTCT TCACCCCTGT TACCAAAGCC GACTACAAAG
 CCGTGAGAAAT GGCAACGAGA AGTGGGGACA ATGGTTTCGG CTGATGTTTC

MfeI
 101 ATGAAGTGCA ATTGGTGGAA AGCGCCGGCG GCCTGGTGA ACCGGGCGGC
 TACTTCACGT TAACCACCTT TCGCCGCCCG CGGACCACGT TGGCCCGCCG

BspEI
 151 AGCCTGCGTC TGAGCTGCGC GGCCTCGGGA TTTACCTTTA GCAGCTATGC
 TCGGACGCAG ACTCGAGCGC CCGGAGGCCT AAATGGAAAT CGTCGATACG

XhoI
 201 GATGAGCTGG GTGCGCCAAG CCCCTGGGAA GGGCTCTGAG TGGGTGAGCG
 CTACTCGACC CACGCGGTTC GGGGACCCCT CCCAGAGCTC ACCCACTTCG

AvaI
 251 CGATTAGCGG TAGCGGCGGC ASCACCTATT ATCCGGATAG CGTGAAGGC
 GCTAATCGCC ATCGCCGCCG TCGTGGATAA TACGCCTATC GCACTTTCCG

BstBI
 SfuI
 NepV
 301 CGTTTTACCA TTTCACGTGA TAATTGCAAA AACACCCCTGT ATCTGCAAAAT
 GCAAAATGGT AAAGTGCACT ATTAAGCTTT TTGTGGGACA TATGCGTTTA

EagI BssHII
 351 GAACAGCCCTG CCGTGGGAAG ATACGGCCGT GTATTATGCG GCGGCTGTTA
 CTTGTGCGAC GCACCCCTTC TATGCGGCA CATATAACG CGCCACAAAT

StyI
 401 AGAAGCATTT TTCTCGTAAG AATTGGTTTG ATTATTGGGG CCAAGGCACC
 TCTTCGTAAA AAGAGCATTC TTAACCAAC TAATAACCCG GGTTCGGTGG

ElpI
 CellII
 451 CTGGTGACGG TTAGCTCAGC GGGTGGCGGT TCTGGCGGCG GTGGAGCGCG
 GACCACTGCC AATCGAGTGC CCCACCGCCA AGACCGCGCC CACCCTCGCC

EcoRV
 501 TGGCGTGGT TCIGCGGCTG GTGGTTCGGA TATCGTGTAT ACCCAGAGCC
 ACCGCCACCA AGACCGCCAC CACCAAGGCT ATAGCACTAC TGGTTCCTGG

PstI
 551 CACTGAGCCT GCCAGTGACT CCGGCGGAGC CTGGGAGCAT TAGCTGCAGA
 GTGACTCGGA CCGTCACTGA GGCCCGCTCG GACGCTCGTA ATCGACCTCT

KpnI
 Acc65I
 601 AGCAGCCAAA GCCTGTGCA TAGCAAGGCG TATRACTATC TGGATTGGTA
 TCGTGGTTTT CCGAGCAGCT ATCGTTCGCG ATATTGATAG ACCTAACCAT

KpnI
 Acc65I SexAI
 651 CCTTCMAAA CCAGGTCAAA GCCCGCGCT ATTAATTTAT CTGGCGGCA
 GGAAGTTTTT GGTCCAGTTT CCGCGCTCGA TAAITRAATA GACCCGCTCT

BamHI
 701 ACCGTGCCAG TGGGTTCCCG GATCGTTTGA GCGGCTCTGG ATCCGGCACC
 TGGCACGCTC ACCCCAGGSC CTAGCAAAAT CCGCAGAGCC TAGGCCGTGG

BpuAI
 BbsI
 751 GAITTTACCC TGAAAATTAG CCGTGTGAA GCTGAAGAGC TGGCGTGTGA
 CTAAATGGG ACTTTTAAAT GGCACACCTT CGACTTCTGC ACCCGCACAT

MscI
 801 TTATTGCCAG CAGCAITATA CCACCCCGCC GACCTTTGGC CAGGGTACGA
 AATAACGCTC GTCGTAAATAT GGTGGGGCGG CTGGAAACCG STCCCATGCT

BsiWI EcoRI
 851 AAGTTGAAAT TAAACGTACG GATTTGCACT ATAAGATGA CGATGACAAA
 TTCAACTTTA ATTTGCATGC CTAAAGCTGA TATTCTACT GCTACTGTTT

BssHII HindIII
 901 GCGCGCCCGT GGAGCCACCC GCGATTGAAA AAATGATAAG CTTGACCTGT
 CCGCGCGGCA CCTCGGTGGG CGTCAAACTT TTTACTATTC GAACGTGGCA
 OGIII3 100.0%
 =====

951 GAAGTGAAA ATGGCGCAGA TGTGCGACA TTTTTTGTG CTGCCGTTTA
 CTTCACTTTT TACCGGTCTT ABCACGCTGT AAAAAAACA GACGGCAAAAT
 OGIII3 100.0%
 =====

1001 ATTAAGGGG GGGGGGGGCC GGCCGGGGG GGGGTGTACA TGAATTTGA
 TAAITTCGCC CCCCCCGCG CCGGACCCCC CCCCACATG ACTTTAAAT

1051 AACGTTAATA TTTTGTAAA ATTCGCTTAA AATTTTGTG AAATCAGCTC
 TTGCAATTAT AAACAATTT TAAGCGCAAT TTAATAACA TTTAGTCGAG

1101 ATTTTTAAC CAATAGCCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG
 TAAAAAATG GTTATCCGCG TTTAGCCGTT TTAGGGAATA TTTAGTTTTC

1151 AATAGACCGA GATAGGGTTG AGTGTGTTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA
 TTATCTGGCT CTATCCCAAC TCACAACAAG GTCAAACTT GTTCTCAGGT

1201 CTATTAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAA GGGGAAAAA CCGTCTATCA
 GATAATTTCT TGCACCTGAG GTTGCAGTTT CCGCTTTTT GGCAGATAGT

1251 GGGCGATGCC CCACTACGAG AACCATCACC CTAATCAAGT TTTTGGGGT
 CCCGCTACCG GGTGATGCTC TTGGTAGTGG GATTAGTTCA AAAAACCCCA

1301 CGAGGTGCGG TAAAGCACTA AATCGAACC CTAAGGGAG CCCCCTATT
 GCTCCACGGC ATTTGTTGAT TTAGCCTTGG GATTTCCTTC GGGGGCTAAA

1351 AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GCGACAGCTG GCGAAGAGG AAGGSAAGAA
 TCTGAAACTG CCCCCTTCG CCGCTTGAC CCGCTTTCC TCCCTTCTT

1401 AGCGAAAGGA CCGGGCCCTA GCGCGCTGSC AACTGTAGCC CTCACGCTGC
 TCGCTTTTCT CCGCCCGGAT CCGCGACCG TCTACATCCG CAGTGGGACG

1451 GCGTAACCAC CACACCCGCC GCGCTTAATG CCGCCCTACA GGGCGGTGC
 CGCATTTGTT GTGTGGGGCG CCGCAATTAC GCGGGATGT CCGCGCACG

1501 TAGACTAGTG TTTAAACCGG ACCGCGGGGG GCTTAAAGTG GGCCTGCAAAA
 ATCTGATCAC AAATTTGGCC TGCCGCCCCC CCGAATTCAC CCGACGTTTT

1551 CAAAACCGCC TCTCTCCAGG AACCGGCTTT TATCGGCTAG CCTCCTGCCC
 GTTTTCCCGG AGGACGCTCC ATAGCCCATC ATAGCCCATC GGAGTGACCG

1601 GCTTTCCAGG TCGGAAACCG TGTCTGCTCA GCTGCTCAG TGAATCGGCG
 GCGAAAGGTC AGCCCTTTGG ACAGACCGGT CACCGTAGTC ACTTAGCCCG

1651 AACGCGCGGG GAGGCGCGGT TTAGCTTTCT GGAGCCAGGG TGTFTTTCT
 TTGCGCGCCC CTCTCCGCCA AACGCTAACC CCTCGGTCCC ACCAAALAGA

1701 TTTCACCGGT GAGACGGGCA ACAGCTGATT GCCCTTCACC GCCTGGCCCT
 AAGTGTCTCA CTCTGCCCTG TGTGACATTA CCGGAAGTGG CCGACCGGGA

1751 GAGGACGTTG CAGCAAGCGG TCCACGCTGG TTTGCCCCAG CAGGCGAAAA
 CTCTCTCACC GTGGTTCCGC AGGTGCGACC AAACGGGGTC GTCCGCTTTT

1801 TCCTGTTTGA TGGTGGTCAG CGCGGGGATA TAACATGAGC TGCTCTCGGT
 AGGACAAACT ACCGACGTCG GCGCGCTCAT ATTGTACTCG ACAGGAGCCA

1851 ATCGTCTGAT CCCACTACCG AGATGTCCCG ACCAACCGCG AGCCCGGACT
 TAGCAGCATA GGGTGAAGCG TCTACAGCGC TGGTTGCGCG TCGGGCCTGA

1901 CGGTAAATGG ACGCATTTGG CCCACGGCCA TCTGATCGTT GGCAACCCAGC
 GCCATTACCG TGCGTAACCG GGTCTCGCGT AGACTAGCAA CCGTTGCTCG

1951 ATCGCAGTGG GAACGATGCC CTCATTGAGC ATTTGCTATG TTTGTTGAAA
 TAGCGTCCAC CTGTCTACGG GAGTAAGTGG TAAACGTACC AAACAACCTT

2001 ACCGACATGG GCATCTCCGT GCGCTTCCCG TCCGCTATC GCTGAAATTT
 TGGCCTGTAC CCGTAGGTCG GCGGAAGGCG AAGGGGATAG CCGACTTAAG

2051 GATTCGCACT GAGTATTTTA TCCAGCCGAG CAGACCGGAG ACCCGCCGAG
 CTACCGCTCA CTCTATAAAT ACCGTCGGTC GGTCTGCGTC TCGCGGCTC

2101 ACAGACTCTA ATGGGCGAGC TACAGCGGCG ATTTGCTGGT GGCCCAATGC
 TGTCTTGAAT TACCCGGTCC ATTTGTCGCG TAACAGCCCA CCGGTTACG

2151 GACCGATGCG TCCAGCCGCA GTCCGCTACG GTCCCTATGG GAGAAATRA
 CTGGTCTACG AGTATKGGGT CACGCTAAGG CAGGAGTACC CTCTTTTAT

2201 TACTGTTGAT GGGTGTCTGG TCAGAGACAT CAGAAATRA CCGCGAACA
 ATGACACATA CCCACAGACC AGTCTCTGTA GTTCTTTAT CCGGCTTGT

2251 TTAGTGCAGG CAGCTTCCAC AGCAATAGCA TCCTGGTCA CCGCGGATA
 AATCAGCTCC GTCCAGAGTG TCGTTATCGT AGGACACGTA GGTCCGCTAT

ApaLI

2301 GTTAATATC AGCCCACTGA CAGCTTCCCG GAGAAGATT TGCACCGCCG
 CATTATTAGC TCGGTTGACT GTCCAGCGCG CACTCTAAC ACCTGGCGGC

2351 CTTTACAGCG TTCCAGCCCG CTTCGTTTCA CCATCGACAC GACCAAGCTG
 GAAAATGCCG AAGCTCCCGC GAAGCAAGAT GGTAGCTCTC CTGGTGCAC

2401 GCACCCAGTT GATCGGGCGG AGATTTAATC GCCCGACAAA TTTGCGACGG
 CGTGGGTCAA CTAGCCCGCG TCTAAATATG CCGCGCTGTT AAACGCTGCG

2451 CCGGTGCAGG GCCAGACTGG AGGTGGCAAT GCCAATCAGC AACGACTGTT
 GCGCACGCTCC CCGTCTGACC TCCACCGCTC CCGTTAGTGG TTGCTGACAA

2501 TGCCCGCCAG TTGTTGTGCC ACGCGGTTAG GAATGTAATT CAGCTCCGCC
 ACGGGCGGTC AACACACCGG TCGGCCAATC CTACATTAAG GTGAGAGCGG

2551 ATCGCGGCTT CCACCTTTTC CCGGTTTTC GCAGAAACGT GGCTGGCGTG
 TAGCGCGGAA GGTGAAAAAG GGGCGAAAA GCTCTTGCA CCGACCGGAC

2601 GTTCACCAGC CCGGAAACGG TCTGATAAGA GACACCGGCA TACTCTGCGA
 CAAGTGTGTC GCCCTTTGCC AGACTATTTCT CTGTGGCGCT ATGAGAGCGT

2651 CATCGTATAA CGTTACTGGT TTCACATCCA CCACCCGTAA TTGACTCTCT
 GTAGCATATT GCAATGACCA AAGTGTAAAT GGTGGGACTT AACTGAGAGA

2701 TCGGGGCGCT ATCATGCGAT ACCCGGAAAG GTTTTGGGCC ATTCGATGCT
 AGGCCCGCGA TAGTACGATA TGGCGCTTTC CAAACCGCGG TAAGTACGCA

2751 AGCCATGTGA CCAAAAGGCC AGCAAAAGCC CAGGAACCGT AAAAAGGCGG
 TCGGTACACT CGTTTTCCGG TCGTTTTCCG GTCTTTGGCA TTTTTCGCGC

2801 CTTTGTCTGG GTTTTCCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACCA GCATCAAAA
 GCACGACCG CAAAAAGGTA TCCGAGCGGG GGGACTGCT CGTAGTGT

2851 AATCGACGCT CAAGTCAGAG CTGCGGAAAC CCGACGACAT TATAAGGATA
 TTAGCTGCGA GTTCAGTCTC CACCGCTTTG GGCTGCTCT ATATTCTAT

2901 CCGAGCGTGT CCCCTTGSAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCT GTTCCGACCC
 GGTCCGAAA GGGGGACCTT CAGGGAGACA CCGAGAGGA CAAGGCTGGG

2951 TCCCGCTTAC CCGATACCTG TCCGCTTTC TCCCTCGGG AAGCGTGGCG
 ACCGCGAATG GCTTATGAC AGCGGAAAG AGGGAAGGCC TTCGACCCCG

3001 CTTTCTCATA GCTCAGCGTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTGCTTGC
 GAAAGAGTAT CAGTGCAGAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC

ApaLI

3051 CTCGAAGCTG GCTGTGTGTC ACGAAACCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG
 GAGGTTGAC CCGACACACG TGCTTGGGG GCAAGTCGGG CTGGCGACCG

3101 CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA
 GGAATAGGCC ATTTGATAGA GAATCACTTC TGGCGCATTC TGTGCTGAAT

3151 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT
 AGCGGTGACC GTGTCGGGT ACCATTGTCC TAATCTCTCT GCTCCATACA

3201 AGGCGGTGCT ACAGAGTCTC TGAAGTGGT GCCTAACTAC GGCTACACTA
 TCCGCCACGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CCGATTGATG CCGATGTGAT

3251 GAAGAACAGT ATTTGGTATC TCGCTCTTGC TGTAGCCAGT TACCTTCGGA
 CTCTTTGTC TAAACCATAG ACGCGAGAGC ACCTCGGCTA ATGGAAGCCT

3301 AAAAGAGTTC GTAGCTCTTG ATCCGCAAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG
 TTTTCTCAAC CATCGAGAAC TAGCCGTTTT GTTTGGTGGC GACCATGCCC

3351 TGTTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC CGCGAGAAAA ABAGGATCTC
 ACCAAAAAAA CAAACGTTCC CGCTCTAATG CCGCTCTTTT TTTCTTAGAG

3401 AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGCT CTGACGCTCA GTGGAACGAA
 TTCTCTTAGG AAATCAGAAA AGATGCCCCA GACTGCGAGT CACTTTGCTT

3451 AACTCAGGTT AAGGGAATTT GGTGAGTCTC AGCACCAGCG GTTTAAGGGC
 TTGAGTGCAA TCCCTTAAAA CCAAGTCTAG TCGTGGTCCG CAAATTTCCCG

3501 ACCAATAACT GCCCTAAAAA AATTAAGCCCG CCGCCTGCCA CTCATCGCAG
 TGGTATATGA CCGAATTTTT TTAATGCGGG CCGGAGCGGT GAGTAGCGTC

3551 TACTGTTGTA ATTCATTAGC CATTCTGCCG ACATGGAAGC CATCAACAA
 ATGACAAAT TAAGTAATTC GTAAGAGCGC TGTACTTCCG GTAGTGTTTG

3601 GGCATGATGA ACCTGAATCG CCGCGGCGAT CAGCACCTTG TCGCCTTGGC
 CCGTACTACT TGAGCTTAGC GGTGCGCGTA GTCGTGGAAC AGCGGAACCG

3651 TATAATATTT GCCCATAGTG AAAACGCGGG CAGAAAGATT GTCCATATTG
 ATATTATAAA CCGGTATCAC TTTTGGCCCC GCTTCTTCAA CAGGTATAAC

3701 GCTACGTTTA ATCAAAAAT GGTGAAACTC ACCCAGGGAT TGGCTGAGAC
 CGATGCAAAT TTAGTTTGA CCACTTTGAG TGGTCCCTA ACCGACTCTG

3751 GAAAAACATA TTCTCAATA ACCCTTTAGG GAATTAGGCC AGSTTTTCC
 CTTTTGTAT AAGACTTAT TGGGAATCC CTTTTCCGG TCCAAAAGTG

3801 CGTAACACGC CACATCTTGC GAATATATGT GTAGAAACTG CCGGAAATCG
 GCATTTGCGG GTGTAGAACG CTATATACA CATCTTIGAC GGCCTTTAGC

3851 TCGTGTATTT CACTCCAGAG CGATGAAAC GTTTCACTTT GCTCATGAAA
 AGCACCATAA GTGAGGTCTC CCACTTTTGG CAAAGTCAA CAGTACTCTT

3901 AACGGTGTAA CAAGGGTAAA CACTATCCCA TATCACCAGC TCACCGTCTT
 TTGCCACATT GTTCCACTTT GGTATAGGTT ATAGTGTGCG AGTGGCAGAA

3951 TCAITGCCAT ACGGAACCTC GGGTGAAGAT TCATCAGGCG GGCAGAAATG
 AGTAAACGGTA TGCCCTGAGG CCACTCTGTA AGTATGTCGG CCGTCTTAC

4001 TGAATAAAGG CCGGATRAAA CTGTGTCTTA TTTTCTTETA CGGTCTTAAA
 ACTTATTTCC GGCTATTTTT GAACACGAAT AAAAAGAAAT GCCAGAAAT

4051 AAAGCGCGTA ATTTCCAGCT GAACGGTCTG GTTATAGGTA CATGAGCAA
 TTTCCGCGAT TATAGGTCGA CTTGCCAGAC CATATCCAT GTAACCTGTT

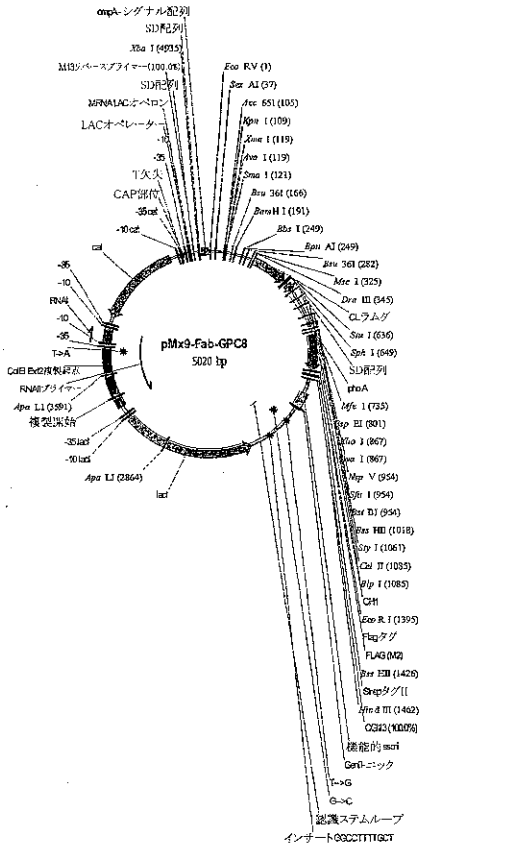
4101 CTGACTGAAA TGCCCTRAAA TGTCTTTTAC GATGCCATTG GATATATACA
 GACTGACTTT ACGGAGTTTT ACAGAAATG CTACGGTAA CCTATATAGT

4151 ACGGTGTGAT ATCCAGTAT TTTTCTTCC ATTTTAGCTT CTTAGCTCC
 TCCACCCATA TAGTCACTA AAAAAGAGG TAAAATCGAA GGAATCGAGG

4201 TGAATATCTC GATTACTCAA AAAAATCGCC CCGTAGTAT CTTATTTCA
 ACTTTTAGAG CTATTGAGTT TTTTATCGGG GCCATCACTA GAATAAAGTA

M13 リバースプライマー 100.0%

【 図 1 3 】



EcoRV	SexAI
1 ATCTGCTGTA CCCAGCCGCC TTCAGTGTAGT GGGCACCAGG GTCAGCGTGT TAGCACGACT GGGTCGGCGG AAGTCACTCA CCGCTGTGTC CAGTCGCACA	
51 GACCATCTCG TGTAGCGGCA GCAGCAGCAA CMTTGGCAGC AACTATGTCGA CTGGTAGAGC ACATCGCCGT GTCGTCGTGT GTACCCTGCG TTGATACACT	
KpnI	XmaI
Acc65I	SmaI
	AvaI
101 GCTGTATCCA GCAGTTGCCC GGGACGGCCG CAAAACCTCT GATTTATGAT CGACCATGGT CGTCAACCGG CCTGCGCGCG CTTTTCAGCA CTAATACTA	
Bsu36I	BamHI
151 AACCAACCAGC GTCCCTCAGG CGTGCCTGGT GATTTTAGCG GATCCAAAAG TTGTTGGTCC CAGGGAGTCC GCAACGCTCA GCAAAATCGC CTAGGTTTTC	
	BpuAI
	BbsI
201 CGGCACCAGC GCGAGCCTTG CGATTACGGG CCTGCBAAGC GAAGACGAAG GCCGTGGTCC GCCTCGGAGC GCTATGTCCT GGACGTTTTC	
	Bsu36I
251 CGGATTATTA TTGCCAGAGC TAIGACATGC CTCAGGCTGT GTTTGGCGGC GCCTAATAAT AACCGTCTCG ATACTGTACG GAGTCCGACA CAAACCSCCG	
	MscI
	DraIII
301 GGCACGAAGT TTAACCGTTC TTGGCCAGCC GAAAGCCGCA CCGAGTGTGA CGTGTCTTCA AATTTGGCAAG AACCGTTCGG CTTTCGGCGT GGCTCACACT	
351 CGCTGTTTCC GCGGAGCAGC GAAGAATTCG AGCGAACAAC AGCGACCTCG GGCACAAGGG CCGCTCGTCC CTTCTTAACG TCCGCTTGTG TCGCTGGGAC	
401 GTGTGCTGTA TTAGCGACTT TTATCCGGGA CCGCTGACAG TGGCCTGGAA CACACGGACT AATCGCTGAA AATAGSCCCT CGGCACTGTC ACCGACCTTC	
451 GGCAGATAGC AGCCCCGTCA AGCGGAGGAT GGAGACCACC ACACCTCCA CCGTCTATCG TCGGGGCACT TCCGCCCTCA CCTCTGTGTG TGTGGGAGGT	
501 AACAAAGCAA CAACAGTAC GCGGCCAGCA GCTATCTGAG CCTGACCGCT TGTGTTGCTT GTTGTTCATG CGCCGCTCGT CGATAGACTC GGACTGCGGA	
551 GAGCAGTGGG AGTCCACAGC AAGCTACAGC TGCCAGGTCA CGCATGAGGG CTCGTCACTT TCAGGGTGTG TTCATGTGCG ACGTCCAGT GCGTACTCCC	
	StuI
	SphI
601 GAGCACCGTG GAAAAACCGC TTGGCCCGAC TGAGGCTGTA TAAGCATGCG CTCGTGGCAC CTTTTTGGCC AACCGCGCTG ACTCCGGACT ATTCGTACGC	
651 TAGGAGAAA TAAATGAAA CAAAGCACTA TTGCACCTGG ACTCTTACCG ATCCTCTTTT ATTTTACTTT GTTTCGTGAT AACGTCAGC TGAGAATGGC	
	MfeI
701 TTGCTCTTCA CCCCTGTAC CAAAGCCAG GTGCAATTGA AAGAAAGCGG AACGAGAAGT GGGGCAATG GTTTCGGTTC CACGTAACCT TTCTTTCCSC	
	BspEI
751 CCGGCCCCTG GTGAAACCGA CCCAACCCCT GACCCCTGAC TGTACCTTTT GGCCCGGAC CACTTTGGCT GGGTTTGGGA CTGGGACTCG ACATGGAAAA	
	BspEI
801 CCGGATTTAG CCTGTCCAGC TCTGGCTTGG GCGTGGGCTG GATTCCCGAG GGCCTAAATC GGACAGGTGC AGACCCCAAC CGCACCCGAC CTAAGCCGTC	
	XhoI
	AvaI
851 CCGCCTGGGA AAGCCCTCGA GTGGCTGGCT CTGATTGATT GGGATGATGA GGCGGACCCT TTCGGGAGCT CACCGACCGA GACTAACTAA CCTACTACT	
901 TAAATATTAI AGCACCAGCC TGAAAACCGC TCTGACCAIT AGCAAAGATA ATTCAATAA TCGTGTGCGC ACTTTTGGCC AGACTGTAA TCCTTTCTAT	
	BstBI
	SfuI
	NspV
951 CTTGAAAAA TCAGTGGTGG CTGACTATGA CCAACATGGA CCGGTTGGAT GAAGCTTTTT AGTCCACCAC GACTGATACT GGTGTACTT GGGCCACCTA	
	BssHII
1001 ACGGCCACCT ATTATTGCGC GCGTTCCTCT CGTTATCGTG GTGCTTTTGA TGCCGGTGGG TAATAACCGC CGCAAGAGGA GCAATAGCAC CAGGAAAAC	
	StyI
	BlpI
	CelII
1051 TTAATTGGGC CARGGCACC TTGTGACGGT TAGCTCAGCG TCGACCAAG AATAACCCCG GTTCCGTTGG ACCACTGCCA ATCGAGTCCG AGCTGGTTTC	
1101 GTCCAAGCGT GTTTCGGCTG GCTCCJAGCA GCAAAGCAGC CAGCGCGCGC CAGGTTGCGA CAAAGCGCAC CGAGGCTCGT CGTTTTCTGT GTGCGCGCGC	
1151 ACGGCTGCCC TGGGCTGCTT GGTAAAGAT TATTTCCCGG AACCACTCAC	
1201 TGCCGACGGG ACCCGACGGA CCAATTTCTA ATAAAGGGCC TTGGTCAGTG	
1251 CGTGAGCTGG AACAGCGGGG CGCTGACCAG CCGCGTGCAT ACCTTTCCGG GCATCTGACC TTGTCGCCCC GCGACTGGTC GCGCACGTA TGGAAAGGCC	
1301 CGGTCGTGCA AAGCAGCGCC CTGTATAGCC TGAGCAGCGT TGTGACCGTG GCCACGACGT TTGCTGCCCG GACATATCGG ACTCGTCCGA ACACTGGCAC	
1351 CCGAGCAGCA GCTTAGGCAC TCAGACCTAT ATTTGCAACG TGAACCATAA GGCTCGTCTG CGAATCCGTG AGTCTGGATA TAAACGTGCG ACTTGGTATT	
	EcoRI
1401 ACCGAGCAAC ACCAAAGTGG ATAAAAAGT GGAACCGAAA AGCGAATTCG TGGCTGTTG TGGTTTACC TATTTTTTCA CTTTGGCTTT TGCTTAAGC	
	BssHII
1451 ACTATAAAGA TGACGATGAC AAAGGCGCGC CGTGGAGCCA CCGCASTTT TGATATTTCT ACTGCTACTG TTTCCGCGCG GCACCTCGGT GGGCGTCAA	
	HindIII
1501 GAAATATGAT AAGCTTGACC TGTGAAGTGA AATATGGCCG AGATTGTGCG CTTTTTACTA TTGAACTGCG ACATCTACT TTTTACCGCG TCTAACACCG CGIII3 100.0%	
1551 ACATTTTTTT TGTCTGCGGT TTAATTAAG GGGGGGGGG GCGGCGCTG TGTAAAAAAA ACAGACGGCA AATTAATTTT CCCCCCCCC CCGCGGAC	
1601 GGGGGGGTGT ACATGAAATG GTAAAGCTTA ATATTTTGTT AAAATTCGCG CCCCCCCCA TGTACTTTAA CATTTCGACT TATAAACAAA TTTTAAGCGC	
1651 TTAATTTTTT GTTAATTCAG CTCATTTTTT AACCAATAGG CCGAATTCGG AATTTAAAAA CAAATTTAGT GAGTAAAAAA TTGGTATCC GCTTTAGCC	
1701 CAAATCCCT TATAATCAA AAGATAGAC CGAGATAGGG TTGAGTGTG GTTTAGGGA ATATTTAGT TCTTATCTG GCTCTATCC AACTCACAAC	
1751 TTCCAGTTTG GAACAAGAGT CCACTAATAA AGAAGCTGGA CTCACACTG ARGGTCAAC CTGTCTCA GGTGATRATT TCTGCACTC GAGGTTGCG	
1801 AAAGGGCGAA AACCGTCTA TCGGGCGGAT GAGGCGGAT CCGGCGGAT TTTCCCGCTT TTGGCAGAT AGTCCCGCTA CCGGTTGATG CTCTGGTAG	
1851 ACCCTAAAGT AGTTTTTTGG GGTGAGGTTG CCGTAAAGCA CTAATCGGA TGGGATTAGT TCAAAAACC CAGCTCCAC GGCATTTGCT GATTTAGCCT	
1901 AAGGCGGAAA AGGAGGGAAA GAACCGAAA GAGCGGGCG CTAAGGCGCT CAGCGCTCTT TCCTTCCTT CTTCGCTTT CCTCCGCCCG GATCCCGCGA	
1951 GGCAGTGA GGGTACCG CCGCGGTAAC CACCAACACC GCGCGCTTA CCGTTCACT CGCCAGTCC ACGCGCNTG GTGTTGTGG GCGCGGAA	

2001 ATGCGCCGCT ACAGGGCCGC TGCTAGACTA GTGTTTAAAC CGGACCGGGG
TACGGCGGGA TGTCGCGCCG ACGATCTGAT CACAAATTTG GCTTGGCCCC

2051 GGGGGCTTAA GTGGCTGCA AAACAACACG GCCTCCTGTC AGGAAGCCGC
CCCCGAATT CACCCGACGT TTTGTTTTCG CGSAGGACAG TCCTTCGGCG

2101 TTTTATCGGG TAGCCTCCTC GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG
AAATATAGCC ATCGGAGTGA CGGGCCAAAG GTCAGCCCTT TGGACGACAC

2151 CCAGCTGATC CAGGTAATGC GCCAACGCGC GCGGAGAGGC GGTTCGCTA
GGTCGACGTA GTCACCTTAG CCGTTCGCGC CCGCTCTCCG CCAACCCCAT

2201 TTGGAGCCCA GGGTGTGTTT TCTTTTCCAC AGTGAGACGG GCAACAGCTG
AACCTTCGGT CCCACAAAA AGAAAAGTGG TCACTCTGCC CPTTGTGAC

2251 ATTGCCCTTC ACCGCTGCGC CTTGAGAGAG TTGCAGCAG CGTCCACGC
TAACGGGAAG TGCGCGACCG GGCATCTCTC AACGTCGTTT GCCAGTGGC

2301 TGSTTTGCCC CAGCAGCCGA AAATCCTGTT TGATGTTGGT CAGGGCGGG
ACCAACCGGG GTGCTCCGCT TTTAGGACAA ACTACCACCA GTCGCGCCCC

2351 ATATAACATG AGCTGCTCTC GGTATCTGCG TATCCCACTA CCGAGATGTC
TATATTTGAC TCGACAGGAG CCAATAGCAG ATAGGTTGAT GGTCTTACAG

2401 CGCACCAACG CGCAGCCCGC ACTCGGTAAT GGCACGCATT GCGCCACGG
CGTGTGTTGC GTCTCGGCC TGAGCCATA CCGTECGTAA CGCGGGTCCG

2451 CCATCTGATC GTTGGCAACC AGCATCGCAG TGGGAACGAT GCCCTCATT
GGTAGACTAG CAACCGTTGG TCGTAGCGTC ACCCTTGCTA CGSAGTAAG

2501 AGCATTITGA TGGTTTGTG AAAACCGGAC ATGGCACTCC AGTCGCTTC
TCGTAACAGT ACCAACCAAC TTTTGGCTTG TACCGTAGAG TCAGCGGGAAG

2551 CCGTTCGCGT ATCGGCTGAA TTTGATTGCG AGTGAGATAT TTATGCCAGC
GGCAAGCGGA TAGCCGACTT AAATTAACGC TCACTCTATA AATACGGTCC

2601 CAGCCAGACG CAGACGCGCC GAGACAGAAC TTAATGGGCC AGCTAACAGC
GTCCGCTTGC GTCTGCGCGC CTCCTGTCTG AATTAACCGG TCGATTTGCG

2651 GCGATTTGCT GGTGGCCCAA TGCGACCAGA TGCTCCACGC CCACTCGCGT
CGCTAAACGA CCACCGGTTT ACCTGCTGCT ACGAGTGGCG GGTCAAGCGA

2701 ACCGTCCTCA TGGGAGAAAA TAATACTGTT GATGGGTGTC TGCTCAGAGA
TGGCAGGAGT ACCCTCTTTC ATTTAGACAA CTACCCACAG ACCAGTCTCT

2751 CATCAAGAAA TAACGCCGGA ACATTAGTGC AGGCAGCTTC CACAGCAATA
GTAGTCTTTC ATTGCGGCTT TGAATACAG TCCGTGGAAG GTGTCGTTAT

2801 GCATCCTGTT CATCCAGCGG ATAGTTAATA ATCAGCCACC TGACACGTTG
CGTAGACCA GTAGAGCCGC TATCAATAT TAGTCCGGTG ACTGTGCAAC

ApaLI

2851 CGCGAGAAGA TTGTGACCGC CGCTTTTACA GGCTTCGACG CCGCTTCGTT
GGCTCTTCT AACACGTGGC GCGCAAAATG CCGAAGCTGC GCGGAAGCAA

ACGACATCGG TCAATGGAAG CTTTTTCTC AACCATCGAG AACTAGGGCG

3851 AAACAACCA CCCTGGTAG CGGTGGTTTI TTTGTTTGA AGCAGCAGAT
TTTGTGTTGTT GCGCAGCATT GCACCAAAA AAACAACAGT TCGTCTGCTA

3901 TAGCGCCAGA AAAAAGGAT CTCAAGAGA TCCTTTGATC TTTTCTACG
ATGCGCGTCT TTTTTTCTTA GAGTCTTCT AGGAACAGT AAAAGATGCC

3951 GGTCTGACCG TCASTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGAT TTTGGTCAGA
CCAGACTGCG AGTCACCTTG CTTTGGAGTG CAATTCCTTA AAACAGTCT

4001 TCTAGACCA GCGGTTTAA GGCACCAATA ACTGCCTTAA AAAAATGAC
AGATCGTGGT CCGCAAAATC CCGTGGTTAT TGACGGAATT TTTTAAAGC

4051 CCGCGCCCTG CCACTCATCG CAGTACTGTT GTATTCATT ARGATTTCTG
GGGGCGGCG GGTGAGTAGT GTCATGACAA CATTAAGTAA TTTGTAAGAC

4101 CCGACATGGA ACCCATCAAC AACCGCATGA TGAACCTGAA TCGCCAGCG
GGCTGACTCT TCGGTAGTGT TTTCCGTAAT ACTTGGACTT AGCGTCCGC

4151 CATCAGCACG TTGTGCGCTT GCTATATAA TTGCGCCATA GTGAAAACGG
GTAGTCTGTG AACAGCGGAA CCGATATTAT AAACGGGTAT CACTTTTSCC

4201 GGGCGAGAA GTTGTCCATA TTGGCTACGT TTAATAAAA ACTGGTGA
CCCGCTTCTT CACAGGTTAT AACCGATGCA AATTTAGTTT TGACACTTT

4251 CTCRCCAGG GATTGGCTGA GACGAAAAAC ATATTCTCAA TAAACCCITT
GAGTGGGTCC CTAACCGACT CTGCTTTTIG TATAAAGATT AATTGGGAAA

4301 AGGSAATAG GCCAGTITT CACCGTAACA CGCCACATCT TGCGAATATA
TCCTTTATC CCGTCAAAA GTGGCATGTT CCGGTGTA GAACCTTATAT

4351 TGTTAGAAA CTTGCGGAAA TCGTCTGCTT ATTCACTCCA GAGCGATGAA
ACACATCTTT GACGGCCTTT AGCAGCACCA TAAGTGAGGT CTCGTAATT

4401 AACGTTTCAG TTTGCTCATG GAAAACGGTG TAAACAGGGT GAACACTATC
TTGCAAGTCC AAACGAGTAC CTTTGGCCAC ATTGTCCCA CTTGTGATAG

4451 CCATATCACC AGCTCACCGT CTTTCACTGC CATACGGAAC TCGGGTGGAG
GGTATAGTGG TCGAGTGGCA GAAAGTAAAG GTATGCTTTG AGGCCACTFA

4501 CATTCAATCG CCGGCAAGA ATGTGAATA AGSCCGGATA AAACCTGTGC
GTAAGTAGTC CCGCGTCTT TACACTTATT TCGCGCTAT TTTGAACAG

4551 TTATTTTTCT TTAGGCTCTT TAAAAAGCC GTAAATCCA GCTGAACGCT
AATAAAAAA AATGCCAGAA ATTTTTCGCG CAATTATAGT GCACTTGGCA

4601 CTGGTTATAG GTACATTGAG CCACTGACTG AAATGCCCTA AAATGTTCTT
GACCAATATC CATGTACTC GTTACTGAC TTTACGGAGT TTTACAGAA

4651 TAGGATGCCA TTGGATATA TCAACGGTGG TATATCCAGT GATTTTCTC
ATGCTACGGT AACCTTATAT AGTGTCCACC ATATAGGICA CTAARAAAAG

4701 TCCATTTTAG CTTCTTASC TCCGAAAAT CTCGTAATCT CAAAANTAC
AGCTAAAATC GAAGGAATCG AGGACTTTTA GAGCTATTGA GTTTTTTATG

4751 GCGCGTAGT! GATCTATTAT CATTATGGTG AAAGTTGGAA CCTCACCCGA

2901 CTACCATCGA CAGGACCAGC CTGGCACCA GTTGATCGGC GCGAGATTTA
GATCGTAGCT GTGCTGGTGC GACCGTGGT CAACTAGCCG CGCTCTAAAT

2951 ATCGCCGCGA CAATTTGCGA CCGCGCTGC AGGGCCAGAC TGGAGTGGC
TAGCGGCGCT GTTAAACGCT GCGCGCCAGC TCCCGGCTG ACCTCCACC

3001 AACGCCAATC AGCAACGACT GTTTCGCGC CAGTGTGTT GCGACGCGGT
TTGCGGTTAG TCGTTCCTGA CAACGGGCG GTCAACACA CCGTCCGCCA

3051 TAGGAATGTA ATTACGCTCC GCCATGCGCG CTTCACTTT GGTTCGCTT
ATCTTACTAT TAAGTCGAGG CGGTAGCGGC GAAGTGAATA AAGGCGCAA

3101 TTCCGAGAAA CGTGGCTGCG CTGGTTCACC ACGCGGAAA CCGTCTGATA
AAGGCTCTTT GCACCGACCG GCCAAGTAGT TCGCGCTTTT GCGAGACTAT

3151 AGAGACACCG GCATCTCTG GCATCGCTA TACGTTACT GGTTCACAT
TCTCTGTGTC CGTATGAGC GCTGAGACT ATTGCATGA CCAAGTGTGA

3201 TCACCACTCT GAATGACTC TCTTCCGGC GCTATCATG CATACCAGA
AGTGGTGGGA CTTAACTGAG AGAAGGCGCG CGATAGTACG GTATGGCGCT

3251 AAGGTTTTTC GCCATTGAT GCTAGCCATG TGAGCAAAA GCGACAAAA
TTCCAAAACG CCGTAAAGTA CGATCGTAC ACTCGTTTTC CCGTCTTTT

3301 GCGCAGGAA CATAAAAAG CCGGTTGCT GCGCTTTTC CATAGGCTCC
CGGTCTTTC GCATTTTTC GCGCAACGA CCGCAAAAAG GTATCCGAGG

3351 GCGCCCTGA CAGCATCAC AAAAATCGC GCTCAAGTCA GAGTGGCGA
CGGGGGACT GCTGTAGTG TTTTGTAGT CGAGTTCAGT CTCACCGCT

3401 AACCCGACG GACTATAAAG ATACCAGCG TTTCCCGCT GAAGTCTCT
TTGGCTGTC CTGATATTC TATGTCCCG AAAGGGGAC CTTGAGGGA

3451 CTTGCGCTC CCTGTCCGA CCTGCGGCT TACCGATAC CTTGCGGCT
GCAAGCGAGA GCAAGAGCT GCGAGCGCG ATGGCTTATG GATGCGCGA

3501 TTTCCCTTC GGGAGCGTG GCGCTTCTC ATAGCTCAG CTTAGATAT
AAGAGGGAAG CCCTTGCAC CCGAAAAGG TATGAGTGC GATACCTATA

ApaLI

3551 CTCAGTCCG TGTAGTCTT TCGTCCAG CTGGGCTGTC TGCAAGAAC
GATCAAGCC ACATCCAGCA AGCGAGTTC GACCCGACAC ACCTGCTTGG

3601 CCGGTTTCA CCGCAGCGT CCGCTTATC CCGTAACTAT CTTGCTGAT
GGGCAAGTC GGGTGGCGA CCGGGAATAG CCGTAACTAT CTTGCTGAT

3651 CCAACCCGCT AAGACAGAC TTATCGCAC TGCGAGCAGC CACTGTAATC
GTTTGGGCA TTTGTTGCTG AATAGCGTGG ACCGCTGCTG GTGACCTATG

3701 AAGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGCGGT GCTACAGAT TCTGAAGTG
TCTAATCTT CTGCTCCAT ACATCCGCA CGATGCTCA GAACCTCAC

3751 GTGGCTTAC TAGGCTACA CTAGAAGAC AGTATTGTT ATCTGCGTC
GACCGGATG ATGCGGATG GATCTCTTC TCAAAAACA TAGACCGGAG

3801 TGCTGTAGCC AGTACCTTC GGA AAAAGG TTTGTAAGTC TTGATCCGCG

CGGGCCATCA CTAGAATAAA GTAATACCAC TTTCAACCTT GGAGTGGGCT

4801 CGTCTAATGT GAGTATGCT ACTCATTAGG CACCCGAGC TTTACCTTT
GCAGATACA CTCAATGGAG TGAGTAAATC GTGGGCTCG AATGTGAAA

4851 ATGCTTCCGG CTGCTATGTT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACATTTCA
TAGCAAGGCC GAGCATACA CACACTTAA CACTCGCTTA TTGTTAAGT

M13 リバースプライマー 100.0% XbaI

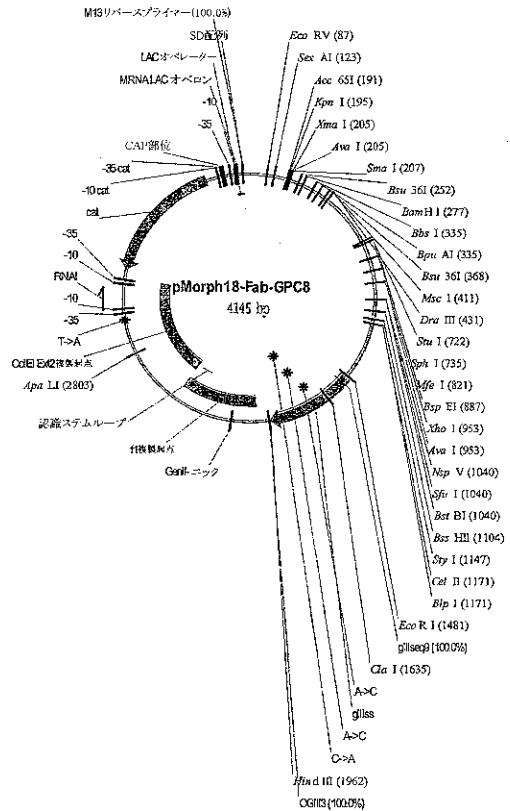
4901 CACAGAAAC AGCTATGACC ATGATTACGA ATTTCTAGAT AACGAGGCA
GTGCTTTTG TCGATACTG TACTAATGCT ATGCTGCTA TAGACCGGAG

4951 AAAAATGAAA AAGACAGCTA TCGCGATTGC AGTGGCAGTC CTTGTTTTC
TTTTTACTTT TTCTGTGAT AGCGCTAAC TACCCGAGC GACCAAGAC

EcoRV

5001 CTACCGTAGC GCAGCCGAT GATGGCATCG CCGTCCGCTA

【 図 1 4 】



1 TCAGTATACG AGGCCTAAAA ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTCGAGTG
AGTCTATTGC TCCCGTTTTT TACTTTTTCT GTCGATAGCG CTACCGTAC

EcoRV
51 GCACCTGGCTG GTTTCGCTAC CGTAGCGCAG GCCGATATCG TGCTGACCCA
CGTAGCUGAC CAAGCGGATG GCATCGCGTC CGGCTATAGC ACGACTGGGT

SexAI
101 GCCGCGCTTCA GTGAGTGGCG CACCAGGTCA GCGTGTGACC ATCTCGTGTG
CGCGGGAAGT CACTCACCAG GTGGTCCAGT CGCACACTGG TAGAGCACT

KpnI
Aco65I
151 CGCGCAGCAG CAGCAACATT GGCAGCAACT ATGTGAGCTG GTACCGAGCAG
CGCCGTCGTC GTCCGTTGTA CCGTGTGTTA TACACTCGAC CATGCTCGTC

XmaI
SmaI
AvaI Bsu36I
201 TTGCCCGGGA CGGCGCGGAA ACTGCTGATT TATGATAACA ACCAGCGTCC
AACCGGCCCT GCCCGGGCTT TGACGACTAA ATACTATTGT TGGTCCGAGG

Esu36I BamHI
251 CTCAGGCGTG CCGGATCGTT TTAGCGGCTC CAAAGCGGC ACCAGCGCGA
GAGTCCGCAC GCCTTAGCAA AATCGCTAG GTTTCCGCGC TGGTCCGCGT

BpuAI
BbsI
301 GCCTTGCAT TACGGGCGTG CAAAGCGGAG ACGAAGCGGA TTATTATTGC
CGGAACGCTA ATGCCCGGAC GTTTCGCTTC TGCTTCGCTT AATAATAAGC

Bsu36I
351 CAGAGCTATG ACATGCCTCA GGCTGTGTTT GGCGCGGCGA CGAAGTTTAA
GTCTCGATAC TGATCGGAGT CGGACACAAA CGCGCGCGCT GCTTCAAAT

MscI DraIII
401 CCGTTCTTGG CCAGCCGAAA GCCCGCACCA GTGTGACGCT GTTTCGCGCG
GGCAGAAACC GGTGCGCTTT CGCGCTGGCT CACACTGCGA CAAAGCGCGC

451 AGCAGCGGAG AATTCGAGCG GACAAAGCG ACCCTGCTGT GCCTGATTAG
TGTTCGCTTC TTAACGTCGG CTGTGTTCCG TGGGACCAAC CGGACTAATC

501 CGACTTTTAT CCGGAGCGCG TGACAGTGGC CTGGAAGGCA GATAGCAACC

StyI CclII
1151 GCACCCTGGT GACCGITAGC TCAGCGTCCA CCAAGGTCC AAGCGTGT
CGTGGCACA CTGCUATGCG AGTCGAGCT GTTTCGCGCG TCCGACAAA

1201 CCGCTGGCTC CGAGCAGCAA AAGCAGCAGC GCGCGCACGC CTGCGCTGGG
GGCAGCCGAG GTCGTCGTT TTGCTGCTCC CGCCCTCCCG CAGGGGACCC

1251 CTGCTGCTGT AAGATTTAT TCCGGAAAC AGTCACTGTG AGCTGGAACA
CAGGACCAA TTTCTAATA RGGGCTTGG TCAGTGGCAC TCGACTTGT

1301 CGCGGCGCT GACCAGCGGC GTGCATACCT TTCCGCGGT GTCGAAAGC
CGCCCGCGA CTGCTGCGCG CACGATATGA AAGCGCGCA CGACTTTG

1351 AGCGGCTGT ATAGCCTGAG CAGCGTGTG ACCGTGCGCA CGAGCAGCT
TCCGCGGACA TATCGGACT GTGCAACAC TGGCAGGCT CCGTCTGAA

1401 ACGCACTCAG ACCATATATT CCAACGTGAA CCATAAACCG AGCAACACCA
TCCGTGAGTC TGGATATAAA GATTGCACT GTTATTTGGC TCGTTGTGT

EcoRI
1451 AAGTGGATAA AAAAGTGGAA CCGAAAAGCG AATTGCGGGG AGGGAGCGGG
TTCACTATT TTTCACTTT GCGTTTTGCG TTAGGCCCCC TCCCTCGCCC

1501 AGCGGTGATT TTGATATGA AAAGATGGGA AACGCTAATA AGGGGCTAT
TCCGCACTAA AACTAATACT TTTCTACCT TCGGATAT TCCCGGATA
gIIIseq 100.0%

1551 GACCGAAAAT GCGGATGAAA ACGCGCTACA GTCTGAGCTG AAAGGCAAC
CTGCTTTTA CCGCTACTTT TCGCGATGT CAGACTCGA TTTCCGTTTG

ClaI
1601 TTGATTCGT CCGTACTGAT TACGTCCTC CTATCGADGG TTTCTTGT
ACTAAGACA GCGATGACTA ATGCCACGAC GATAGCTACC AAGTAACCA

1651 GACGTTTCCG GCGTTGCTAA TGGTAATGTT GCTACTGGTG ATTTGCTGG
CTGCAAGGC CGSACGATT ACCATACCA CGATGACCAC TAAACGACC

1701 CTCTAATCC CAAATGGCTC AAGTCGGTGA CCGTGTAAAT TCACCTTAA
GAGATTAAGG GTTTACCGAG TTCGCCACT GCACATATA AGTGAATTT

1751 TGAATAATTT CCGTCAATAT TACCTTCCC TCCCTCAATC GGTGATGT
ACTTATAAA GCGATTTATA AATGGAAAGG ACGGACTTGA CACACTTACA

1801 CGCCCTTTTG TCTTGGCGC TGGTAAACCA TATGAATTT CTATTGATG
CGGGAAAC AGAAACCGCG ACCATTGGT ATCTTAAA GATAACTAAC

1851 TGACAAAATA AACTTATCC TGCTGTCTT TCGGTTTCTT TTATGTTG
ACTGTTTAT TTGAATAAGG CACCACAGAA ACGCAAAGAA AATATACAC

1901 CCACCTTTAT GTATGATTT TCTACGTTG CTAACAATCT CGTAATAG
GGTGGAAATA CATACTAAA AGATGCAAC GATGTATGA CCGATATTCT

GCTGAAAATA GGCCCTCGCG ACTGTACCGG GACCTTCCGT CTATCGTCCG

551 CCGTCAGGC GGGAGTGGAG ACCACCACAC CCTCCAAACA AAGCAACAAC
GGCAGTTCCG CCTCACCTC TGGTGGTGTG GAGGTTTGT TTCTGTGTTG

601 AAGTACGCG CCAGCAGCTA TCTGAGCCTG ACGCCTGASC AGTGGAAAGT
TTCATCGCGC GGTCTGCSAT AGACTCAGAC TCGGACTCG TCACCTTCAG

651 CCACAGAAGC TACAGCTGCC AGTTCAGCCA TGAGGCGAGC ACCGTGGAAA
GGTGTCTTCG ATGTGACAGC TCCAGTGGCT ACTCCCTCG TGGCACCTTT

StuI SphI
701 AAACCGTTC GCGGACTGAG GCCTGATAAG CATGCGTAGG AGAAAATAAA
TTTGGCAACG CGGCTGACTC CCGACTATTC GTACGCTCC TCTTTTATTT

751 ATGAACAAA CCACTATTGC ACTGSCACTC TTACGTTGCT TCTTACCCC
TACTTTGTTT CCGTATAAGC TACCGTCCAG AATGGCAACG AAGAGTGGCG

MfeI
801 TGTACAAA GCGGAGTGC AATTGAAAGA AAGCGGCGCG GCCCTGGTGA
ACAATGTTT CCGTCCAGC TTAACCTTCT TTGCGCGGCG CGGACCACT

BspEI
851 AACCGACCA AACCTGACC CTGACCTGTA CCTTTCCGG ATTTAGCCTG
TTGGCTGGT TTGGGACTGG GACTGAGAT GGAAGAGGC TAAATCGGAC

901 TCCAGTCTG GCGTTGGCGT GCGTGGATT CGCCAGCGCG CTGGAAAGC
AGGTGACAG CCGAACCCCA CCCGACTTAA CGCGTGGCG GACCTTTCG

XhoI
AvaI
951 CCTCGAGTG CTGGCTGCA TTGATGGGA TGATGATAAG TATTATACGA
GGAGCTCAC GACCGAGACT AACTAACCTT ACTACTATTC AATATATCGT

BstBI
SfuI
NspV
1001 CCAGCCTGAA AACCGCTCG ACCATTAGCA AAGATACTC GAARAATCAG
GCTCGGACTT TTCCGACAGC TGGTAATCGT TTCTATGAG CTTTTTAGTC

1051 GTGTGTCTG CATAGACCA CATGACCCG GTGGATACG CCACCTATTA
CACCACGACT GATAGTGGT GTACCTGGCG CACCTATGCC GGTGGATAAT

BssHII StyI
1101 TTGCGCGCT TCTCCTCTT ATCGTGGTGC TTTTGGATT TGGCGCCAG
AACGCGCGCA AGAGGAGCAA TAGCACACG AAAACTAATA ACCCCGGTTC

HindIII

 1951 GAGTCTTGAT AAGCTTGACC TGTGAAGTGA AAAATGSCGC AGATTTGTGG
 CTCAGAACTA TTCGAACCTG ACACCTTCACT TTTTACCCTG TCTAACACGC
 OGI13 100.0%
 =====
 2001 ACATTTTTTT TGTCTGCCGT TTAATGAATG TGTAAACGTT AATATTTTGT
 TGTAAAAAAA ACAGACCGCA AATTACTTTA ACATTTGCRA TTATAAAAA
 2051 TAAATTCGCG GTTAAATTTT TGTATATATCA GCTCATTTTT TAACCAATAG
 ATTTTAAGCG CAATTTAAAA ACAATTTAGT CGAGTAAAA ATTGGTTATC
 2101 GCCGAATTCG CCAAAATCCG TTATTAATCA AAGAATAGA CCGAGATAG
 CGGCTTIAGC CTTTTIAGCG AATATTTAGT TTTCTTATCT GGCTCTATCC
 2151 GTTGAAGTGT GTTCCGTITT GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAAGCTGG
 CAACCTCAAA CAAGTCAAA CCTTSTYCTC AGGIGATPAT TCTTGTCCAC
 2201 ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGSGCGA TGGCCCACTA
 TGAGSTTGA GTTCCCGCT TTTTGGCAGA TAGTCCCGCT ACCGSGTAT
 2251 CGAGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTG GGTTCGAGGT GCGGTAAAGC
 GCTCTTGGTA TTAGCGATTAG TTCAAAAAAC CCGAGTCCA CGGCATTTCC
 2301 ACTAAATCGG AACCTTAAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGAOGGGGAA
 TGATTTAGCC TTGGGATTCC CCGCGGGGSC TAAATCTCGA ACTGCCCTTT
 2351 AGCCGGCGAA GTTGGCGACA AAGGAAGGGA AAGAAGCGAA AAGAGGCGG
 TCGGCGCCTT TCACGCGTCT TCCCTTCCTT TCTTTCCGCT TCCGCGCCG
 2401 GCTAGGGCGC TGCAAGTGT AGCGGTACCG CTGCGCGTAA CCACCACACC
 CGATCCGCGC ACCGTTCAAC TCCCGAGTGC GACGCGCATC GGTGGTGTGG
 2451 CGCGCGCTTT AATGCGCGCG TACAGGGCGC GTGCTAGCCA TGTGAGCAAA
 CGCGCGCGAA TCACGCGTCT ATCTCCGCGC CACGATCGGT ACACCTCGTIT
 2501 AGCCGAGCAA AAGCCGAGGA ACCCTAAAAA GCGCGCGTTC CTGCGCTTTT
 TCGGTCGCTT TTCGCTCCCT TGSCATTTTT CCGCGCGAAC GACCGCAAAA
 2551 TCCATAGGCT CCGCCCCCTT GAGSAGCATC ACAAATAATC ACGCTCAAGT
 AAGTATCCGA GCGCGGGGGA CTGCTCGTAG TGTTTTAGC TCGAGTICA
 2601 CAGAGTGGC GAACCCGAC AGSACTATAA AGACTACCAG CTTTCCCCC
 GTCTCCACC CTTTGGGCTG TCCATGATAT TCTATGTTCC GCAAGGGGG
 2651 TGGAACTCC CTGCGCGCT CTCTGTTCC GACCCTGCC CTTACCGSAT
 ACCTTCGAGG GAGCAGCGGA GAGSACAAGG CTGGGACGGC GAATGGCCTA
 2701 ACCGTCCCG CTTTCCCTT TCGSAGAGC TGGCCCTTC TCAATAGCTA
 TGRACAGCG GAAAGAGGGA AGCCCTTCCG ACCCGAAG AGTATCGAGT
 2751 CGCTGTAGT ATCTCATTC GGTGTAGGTC GTTCCTCCA AGCTSSCTG
 GCGACATCCA TAGAGTCAAG CCAATCCAG CAGCGAGGT TCGACCCGAC
 ApaLI

2801 TGTGACGAA CCCCCGTT AGTCCGACCG CTGCGCCTTA TCGGTAAGT
 ACACGTGCTT GGGGGGCAAG TACGGCTGGC GACCGGGAAT AGSCCATGA
 2851 ATCGTCTTGA GTCCAACCGG GTAAGACAGC ACTTATCGCC ACTGGCAGCA
 TAGCAGAACT CAGGTGGGGC CATTCTGTGC TGATAGCGCG TGCCCGTCT
 2901 GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA
 CGGTGACCAT TGTCTTAATC GTCTCGCTCC ATACATCCBC CAGGATGCT
 2951 GTTCTTGAAG TGTGGGCTA ACTACGGCTA CACTAGAGA ACGTATTTTG
 CAAGAACTTC ACCACCGGAT TGATGCCGAT GTGATCTTCT TGTCAATAAC
 3001 GTATCTGCGC TCTGCTGAT CAGTACCTC TCGAAAAAG AGTTGTAGC
 CATAGACCGG AGAGACATC GTCCTAATGA AGCCTTTTTC TCAACCAAG
 3051 TCTTGATCGG CAAACAAAC CACCGTGT AGCGGTGGT TTTTGTGTTG
 ABAACATAGG CTTTTTTTGT GTGGGACCA TCGCCACCAA AAAAAAACC
 3101 CAAGCAGCAG ATTAGCGCA GAAAAAAGG ATCTAAGAA GATCTTTTGA
 GTTCTGCTCT TAATGGCGGT CTTTTTTTCC TTAGGTAAGT TTAGGAACT
 3151 TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGA ACGAAAAC ACGTAAAGG
 AGAAAAAGAT CCGCAGACTC CAGTCACTC TGTCTTTGAG TCAATTTCC
 3201 ACTTTGCTCA GATCTAGCAC CAGCGCTTTA AGGGACCAA TAACTGCTCT
 TAAACCCAGT CTAGATCGTG TCCGCAATG AGCCTTTTTC TCAACCAAG
 3251 AAAAAAATTA CCGCCCGCCC TGCCACTCAT CGCAGTACTC TTGTAATTC
 TTTTTTTTAA TCGGGGCGGG ACGGTGAGTA GCGTCACTAG AACATTAAGT
 3301 TTAAGCATTG TGCCGACATG GAAGCCATCA CAAACGGCAT GATGAACCTG
 AATTCTAAG ACGGCTGTAC CTTCCGTAAT GTTTGCGTA CTACTTGGAC
 3351 AATCGCCAGC GGCATCAGCA CTTTGTGCGC TTAGGATATA TATTTCGCA
 TTAGCGGTG CCGTGTGCTT GGAACAGCGG AACCCATAAT ATAAACGGT
 3401 TAGTGAATC GGGGGCGAAG AAGTTGTCCA TATTGGCTAC GTTAAATCA
 ATCTCTTTTG CCCCCGCTTC TTAACAGGT ATACCGGAT CAAATTTAGT
 3451 AACTGTGTA AACTCACCA GGGATGGCT GAGACGAAA ACATATCTC
 TTTGACCACT TTGAGTGGGT CCAATACGGA CTCTGCTTTT TGTATAAGAG
 3501 AATAAACCTT TTAGGGAAT AGGCCAGGTT TTAACCGTAA CAGCCACAT
 TTATTTGGGA AATCCCTTTA TCCGGTCCA AAGTGGCAT GTGCGGTGTA
 3551 CTGCGGATA TATGTGTA AACTGCGGGA AATCGTGTG GATTCACIC
 GAACGCTTAT ATACACTCT TTAGCGGCT TTAGCAGCAC CATAAGTSG
 +1
 3601 CAGAGCGATG AAAACGTTTC AGTTTGTCTA TGGAAAACGG TGTAAACAG
 GTCTCGCTAC TTTTSCAAG TCAACAGAT ACCTTTGGC ACATTTGTTCC
 3651 GTGAACATA TCCCATATCA CAGCTCACG GTCTTTTCAI GCCATACGGA
 CACTTGTGAT AGGATATAGT GGTGAGTGG CAGAAAGTAA CGTATGCTCT
 3701 ACTCCGGGTC AGCATTCAT AGGGCGGCAA GAACGTGAAT AAAGCGGGA
 TGAGGCCAC TCGTAAATAG TCCGCGGCTT CTTACACTTA TTTCCGCTCT

3751 TAAACTTGT GCTTATTTTT CTTTACGGTC TTTAAAAAG CCGTAATATC
 ATTTTGAACA CGAATAAAAA GAATGCCAG AATTTTTTCC GGCATTTATG
 3801 CAGCTGAACG GTCTGTTAT AGSACTATG AGCACTGAC TGAATGCTT
 GTGACTTGC CAGACCAATA TCCATGTAC TCGTTGACG ACTTTACGGA
 3851 CAAATGTTT TTTACAGTC CATPGGATA TATCAACGGT GGTATATCCA
 GTTTTACAG AATATGCTAC GTAACCTTAT ATAGTTGCCA CCATATAGT
 3901 GTGATTTTT TCTCATTTT AGCTTCCCTA GCTCCTGAAA AGCTGCTAA
 CACTAAAAAA AGAGTAAAA TCGAAGGAT CAGAGCACTT TAGAGCTATT
 3951 CTCAAAAAT AGCCCGGTA GTGATCTTAT TPCATATGG TGAAGTGG
 GAGTTTTTTA TCGGGCCAT CACTAGAATA AAGTATATCC ACTTTCAACC
 4001 AACCTCACCC GAGCTCAAT GTGAGTTAG TCACTATTA GGCACCCAG
 TTGAGTGGG CTGAGATTA CACTCAATC AGTGAATAT CCGTGGGCTC
 4051 GCTTTACACT TTAGCTTCC GGCCTGATG TGTGTGGAA TGTGAGCGG
 CGAATGTGA AATACGAAG CAGAGCATC AACACACTT AACACTGCG
 M13 リバースプライマー 100.0%
 =====
 4101 ATACAAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GATTT
 TATTGTTAAA GTGTCTCCTT TGTGATACT GGTACTAATG CTTAA

【 15 】
 MS-GPC-1:
 VH
 QVQLKESGPAIVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIROPQPKALE
 WLALIDWDDDKYYSTSLKRLTISKDTSKNQVLLMTNMDPVDATY
 CARQYGHRGGFDHWGQGLTVVSS
 VL
 DIVLTQPPSVSGAPGQRVITISCGSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKLLI
 YDNNQRPSPGVPDFRFSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCQSYDFNE
 SVFGGGKTLTVLG
 MS-GPC2:
 VH
 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPGRGL
 EWLGRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA
 VYYCARSHNKWRFYNLYSLYDFDFWQGLTVVSS
 VL
 DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLI
 YGASSRATGVPARFSGSGSDFTLTISSELEDFAVYYCQESGFPY
 TFGQGTKEIKRT
 MS-GPC3:
 VH
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYMHWRQAPGQGLE
 WMGWINPNSGGTNYAQKFGQRTMTROTSISTAYMELSSLRSEDAV
 YYCARLSTRMDPWQGLTVVSS
 VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASSRATGVPARFSGSGSDFTLTISLEPEDFAVYYCQQDDNFPI
TFGQGTKEIKRT

MS-GPC4:

VH

QVQLKESGAPLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGIRQPPGKALE
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY
CARYVYVSVGVGVTHYDDVWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASSRATGVPARFSGSGSDFTLTISLEPEDFAVYYCQQDYSYPS
TFGQGTKEIKRT

MS-GPC5:

VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGLE
WMGGIIFGTANYAQKFGQRTVITADESTAYMELSSLRSEDTAVY
CARHSFFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKPGQAPLVYIY
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDNVDIS
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC-6

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE
WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVY
YCARGYGRYSPDLWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVITISCSGSSNIGSNYSWYQQLPGTAPKLLI
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDLTM
GVFGGGTKLTVLG

MS-GPC11:

VH

QVQLKESGAPLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGIRQPPGKALE
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY
CARsqqyrgjdvWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVITISCSGSSNIGSNYSWYQQLPGTAPKLLI
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDYGIV
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC14:

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE
WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVY
YCARSSMPMYGEGFDLWGQGLTVTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKPGQAPLVYIY
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDFGVSH
SVFGGGTKLTVLG

MS-GPC15:

VH

VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASSRATGVPARFSGSGSDFTLTISLEPEDFAVYYCQQSNL PF
TFGQGTKEIKRT

MS-GPC7:

VH

QVQLKESGAPLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGIRQPPGKALE
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY
CARSQNGFYGGNLDIWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVITISCSGSSNIGSNYSWYQQLPGTAPKLLI
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSRDPSN
VVFVGGGTKLTVLG

MS-GPC-8

VH

QVQLKESGAPLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGIRQPPGKALE
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVITISCSGSSNIGSNYSWYQQLPGTAPKLLI
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDMPQ
AVFVGGGTKLTVLG

MS-GPC-10

VH

QVQLKESGAPLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGIRQPPGKALE
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY
CARQLHYRGGFDLWGQGLTVTVSS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE
WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRRAEDTAVY
YCARFYSHVLAMDNWGQGLTVTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKPGQAPLVYIY
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSRDIHIHNE
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC18:

VH

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLCAISGDSVSNSSAAWNIRQSPGRGL
EWLGRTYRYSKYWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA
VYYCARTQLYYFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYKQKPGQS
PQLLYLGSNRAAGVDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYCYCQQY
NSYPRTFGQGTKEIKRT

MS-GPC-8-6

VH

QVQLKESGAPLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGIRQPPGKALE
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRTVITISCSGSSNIGSNYSWYQQLPGTAPKLLI
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDYDH
YVFVGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-10

VH
 QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE
 WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY
 CARSPRYRGAFDYWGQGLTVVSS
 VL
 DIVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCSGSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI
 YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDLIRH
 VFVGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-17

VH
 QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE
 WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY
 CARSPRYRGAFDYWGQGLTVVSS
 VL
 DIVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCSGSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI
 YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDFSV
 YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-27

VH
 QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE
 WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY
 CARSPRYRGAFDYWGQGLTVVSS
 VL
 DIVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCSGSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI
 YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDMNV
 HVFVGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-6-13

VH
 QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE
 WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY
 CARSPRYRGAFDYWGQGLTVVSS
 VL
 DIVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCSGSESIGNYVVTWYQQLPGTAPKLLI
 YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDYDH
 YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-10-57

VH
 QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE
 WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY
 CARSPRYRGAFDYWGQGLTVVSS
 VL
 DIVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCSGSESIGNYVQWYQQLPGTAPKLLI
 YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDLIRH
 YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-27-41

VH
 QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE
 WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY
 CARSPRYRGAFDYWGQGLTVVSS
 VL
 DIVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCSGSESIGNYVQWYQQLPGTAPKLLI
 YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDMNV
 HVFVGGGTKLTVLG

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 November 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/87338 A1

(51) International Patent Classification: A61K 39/395, 48/06, G01N 33/53 (74) Agents: VINCENTI, Matthew, P. et al., Ropes & Gray, One International Place, Boston, MA 02110-2624 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/15626

(22) International Filing Date: 14 May 2001 (14.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
06/100655 12 May 2000 (12.05.2000) EP
60/258762 6 October 2000 (06.10.2000) US

(71) Applicants (for all designated States except US): GPC BIOTECH AG [DE/DE], Frankfurterstrasse 29, 82152 Murnitzheim (DE); MORPHOSYS AG [DE/DE], Am Klopfersteig 19, 82152 Murnitzheim (DE).

(72) Inventors, and
(75) Inventors/Applicants (for US only): NAGY, Zoltan [DE/US], One Kendall Square, Bldg. 600, Cambridge, MA 02139 (US); TESAR, Michael [DE/DE], Karolingerstrasse 26, 82362 Weilheim (DE); THOMASSEN-WOLF, Elisabeth [DE/DE], Klingstrasse 12/3, 81369 München (DE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/87338 A1

(54) Title: IMMUNOMODULATORY HUMAN MHC CLASS II ANTIGEN-BINDING POLYPEPTIDES

(57) Abstract: The present invention relates to human polypeptides causing or leading to the modulation of the immune system. The invention further relates to nucleic acids encoding the polypeptides, methods for production of the polypeptides, methods for immunosuppression, pharmaceutical and diagnostic compositions and kits comprising the polypeptides and uses of the polypeptides.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Immunomodulatory human MHC class II antigen-binding polypeptides**Background of the Invention**

Diseases involving the immune system are significantly debilitating to suffering individuals and are predicted to increase in prevalence over the next 10 years. Such diseases include rheumatoid arthritis (RA), multiple sclerosis (MS), type I diabetes, transplant rejection (TR) and graft vs. host disease (GvHD). For example, the number of patients suffering from rheumatoid arthritis is expected to grow world-wide from 6.6 million to 7 million by 2010. The recorded number of patients suffering from these diseases in 1995, the predicted number of patients for 2010 and corresponding market sizes are shown below.

Disease	Number of patients (Mio)		Market size (Bio.\$)	
	1995	2010 (est)	1994	2010 (est)
Rheumatoid Arthritis	6.6	7	2.4	>3.7
Multiple Sclerosis	0.62	0.65	0.3	>1.5
Type I diabetes	1.8	1.9	1.5	>1.5
Transplant/GvHD	0.05	0.1	0.9	>1.5

Current therapies in diseases of the immune system include anti-inflammatory drugs, e.g., NSAIDS (non-steroidal anti-inflammatory drugs), corticosteroids, cytostatics (methotrexate for RA), and cytokines (interferon beta for MS). These therapies are symptomatic; none of them induces complete remission of the disease. A general problem with most current drugs is also their lack of selectivity: they suppress the whole immune system, and thus, the patients treated will become highly susceptible to infections. Finally, the side effect profile of most presently used anti-inflammatory agents also warrants the development of new therapeutics for these diseases. Therefore, there is a pressing unmet medical need for selective, disease-mechanism-based therapeutics to treat diseases of the immune system such as RA and MS.

The underlying immunological mechanisms of TR and GvHD are similar to those of other diseases of the immune system. In TR, the recipient's immune system attacks

WO 01/87338

PCT/US01/15626

the foreign organ, whereas in GvHD the foreign hematopoietic cells introduced into immunocompromised hosts attack the host. At present, corticosteroids, Azathioprine, Cyclosporin A, and CellCept are used for prevention of rejection, and high dose corticosteroids, OKT3 (a monoclonal antibody (mAb) to a pan-T cell marker), and Zenapax (mAb to IL-2R on activated T cells) for its treatment. In GvHD corticosteroids are used, but no satisfactory treatment is available. There is an unmet medical need for a better tolerated and more effective immunosuppressant, particularly for the treatment of GvHD.

- 10 Every mammalian species, which has been studied to date carries a cluster of genes coding for the so called major histocompatibility complex (MHC). This tightly linked cluster of genes code for surface antigens, which play a central role in the development of both humoral and cell-mediated immune responses. In humans the products coded for by the MHC are referred to as Human Leukocyte Antigens or HLA.
- 15 The MHC-genes are organised into regions encoding three classes of molecules, class I to III.

Class I MHC molecules are 45 kD transmembrane glycoproteins, noncovalently associated with another glycoprotein, the 12 kD beta-2 microglobulin (Brown et al., 1993). The latter is not inserted into the cell membrane, and is encoded outside the MHC. Human class I molecules are of three different isotypes, termed HLA-A, -B, and -C, encoded in separate loci. The tissue expression of class I molecules is ubiquitous and codominant. MHC class I molecules present peptide antigens necessary for the activation of cytotoxic T-cells.

25 Class II MHC molecules are noncovalently associated heterodimers of two transmembrane glycoproteins, the 35 kD α chain and the 28 kD β chain (Brown et al., 1993). In humans, class II molecules occur as three different isotypes, termed human leukocyte antigen DR (HLA-DR), HLA-DP and HLA-DQ. Polymorphism in DR is restricted to the β chain, whereas both chains are polymorphic in the DP and DQ isotypes. Class II molecules are expressed codominantly, but in contrast to class I, exhibit a restricted tissue distribution: they are present only on the surface of cells of the immune system, for example dendritic cells, macrophages, B lymphocytes, and activated T lymphocytes. They are also expressed on human adrenocortical cells in

WO 01/87338

PCT/US01/15626

the zona reticularis of normal adrenal glands and on granulosa-lutein cells in corpora lutea of normal ovaries (Kahoury et al., 1990). Their major biological role is to bind antigenic peptides and present them on the surface of antigen presenting cells (APC) for recognition by CD4 helper T (Th) lymphocytes (Babbitt et al., 1985.) MHC class II molecules can also be expressed on the surface of non-immune system cells. For example, cells in an organ other than lymphoid cells can express MHC class II molecules during a pathological inflammatory response. These cells may include synovial cells, endothelial cells, thyroid stromal cells and glial cells.

10 Class III MHC molecules are also associated with immune responses, but encode somewhat different products. These include a number of soluble serum proteins, enzymes and proteins like tumour necrosis factor or steroid 21-hydroxylase enzymes. In humans, class III molecules occur as three different isotypes, termed Ca, C2 and Bf (Kuby, 1994 the page number for this reference is missing).

15 A large body of evidence has demonstrated that susceptibility to many diseases, in particular diseases of the immune system, is strongly associated with specific alleles of the major histocompatibility complex (reviewed in Tiwari et al., 1985). Although some class I associated diseases exist, most autoimmune conditions have been found to be associated with class II alleles. For example, class II alleles DRB1*0101, 0401, 0404, and 0405 occur at increased frequency among rheumatoid arthritis (RA) patients (McMichael et al., 1977; Stasny, 1978; Chia et al., 1982; Schiff et al., 1982), whereas DRB1*1501 is associated with multiple sclerosis (MS), and the DQ allele combination DQA1*0301/B1*0302 with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). In RA, altogether >94% of rheumatoid factor positive patients carry one of the susceptibility alleles (Nepom et al., 1989).

30 Class II MHC molecules are the primary targets for immunosuppressive intervention for the following reasons: First, MHC-II molecules activate T helper (Th) cells that are central to immunoregulation, and are responsible for most of the immunopathology in inflammatory diseases. Second, most diseases of the immune system are genetically associated with class II alleles. Third, MHC-II molecules are only expressed on cells of the immune system, whereas MHC-I molecules are present on most somatic cells.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

At least three mechanisms are believed to play some part in immunosuppression mediated by proteins binding to MHC class II molecules. First, since Th cells recognise antigenic peptides bound to class II molecules, monoclonal antibodies (mAb) specific for class II molecules can sterically hinder the interaction between the MHC class II molecule and the T cell receptor, and thereby prevent Th cell activation. Indeed, this has been shown to occur both *in vitro* and *in vivo* (Baxevanis et al., 1980; Nepom et al., 1981; Rosenbaum et al., 1983). Second, down regulation of cell surface expression of MHC class II molecules has been shown to associate with immunosuppression using certain mouse anti-MHC class II antibodies (Vidovic et al., 1995). Third, killing of activated lymphoid cells occurs when certain anti-MHC class II antibodies bind to antigen expressed on the surface of these cells (Vidovic et al., 1995a). Increased selectivity of treatment is achieved since only cells expressing the specific MHC class II antigen can be targeted by a specific monoclonal antibody and hence only the immune response mediated by these allotypes is modulated. Host-defence immune reactions which are mediated by other MHC molecules are not targeted by the specific antibody and hence remain unmodulated and non-compromised.

Based on these observations, anti-class II mAb have been envisaged for a number of years as therapeutic candidates for the immunosuppressive treatment of disorders of the immune system including transplant rejection. Indeed, this hypothesis has been supported by the beneficial effect of mouse-derived anti-class II mAbs in a series of animal disease models (Waldor et al., 1983; Jonker et al., 1986; Stevens et al., 1990; Smith et al., 1994).

Despite these early supporting data, to date no anti-MHC class II mAb of human composition has been described that displays the desired immunomodulatory and other biological properties that may include affinity, inhibition of proliferation or reduction in cytokine secretion. Indeed, despite the relative ease by which mouse-derived mAbs may be obtained, work using mouse-derived mAbs has demonstrated the difficulty of obtaining an immunomodulatory antibody with the desired biological properties. For example, significant and not fully understood differences were observed in the T cell inhibitory capacity of different murine anti-class II mAbs (Naquet et al., 1983). Furthermore, the application of certain mouse-derived mAbs *in*

WO 01/87338

PCT/US01/15626

vivo was associated with unexpected side effects, sometimes resulting in death of laboratory primates (Billing et al., 1983; Jonker et al., 1991).

It is generally accepted that mouse-derived mAbs (including chimeric and so-called
5 'humanized' mAbs) carry an increased risk of generating an adverse immune
response (Human anti-murine antibody – HAMA) in patients compared to treatment
with a human mAb (for example, Vose et al, 200; Kashmiri et al., 2001). This risk is
potentially increased when treating chronic diseases such as rheumatoid arthritis or
multiple sclerosis with any mouse-derived mAb; prolonged exposure of the human
10 immune system to a non-human molecule often leads to the development of an
adverse immune reaction. Furthermore, it is has proven very difficult to obtain
mouse-derived antibodies with the desired specificity or affinity to the desired antigen
(Pichla et al. 1997). Such observations may have a significant influence or reduce the
overall therapeutic effect or advantage provided by mouse-derived mAbs. Examples
15 of disadvantages for mouse-derived mAbs may include the following. First, mouse-
derived mAbs may be limited in the medical conditions or length of treatment for a
condition for which they are appropriate. Second, the dose rate for mouse-derived
mAbs may need to be relatively high in order to compensate for a relatively low
affinity or therapeutic effect (low affinity or therapeutic effect are not associated with
20 murine origin. Half life in the human body, however, may be, as a murine mab would
likely be cleared more quickly from the blood. This could also necessitate higher
dosing), hence making the dose not only more severe but potentially more
immunogenic and perhaps dangerous. Third, such restrictions in suitable treatment
regimes and high-dose rates that require high production amounts may significantly
25 add to the cost of treatment and could mean that such a mouse-derived mAb be
uneconomical to develop as a commercial therapeutic. Finally, even if a mouse mAb
could be identified that displayed the desired specificity or affinity, often these desired
features are detrimentally affected during the 'humanization' or 'chimerization'
procedures necessary to reduce immunogenic potential (Slavin-Chiorini et al., 1997).
30 Once a mouse-derived mAb has been 'humanized' or chimerized, then it is very
difficult to optimize its specificity or affinity.

The art has sought over a number of years for anti-MHC class II mAbs of human
composition that show immunomodulatory and other biological properties suitable for

WO 01/87338

PCT/US01/15626

use in a pharmaceutical composition for the treatment of humans. Workers in the field have practised the process steps of first identifying a mouse-derived mAb, and then modifying the structure of this mAb with the aim of improving immunotolerance of this non-human molecule for human patients (for further details, see Jones et al., 5 1986; Riechmann et al., 1988; Presta, 1992). This modification is typically made using so-called 'humanisation' procedures or by fabricating a human-mouse chimeric mAb. Other workers have attempted to identify human antibodies that bind to human antigens having desired properties within natural repertoires of human antibody diversity. For example, by exploring the foetal-tolerance mechanism in pregnant 10 women (Bonagura et al., 1987) or by panning libraries of natural diversities of antibodies (Stausbøl-Grøn et al., 1996; Winter et al., 1994). However, to date no anti-MHC class II mAb of human composition has been described that displays the desired biological properties of immunomodulation, specificity, low immunogenicity and affinity.

15

Summary of the Invention

One aspect of the present invention provides a composition including a polypeptide comprising at least one antibody-based antigen-binding domain of human composition with a binding specificity for an antigen expressed on the surface of a 20 cell. In preferred embodiments, treating cells (lymphoids or non-lymphoid cells) expressing the antigen with one or more of the polypeptides causes or leads to suppression of an immune response, e.g., wherein the IC50 for the suppressive activity is 1 μ M or lower, and even more preferably 100nM, 10nM or even 1nM or less.

25 In certain preferred embodiments, the antibody-based antigen-binding domain comprises a monovalent antibody fragment selected from Fv, scFv, dsFv and Fab fragment. In other preferred embodiments, the polypeptide comprises an F(ab)₂ antibody fragment or a mini-antibody fragment. In a further preferred embodiment the polypeptide is a multivalent composition comprising at least one full antibody 30 selected from IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA and IgM.

According to a preferred embodiment, the polypeptide is directed to a lymphoid cell or a non-lymphoid cell that expresses MHC class II molecules. The latter type of cells occurs for example at pathological sites of inflammation and/or diseases of the

WO 01/87338

PCT/US01/15626

immune system. Said cells may include synovial cells, endothelial cells, thyroid stromal cells and glial cells.

5 In certain embodiments, the polypeptide binds to at least one epitope in the alpha-chain of an HLA-DR molecule. According to a further preferred embodiment, the polypeptide binds to at least one epitope of the first domain of the alpha-chain of HLA-DR, e.g., the polypeptide binds to at least one epitope within the alpha-helix ranging from Glu⁹⁵ to Tyr⁹⁹ of the alpha-chain of HLA-DR.

10 In certain preferred embodiments, the polypeptide binds to at least one epitope in the beta-chain of an HLA-DR molecule, and preferably binds to at least one epitope of the first domain of the beta-chain of HLA-DR.

15 In certain embodiments, the subject polypeptide includes at least one antibody-based antigen-binding domain which specifically binds to a human MHC class II antigen with a Kd of 1 μ M or less, and even more preferably 100nM, 10nM or even 1nM or less. To further illustrate, the antibody-based antigen-binding domain specifically binds to a human HLA DR antigen. For instance, the antibody based antigen-binding domain can include a combination of a VH domain and a VL domain found in one of the
20 clones taken from the list of MS-GPC-1, MS-GPC-2, MS-GPC-3, MS-GPC-4, MS-GPC-5, MS-GPC-6, MS-GPC-7, MS-GPC-8, MS-GPC-10, MS-GPC-11, MS-GPC-14, MS-GPC-15, MS-GPC-16, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18, MS-GPC-8-27, MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57,
25 MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 and MS-GPC-8-27-41.

In certain embodiments, the invention provides a composition including a polypeptide having at least one antibody-based antigen-binding domain with a binding specificity
30 for a human MHC class II antigen, such as HLA DR, with a Kd of 1 μ M or less, more preferably 100nM, 10nM or even 1nM or less. The antibody based antigen-binding domain can be isolated by a method which includes isolation of VL and VH domains of human composition from a recombinant antibody library by ability to bind to human MHC class II antigen. The method may also include the further steps of:

WO 01/87338

PCT/US01/15626

- a. generating a library of variants at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences of one or both of the VL and VH domains, and
- b. isolation of VL and VH domains from the library of variants by ability to bind to human MHC class II antigen with a K_d of $1\mu\text{M}$ or less; and
- 5 c. (optionally) repeating steps (a) and (b) with further CDR1, CDR2 and CDR3 sequences.

10 In certain preferred embodiments, the antibody based antigen-binding domain of the subject polypeptides binds to the β -chain of HLA-DR, and even more preferably binds to an epitope of the first domain of the β -chain of HLA-DR.

15 One aspect of the present invention provides a multivalent composition of at least one polypeptide according to the invention is capable of leading to cell death of activated cells without requiring any further additional measures and with limited immunogenic side effects on the treated patient. Further, the multivalent composition comprising a polypeptide according to the invention has the capability of binding to at least one epitope on the target antigen, however, several epitope binding sites might be combined in one molecule. In a preferred embodiment the polypeptide is a multivalent composition comprising at least two monovalent antibody fragments selected from Fv, scFv, dsFv and Fab fragments, and further comprises a cross-linking moiety or moieties.

20

25 In a further preferred embodiment the polypeptide affects killing affects at least 50%, preferably at least 80%, of activated cells compared to killing of less than 15%, preferably less than 10%, of non-activated cells.

The compositions of the present invention can be used to treat a variety of cells, such as lymphoids and non-lymphoid cell, though preferably those which express MHC class II antigens in the case of the latter.

30

In certain preferred embodiments, the subject compositions have an IC_{50} for inhibiting IL-2 secretion of $1\mu\text{M}$ or less, and even more preferably 100nM , 10nM or even 1nM or less.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

In certain preferred embodiments, the subject compositions have an IC₅₀ for inhibiting T cell proliferation of 1 μ M or less, and even more preferably 100nM, 10nM or even 1nM or less.

5 The composition of the present invention include polypeptides wherein the antibody based antigen-binding domain binds to one or more HLA-DR types selected from the group consisting of DR1-0101, DR2-15021, DR3-0301, DR4Dw4-0401, DR4Dw10-0402, DR4Dw14-0404, DR6-1302, DR6-1401, DR8-8031, DR9-9012, DRw53-B4*0101 and DRw52-B3*0101. In preferred embodiments, the antigen binding
10 domains of the subject compositions provide broad-DR reactivity, that is, the antigen-binding domain(s) of a given composition binds to epitopes on at least 3, and more preferably at least 5 or even 7 different of said HLA-DR types. In certain embodiments, the antigen binding domain(s) of a polypeptide(s) of the subject compositions binds to a plurality of HLA-DR types as to bind to HLA DR expressing cells for at least 60 percent of the human population, more preferably at least 75 percent, and even more preferably 85
15 percent of the human population.

In certain embodiments, the antibody based antigen-binding domain includes a combination of a VH domain and a VL domain, wherein the combination is found in
20 one of the clones taken from the list MS-GPC-1, MS-GPC-2, MS-GPC-3, MS-GPC-4, MS-GPC-5, MS-GPC-6, MS-GPC-7, MS-GPC-8, MS-GPC-10, MS-GPC-11, MS-GPC-14, MS-GPC-15, MS-GPC-16, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18, MS-GPC-8-27, MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-
25 GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 and MS-GPC-8-27-41.

In other embodiments, the antibody based antigen-binding domain includes a combination of HuCAL VH2 and HuCAL VA1, wherein the VH CDR3, VL CDR1 and VL CDR3 is found in one of the clones taken from the list of list MS-GPC-1, MS-GPC-
30 4, MS-GPC-7, MS-GPC-8, MS-GPC-10, MS-GPC-11, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18, MS-GPC-8-27, MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 and MS-GPC-8-27-41.

35

WO 01/87338

PCT/US01/15626

In certain preferred embodiments, the antibody based antigen-binding domain includes a combination of HuCAL VH2 and HuCAL VA1, wherein the VH CDR3 sequence is taken from the consensus CDR3 sequence

nnnnRGnFDn

- 5 wherein each n independently represents any amino acid residue; and/or wherein the VL CDR3 sequence is taken from the consensus CDR3 sequence

QSYDnnnn

- 10 wherein each n independently represents any amino acid residue. Preferably, the VH CDR3 sequence is SPRYGAFDY and/or the VL CDR3 sequence is QSYDLIRH or QSYDMNVH.

- 15 In certain embodiments, the antibody based antigen-binding domain competes for antigen-binding with an antibody including a combination of HuCAL VH2 and HuCAL VA1. Preferably, the VH CDR3 sequence of the competing antibody is taken from the consensus CDR3 sequence

nnnnRGnFDn

each n independently represents any amino acid residue; and/or the VL CDR3 sequence is taken from the consensus CDR3 sequence

QSYDnnnn

- 20 each n independently represents any amino acid residue. In preferred embodiments, the VH CDR3 sequence is SPRYGAFDY and/or the VL CDR3 sequence is QSYDLIRH or QSYDMNVH.

- 25 The antibody based antigen-binding domains of the subject polypeptide can include a VL CDR1 sequence represented in the general formula

SGSnnNIGnNYVn

wherein each n independently represents any amino acid residue. In preferred embodiments, the CDR1 sequence is SGSESNIGNNYVQ.

- 30 In certain embodiments of the composition of the present invention, suppression of an immune response is brought about by or manifests itself in down-regulation of expression of said antigen expressed on the surface of said cell. Suppression of an immune response may also, or additionally, be brought about by or manifests itself in inhibition of the interaction between said cell and other cells, wherein said interaction

WO 01/87338

PCT/US01/15626

would normally lead to an immune response, or the killing of the cells. In the instance of the latter, the killing can be mediated by treating the cells expressing antigen with a plurality of antibody based antigen-binding domains, each of the antibody based antigen-binding domains being part of at least one multivalent polypeptide. In such instances, neither cytotoxic entities nor immunological mechanisms are needed to causes or leads to said killing.

In preferred embodiments of the subject polypeptide compositions, the killing affects at least 50%, preferably at least 75%, more preferably at least 85% of activated cells compared to killing of less than 30%, preferably less than 20%, more preferably less than 10% of non activated cells.

The compositions of the subject invention can also be characterized by inducing cell killing that is mediated by an innate, pre-programmed process of the cells. Where cell killing is an activity of the subject polypeptides, the killing is preferably non-apoptotic, and dependent on the action of non-caspase proteases, e.g., the killing is independent of caspases that can be inhibited by zVAD-fmk or zDEVD-fmk.

In certain preferred embodiments, the composition of the present invention include antibody fragments selected from Fv, scFv, dsFv, Fab fragments, F(ab')₂, and mini-antibody fragments. The subject compositions can also include at least one full antibody, e.g., selected from the antibodies of classes IgG1, 2a, 2b, 3, 4, IgA, and IgM.

In certain instances, it may be desirable for subject compositions to include a cross-linking moiety or moieties, such that the antigen-binding sites are cross-linked to a polymer.

In preferred embodiments, the subject compositions can be formulated in a pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent. For example, the subject invention specifically contemplates a pharmaceutical preparation including the subject antigen-binding composition in an amount sufficient to suppress an immune response in an animal, such as where said animal is human.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

The present invention provides a pharmaceutical preparation including the subject antigen binding composition in an amount sufficient to inhibit IL-2 secretion in an animal, such as a human.

- 5 The present invention provides a pharmaceutical preparation including the subject antigen binding composition in an amount sufficient to inhibit T cell proliferation in an animal, such as where said animal is human.

The subject method also provides diagnostic compositions including the antigen binding compositions

10

In still another embodiment, the subject method utilizes the antigen-binding compositions of present invention for preparing a pharmaceutical preparation for the treatment of animals, such as where said animals are human.

- 15 The present invention also provides nucleic acid including a protein coding sequence for polypeptide comprising at least one antibody-based antigen-binding domain of human composition with a binding specificity for an antigen expressed on the surface of a cell. In preferred embodiments, treating cells expressing the antigen with a polypeptide encoded by the nucleic acid causes or leads to suppression of an immune response, e.g., wherein the IC50 for the suppressive activity is 1 μ M or lower, and even more preferably 100nM, 10nM or even 1nM or less. Vectors including the protein coding sequence, and a transcriptional regulatory sequence operably linked thereto, are specifically contemplated, as are cells harboring the nucleic acid or the
- 20
- 25 vector.

Such recombinant host cells can be used for the production of an immunosuppressive composition, by culturing the cells under conditions wherein the nucleic acid is expressed.

- 30 Another aspect of the present invention provides a method for suppressing activation and/or proliferation of a cell of the immune system, by treating the cell with a composition of a polypeptide including at least one antibody-based antigen-binding domain of human composition with a binding specificity for an antigen expressed on

WO 01/87338

PCT/US01/15326

the surface of a cell. In preferred embodiments, treating cells expressing the antigen with a polypeptide encoded by the nucleic acid causes or leads to suppression of an immune response, e.g., wherein the IC50 for the suppressive activity is 1 μ M or lower, and even more preferably 100nM, 10nM or even 1nM or less. Similar methods can be used to inhibit IL-2 expression and/or cell-cell interactions involving cells of the immune system. In certain preferred embodiments, the subject method can be used for immunosuppressing a patient, e.g., by administering to the patient an effective amount of the antigen-binding composition.

- 5
- 10 Yet another aspect of the invention provides a method for killing a cell expressing an antigen on the surface of said cell comprising the step of treating the cell with a composition including a plurality of antibody based antigen-binding domains, e.g., as described above, wherein the antibody based antigen-binding domains are part of at least one multivalent polypeptide, and where neither cytotoxic entities nor immunological mechanisms are needed to cause or lead to said killing. Preferably, the antibody based antigen-binding domains bind to HLA DR.

15

Such methods can be used used for treating a disorder selected from rheumatoid arthritis, juvenile arthritis, multiple sclerosis, Grave's disease, insulin-dependent diabetes, narcolepsy, psoriasis, systemic lupus erythematosus, ankylosing spondylitis, transplant rejection, graft vs. host disease, Hashimoto's disease, myasthenia gravis, pemphigus vulgaris, glomerulonephritis, thyroiditis, pancreatitis, insulinitis, primary biliary cirrhosis, irritable bowel disease and Sjogren syndrome.

- 20
- 25 In still another embodiment, there is provided a method to identify patients that can be treated with a antigen-binding composition of the present invention, including the steps of
- a. Isolating cells from a patient;
 - b. Contacting said cells with a composition of the antigen-binding polypeptides; and
 - c. Measuring the degree of killing, immunosuppression, IL2 secretion or proliferation of said cells.
- 30

Such as method can be carried out using, e.g., a kit comprising

WO 01/87338

PCT/US01/15626

- a. an antigen-binding composition of the present invention, and
- b. a cross-linking moiety, and/or a detectable moiety or moieties (optionally including reagents and/or solutions to effect and/or detect binding to an antigen).

5

In yet other embodiments, the subject method provides a cytotoxic composition comprising the subject antigen-binding composition operably linked to a cytotoxic agent.

- 10 Another embodiment provides an immunogenic composition comprising the subject antigen-binding composition operably linked to an immunogenic agent.

Still another aspect of the invention provides a method to kill a cell expressing an antigen on the surface of said cell, comprising contacting said cell with an antigen-binding composition of the present invention operably linked to a cytotoxic or immunogenic agent. In this regard, the invention also specifically contemplates the use of the subject antigen-binding compositions operably linked to a cytotoxic or immunogenic agent for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of animals

15

20 Yet another aspect of the present invention provides a method for conducting a pharmaceutical business comprising:

- (i) isolating one or more antibody based antigen-binding domains that bind to MHC class II expressed on the surface of human cells with a K_d of 25 $1\mu\text{M}$ or less;
- (ii) generating a composition comprising said antibody based antigen-binding domains, which composition is immunosuppressant with an IC_{50} of 100nM or less;
- (iii) conducting therapeutic profiling of said composition for efficacy and toxicity in animals;
- (iv) preparing a package insert describing the use of said composition for immunosuppression therapy; and
- (v) marketing said composition for use as an immunosuppressant.

25

30

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Another embodiment for a method of conducting a life science business includes:

- (i) isolating one or more antibody based antigen-binding domains that bind to MHC class II expressed on the surface of human cells with a Kd of 1 μ M or less;
- 5 (ii) generating a composition comprising said antibody based antigen-binding domains, which composition is immunosuppressant with an IC50 of 100nM or less;
- (iii) licensing, jointly developing or selling, to a third party, the rights for selling said composition.

10

According to the subject business methods, the antibody based antigen-binding domain can be isolated by a method which includes

- a. isolation of VL and VH domains of human composition from a recombinant antibody library by ability to bind to HLA DR,
- 15 b. generating a library of variants at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences of one or both of the VL and VH domains, and
- c. isolation of VL and VH domains from the library of variants by ability to bind to HLA DR with a Kd of 1 μ M or less.

According to the subject business methods, the antigen-binding domain can be a combination of VH and VL domains found in the clones taken from the list of MS-GPC-1, MS-GPC-2, MS-GPC-3, MS-GPC-4, MS-GPC-5, MS-GPC-6, MS-GPC-7, MS-GPC-8, MS-GPC-10, MS-GPC-11, MS-GPC-14, MS-GPC-15, MS-GPC-16, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18, MS-GPC-8-27, MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, 25 MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 and MS-GPC-8-27-41.

As used herein, the term "peptide" relates to molecules consisting of one or more chains of multiple, i. e. two or more, amino acids linked via peptide bonds.

30

The term "protein" refers to peptides where at least part of the peptide has or is able to acquire a defined three-dimensional arrangement by forming secondary, tertiary, or quaternary structures within and/or between its peptide chain(s). This definition comprises proteins such as naturally occurring or at least partially artificial proteins,

WO 01/87338

PCT/US01/15626

as well as fragments or domains of whole proteins, as long as these fragments or domains are able to acquire a defined three-dimensional arrangement as described above.

5 The term "polypeptide" is used interchangeably to refer to peptides and/or proteins. Moreover, the terms "polypeptide" and "protein", as the context will admit, include multi-chain protein complexes, such as immunoglobulin polypeptides having separate heavy and light chains.

10 In this context, a "polypeptide comprising at least one antibody-based antigen-binding domain" refers to an immunoglobulin (e.g. IgG, IgA or IgM molecules or antibody) or to a functional fragment thereof. The term "functional fragment", or "antibody fragment" as it may be occasionally referred to, refers to a fragment of an immunoglobulin which retains the antigen-binding moiety of an immunoglobulin.

15 Functional immunoglobulin fragments according to the present invention may be Fv (Skerra and Plückhün, 1988), scFv (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988), disulfide-linked Fv (Glockshuber et al., 1992; Brinkmann et al., 1993), Fab, F(ab')₂ fragments or other fragments well-known to the practitioner skilled in the art, which comprise the variable domains of an immunoglobulin or functional immunoglobulin fragment.

20 Examples of polypeptides consisting of one chain are single-chain Fv antibody fragments, and examples for polypeptides consisting of more chains are Fab antibody fragments.

25 The term "antibody" as used herein, unless indicated otherwise, is used broadly to refer to both antibody molecules and a variety of antibody derived molecules. Such antibody derived molecules comprise at least one variable region (either a heavy chain or light chain variable region) and include such fragments as described above, as well as individual antibody light chains, individual antibody heavy chains, chimeric fusions between antibody chains and other molecules, and the like.

30

For the purposes of this application, "valent" refers to the number of antigen binding sites the subject polypeptide possess. Thus, a bivalent polypeptide refers to a

WO 01/87338

PCT/US01/15626

polypeptide with two binding sites. The term "multivalent polypeptide" encompasses bivalent, trivalent, tetravalent, etc. forms of the polypeptide.

5 The "antigen-binding site" of an immunoglobulin molecule refers to that portion of the molecule that is necessary for binding specifically to an antigen. An antigen binding site preferably binds to an antigen with a K_d of $1\mu\text{M}$ or less, and more preferably less than 100nM , 10nM or even 1nM in certain instances. Binding specifically to an antigen is intended to include binding to the antigen which significantly higher affinity than binding to any other antigen.

10

The antigen binding site is formed by amino acid residues of the N-terminal variable ("V") regions of the heavy ("H") and light ("L") chains. Three highly divergent stretches within the V regions of the heavy and light chains are referred to as "hypervariable regions" which are interposed between more conserved flanking stretches known as "framework regions," or "FRs". Thus the term "FR" refers to amino acid sequences which are naturally found between and adjacent to hypervariable regions in immunoglobulins. In an antibody molecule, the three hypervariable regions of a light chain and the three hypervariable regions of a heavy chain are disposed relative to each other in three dimensional space to form an antigen-binding surface. The antigen-binding surface is complementary to the three-dimensional surface of a bound antigen, and the three hypervariable regions of each of the heavy and light chains are referred to as "complementarity-determining regions," or "CDRs."

25 Accordingly, an "antibody-based antigen-binding domain" refers to polypeptide or polypeptides which form an antigen-binding site retaining at least some of the structural features of an antibody, such as at least one CDR sequence. In certain preferred embodiments, antibody-based antigen-binding domain includes sufficient structure to be considered a variable domain, such as three CDR regions and interspersed framework regions. Antibody-based antigen-binding domain can be formed single polypeptide chains corresponding to VH or VL sequences, or by intermolecular or intramolecular association of VH and VL sequences.

30 The term "recombinant antibody library" describes a collection of display packages, e.g., biological particles, which each have (a) genetic information for expressing at

WO 01/87338

PCT/US01/15626

least one antigen binding domain on the surface of the particle, and (b) genetic information for providing the particle with the ability to replicate. For instance, the package can display a fusion protein including an antigen binding domain. The antigen binding domain portion of the fusion protein is presented by the display package in a context which permits the antigen binding domain to bind to a target epitope that is contacted with the display package. The display package will generally be derived from a system that allows the sampling of very large variegated antibody libraries. The display package can be, for example, derived from vegetative bacterial cells, bacterial spores, and bacterial viruses.

10

In an exemplary embodiment of the present invention, the display package is a phage particle which comprises a peptide fusion coat protein that includes the amino acid sequence of a test antigen binding domains. Thus, a library of replicable phage vectors, especially phagemids (as defined herein), encoding a library of peptide fusion coat proteins is generated and used to transform suitable host cells. Phage particles formed from the chimeric protein can be separated by affinity selection based on the ability of the antigen binding site associated with a particular phage particle to specifically bind a target epitope. In a preferred embodiment, each individual phage particle of the library includes a copy of the corresponding phagemid encoding the peptide fusion coat protein displayed on the surface of that package. Exemplary phage for generating the present variegated peptide libraries include M13, f1, fd, If1, Ike, Xf, Pf1, Pf3, λ , T4, T7, P2, P4, ϕ X-174, MS2 and f2.

The term "generating a library of variants of at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3" refers to a process of generating a library of variant antigen binding sites in which the members of the library differ by one or more changes in CDR sequences, e.g., not FR sequences. Such libraries can be generated by random or semi-random mutagenesis of one or more CDR sequences from a selected antigen binding site.

As used herein, an "antibody-based antigen-binding domain of human composition" preferably means a polypeptide comprising at least an antibody VH domain and an antibody VL domain, wherein a homology search in a database of protein sequences comprising immunoglobulin sequences results for both the VH and the VL domain in an immunoglobulin domain of human origin as hit with the highest degree of

WO 01/87338

PCT/US01/15626

sequence identity. Such a homology search may be a BLAST search, e.g. by accessing sequence databases available through the National Center for Biological Information and performing a "BasicBLAST" search using the "blastp" routine. See also Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Preferably, such a composition does not result in an adverse immune response thereto when administered to a human recipient. In certain preferred embodiments, the subject antigen-binding domains of human composition include the framework regions of native human immunoglobulins, as may be cloned from activated human B cells, though not necessarily all of the CDRs of a native human antibody.

10

As used herein, the term "mini-antibody fragment" means a multivalent antibody fragment comprising at least two antigen-binding domains multimerized by self-associating domains fused to each of said domains (Pack, 1994), e.g. dimers comprising two scFv fragments, each fused to a self-associating dimerization domain.

15

Dimerization domains, which are particularly preferred, include those derived from a leucine zipper (Pack and Plückthun, 1992) or helix-turn-helix motif (Pack et al., 1993).

As used herein, "activated cells" means cells of a certain population of interest, which are not resting. Activation might be caused by antigens, mitogens (e.g.,

20

lipopolysaccharide, phytohemagglutinine) or cytokines (e.g., interferon gamma).

Preferably, said activation occurs during the stimulation of resting T and B cells in the course of the generation of an immune response. Activated cells may be certain lymphoid tumour cells. Preferably, activated cells are characterised by the feature of MHC class II molecules expressed on the cell surface and one or more additional

25

feature including increased cell size, cell division, DNA replication, expression of CD45 or CD11 and production/secretion of immunoglobulin.

As used herein, "non-activated cells" means cells of a population of interest, the vast majority of which are resting and non-dividing. Said non-activated cells may include

30

resting B cells as purified from healthy human blood. Such cells can, preferably, be characterised by lack or reduced level of MHC class II molecules expressed on the cell surface and lack or reduced level of one or more additional features including increased cell size, cell division, DNA replication, expression of CD45 or CD11 and production/secretion of immunoglobulin.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

"Lymphoid cells" when used in reference to a cell line or a cell, means that the cell line or cell is derived from the lymphoid lineage and includes cells of both the B and the T lymphocyte lineages, and the macrophage lineage.

5

"Non lymphoid cells and express MHC class II" means cells other than lymphoid cells that express MHC class II molecules during a pathological inflammatory response. For example, said cells may include synovial cells, endothelial cells, thyroid stromal cells and glial cells and it may also comprise genetically altered cells capable of expressing MHC-class II molecules.

10

As used herein, the term "first domain of the alpha-chain of HLA-DR" means the N-terminal domain of the alpha-chain.

15 As used herein, the term "first domain of the beta-chain of HLA-DR" means the N-terminal domain of the beta-chain.

As used herein, the term "modulation of the immune response" relates to the changes in activity of the immune response of an individual or to changes of an *in vitro* system resembling parts of an immune system. Said changes in activity are causing or leading to immunosuppression.

20

The term "immunosuppress" refers to the prevention or diminution of the immune response, as by irradiation or by administration of antimetabolites, antilymphocyte serum, or specific antibody.

25

The term "immune response" refers to any response of the immune system, or a cell forming part of the immune system (lymphocytes, granulocytes, macrophages, etc), to an antigenic stimulus, including, without limitation, antibody production, cell-mediated immunity, and immunological tolerance.

30

As used herein, the term "IC50" with respect immunosuppression, refers to the concentration of the subject compositions which produces 50% of its maximum response or effect, such as inhibition of an immune response, such as may be

WO 01/87338

PCT/US01/15626

manifest by T-cell activation (cellular response) or B-cell activation (humoral response).

5 The terms "apoptosis" and "apoptotic activity" refer to the form of cell death in mammals that is accompanied by one or more characteristic morphological and biochemical features, including nuclear and condensation of cytoplasm, chromatin aggregation, loss of plasma membrane microvilli, partition of cytoplasm and nucleus into membrane bound vesicles (apoptotic bodies) which contain ribosomes, morphologically intact mitochondria and nuclear material, degradation of
10 chromosomal DNA or loss of mitochondrial function. Apoptosis follows a very stringent time course and is executed by caspases, a specific group of proteases. Apoptotic activity can be determined and measured, for instance, by cell viability assays, Annexin V staining or caspase inhibition assays. Apoptosis can be induced using a cross-linking antibody such as anti-CD95 as described in Example H.

15 The term "innate pre-programmed process" refers to a process that, once it is started, follows an autonomous cascade of mechanisms within a cell, which does not require any further auxiliary support from the environment of said cell in order to complete the process.

20 As used herein, the term "HuCAL" refers to a fully synthetic human combinatorial antibody library as described in Knappik et al. (2000).

As used herein, the term "CDR3" refers to the third complementarity-determining region of the VH and VL domains of antibodies or fragments thereof, wherein the VH CDR3 covers positions 95 to 102 (possible insertions after positions 100 listed as 100a to 100z), and VL CDR3 positions 89 to 96 (possible insertions in VL after position 95 listed as 95a to 95c) (see Knappik et al., 2000).

30 The term "variable region" as used herein in reference to immunoglobulin molecules has the ordinary meaning given to the term by the person of ordinary skill in the act of immunology. Both antibody heavy chains and antibody light chains may be divided into a "variable region" and a "constant region". The point of division between a variable region and a heavy region may readily be determined by the person of

WO 01/87338

PCT/US01/15626

ordinary skill in the art by reference to standard texts describing antibody structure, e.g., Kabat et al "Sequences of Proteins of Immunological Interest: 5th Edition" U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991).

5 As used herein, the term "hybridises under stringent conditions" is intended to describe conditions for hybridisation and washing under which nucleotide sequences at least 60% homologous to each other typically remain hybridised to each other. Preferably, the conditions are such that at least sequences at least 65%, more preferably at least 70%, and even more preferably at least 75% homologous to each
10 other typically remain hybridised to each other. Such stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1999), 6.3.1-6.3.6. A preferred, non-limiting example of stringent hybridisation conditions is hybridisation in 6x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2x SSC, 0.1% SDS
15 at 50°-65°C.

A "protein coding sequence" or a sequence which "encodes" a particular polypeptide or peptide, is a nucleic acid sequence which is transcribed (in the case of DNA) and translated (in the case of mRNA) into a polypeptide in vitro or in vivo when placed
20 under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxy) terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, cDNA from procaryotic or eukaryotic mRNA, genomic DNA sequences from procaryotic or eukaryotic DNA, and even synthetic DNA sequences.
25 A transcription termination sequence will usually be located 3' to the coding sequence.

Likewise, "encodes", unless evident from its context, will be meant to include DNA sequences which encode a polypeptide, as the term is typically used, as well as DNA
30 sequences which are transcribed into inhibitory antisense molecules.

As used herein, the term "transfection" means the introduction of a heterologous nucleic acid, e.g., an expression vector, into a recipient cell by nucleic acid-mediated gene transfer. "Transient transfection" refers to cases where exogenous DNA does

WO 01/87338

PCT/US01/15626

not integrate into the genome of a transfected cell, e.g., where episomal DNA is transcribed into mRNA and translated into protein. A cell has been "stably transfected" with a nucleic acid construct when the nucleic acid construct is capable of being inherited by daughter cells.

5

"Expression vector" refers to a replicable DNA construct used to express DNA which encodes the desired protein and which includes a transcriptional unit comprising an assembly of (1) agent(s) having a regulatory role in gene expression, for example, promoters, operators, or enhancers, operatively linked to (2) a DNA sequence encoding a desired protein (such as a polypeptide of the present invention) which is transcribed into mRNA and translated into protein, and (3) appropriate transcription and translation initiation and termination sequences. The choice of promoter and other regulatory elements generally varies according to the intended host cell. In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of "plasmids" which refer to circular double stranded DNA loops which, in their vector form are not bound to the chromosome. In the present specification, "plasmid" and "vector" are used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors which serve equivalent functions and which become known in the art subsequently hereto.

In the expression vectors, regulatory elements controlling transcription or translation can be generally derived from mammalian, microbial, viral or insect genes. The ability to replicate in a host, usually conferred by an origin of replication, and a selection gene to facilitate recognition of transformants may additionally be incorporated. Vectors derived from viruses, such as retroviruses, adenoviruses, and the like, may be employed.

"Transcriptional regulatory sequence" is a generic term used throughout the specification to refer to DNA sequences, such as initiation signals, enhancers, and promoters and the like which induce or control transcription of protein coding sequences with which they are operably linked. It will be understood that a recombinant gene can be under the control of transcriptional regulatory sequences

WO 01/87338

PCT/US01/15626

which are the same or which are different from those sequences which control transcription of the naturally-occurring form of the gene, if any.

5 "Operably linked" when describing the relationship between two DNA regions simply means that they are functionally related to each other. For example, a promoter or other transcriptional regulatory sequence is operably linked to a coding sequence if it controls the transcription of the coding sequence.

10 As used herein, the term "fusion protein" is art recognized and refer to a chimeric protein which is at least initially expressed as single chain protein comprised of amino acid sequences derived from two or more different proteins, e.g., the fusion protein is a gene product of a fusion gene.

15 As used herein the term "animal" refers to mammals, preferably mammals such as humans. Likewise, a "patient" or "subject" to be treated by the method of the invention can mean either a human or non-human animal.

20 According to the methods of the invention, the peptide may be administered in a pharmaceutically acceptable composition. In general, pharmaceutically-acceptable carriers for monoclonal antibodies, antibody fragments, and peptides are well-known to those of ordinary skill in the art. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. In preferred embodiments, the subject carrier medium which does not interfere
25 with the effectiveness of the biological activity of the active ingredients and which is not excessively toxic to the hosts of the concentrations of which it is administered. The administration(s) may take place by any suitable technique, including subcutaneous and parenteral administration, preferably parenteral. Examples of parenteral administration include intravenous, intraarterial, intramuscular, and
30 intraperitoneal, with intravenous being preferred.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be

WO 01/87338

PCT/US01/15626

fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

15 Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds, e.g., the subject polypeptides, in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various
20 sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a
25 previously sterile-filtered solution thereof.

For oral administration the polypeptides of the present invention may be incorporated with excipients and used in the form of non-ingestible mouthwashes and dentifrices. A mouthwash may be prepared incorporating the active ingredient in the required
30 amount in an appropriate solvent, such as a sodium borate solution (Dobell's Solution). The active ingredient may also be dispersed in dentifrices, including: gels, pastes, powders and slurries. The active ingredient may be added in a therapeutically effective amount to a paste dentifrice that may include water, binders, abrasives, flavoring agents, foaming agents, and humectants.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

The compositions of the present invention may be formulated in a neutral or salt form. Pharmaceutically-acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

10 For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion, (see for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Moreover, for human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

25 Upon formulation, solutions can be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms such as injectable solutions, drug release capsules and the like.

30 As used herein, the term "prophylactic or therapeutic" treatment refers to administration to the host of the medical condition, e.g., to cause immunosuppression. If it is administered prior to exposure to the condition, the

WO 01/87338

PCT/US01/15626

treatment is prophylactic, whereas if administered after infection or initiation of the disease, the treatment is therapeutic.

The polypeptide according to the invention is comprising at least one antibody-based antigen-binding domain of human composition with binding specificity for a human
5 MHC class II antigen, wherein binding of said polypeptide to said antigen expressed on the surface of a cell causes or leads to a modulation of the immune response.

The present invention further relates to a pharmaceutical composition containing at least one antigen-binding polypeptide according to the invention, optionally together
10 with a pharmaceutical acceptable carrier and/or diluent. The polypeptide according to the invention is preferably used for preparing a pharmaceutical composition for treating animals, preferably humans. The polypeptide according to the invention is preferably useful for the treatment or prevention of a condition characterised by MHC class II-mediated activation of T and/or B cells. In a further preferred embodiment
15 said treatment is the treatment or prevention of a condition characterised by expression of MHC class II expression at pathological sites of inflammation. In a further preferred embodiment said treatment is the treatment or prevention of diseases of the immune system.

20 In a preferred embodiment the antigen-binding compositions of the invention can be used in the treatment of diseases of the immune system including conditions such as rheumatoid arthritis, juvenile arthritis, multiple sclerosis, Grave's disease, narcolepsy, psoriasis, systemic lupus erythematosus, transplant rejection, graft vs. host disease, Hashimoto's disease, myasthenia gravis, pemphigus vulgaris, glomerulonephritis,
25 thyroiditis, insulinitis, primary biliary cirrhosis, irritable bowel disease and Sjogren syndrome.

The invention further relates to a diagnostic composition containing at least one polypeptide and/or nucleic acid according to the invention optionally together with
30 further reagents, such as buffers, for performing the diagnosis.

Additionally, the present invention relates to a kit comprising (i) a polypeptide according to the present invention, (ii) a detectable moiety or moieties, and (iii) reagents and/or solutions to effect and/or detect binding of (i) to an antigen.

Brief Description of the Drawings**5 Figure 1**

a. Specificity of the anti-HLA-DR antibody fragments: Binding of MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-27-41, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8 and MS-GPC-8-6 to HLA-DR protein, negative control proteins (BSA, testosterone-BSA, lysozyme and human apotransferrin), and an empty microtiter plate well (plastic). Specificity was assessed using standard
10 ELISA procedures.

b. Specificity of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15 & 16 isolated from the HuCAL library to HLA-DR protein, a mouse-human chimeric HLA protein and negative control proteins (lysozyme, transferrin,
15 BSA and human gamma-globulin). Specificity was assessed using standard ELISA procedures. A non-related antibody fragment (irr. scFv) was used as control.

Figure 2

Reactivity of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10,
20 11, 14, 15 & 16 and of the IgG forms of MS-GPC-8, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-41 & MS-GPC-8-6-17 to various cell lines expressing MHC class II molecules. "+" represents strong reactivity as detected using standard immunofluorescence procedure. "+/-" represents weak reactivity and "-" represents no detected reactivity between an anti-HLA-DR antibody fragment or IgG and a particular cell line.

25

Figure 3

Viability of tumor cells in the presence of monovalent and cross-linked anti-HLA-DR antibody fragments as assessed by trypan blue staining. Viability of GRANTA-519 cells was assessed after 4 h incubation with anti-HLA-DR antibody fragments (MS-
30 GPC-1, 6, 8 and 10) with and without anti-FLAG M2 mAb as cross-linking agent.

Figure 4

Scatter plots and fitted logistic curves of data from Table 5 showing improved killing efficiency of 50 nM solutions of the IgG form of the human antibody fragments of the

WO 01/87338

PCT/US01/15626

invention treated compared to treatment with 200 nM solutions of murine antibodies. Open circles represent data for cell lines treated with the murine antibodies L243 and 8D1 and closed circles for human antibodies MS-GPC-8, MS-GPC-8-27-41, MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-6-13. Fitted logistic curves for human (solid) and mouse (dashed) mAb cell killing data show the overall superiority of the treatment with human mAbs at 50 nM compared to the mouse mAbs despite treatment at a final concentration of 200 nM.

Figure 5

10 Killing of activated versus non-activated cells. MHH-PREB-1 cells are activated with Lipopolysaccharide, Interferon-gamma and phyto-hemagglutinin, and subsequently incubated for 4 h with 0.07 to 3300 nM of the IgG forms of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-27-41. No loss of viability in the control non-activated MHH-PREB-1 cells is seen.

15

Figure 6

Killing efficiency of control (no antibody, non-cytotoxic murine IgG 1oF12; light grey), and human (MS-GPC-8, MS-GPC-8-10-57 & MS-GPC-8-27-41; dark grey) IgG forms of anti-HLA-DR antibody fragments against CLL cells isolated from patients. Left panel, box-plot display of viability data from 10 patient resting cell cultures against antibodies after incubation for four (h4) and twenty four hours (h24). Right panel box-plot display of viability data from 6 patient activated cell cultures against antibodies after incubation for four (h4) and twenty four hours (h24).

Figure 7

25 Concentration dependent cell viability for certain anti-HLA-DR antibody fragments of the invention. Vertical lines indicate the EC50 value estimated by logistic non-linear regression on replica data obtained for each of the antibody fragments. a) Killing curves of cross-linked bivalent anti-HLA-DR antibody F(ab) fragment dimers MS-GPC-10 (circles and solid line), MS-GPC-8 (triangles and dashed line) and MS-GPC-1 (crosses and dotted line). b) Killing curves of cross-linked bivalent anti-HLA-DR antibody (Fab) fragment dimers MS-GPC-8-17 (circles and solid line), and murine IgGs 8D1 (triangles and dashed line) and L243 (crosses and dotted line). c) Killing curves of cross-linked bivalent anti-HLA-DR antibody (Fab) fragment dimers GPC-8-

30

WO 01/87338

PCT/US01/15626

6-2 (triangles and dashed line), and murine IgGs 8D1 (circles and solid line) and L243 (crosses and dotted line). d) Killing curves of IgG forms of human anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8-10-57 (crosses and dotted line), MS-GPC-8-27-41 (exes and dash-dot line), and murine IgGs 8D1 (circles and solid line) and L243 (triangles and dashed line). All concentrations are given in nM of the bivalent agent (IgG or cross-linked (Fab) dimer).

Figure 8

- 10 a. Incubation of Priess cells with the anti-HLA-DR antibody fragment MS-GPC-8, cross-linked using the anti-FLAG M2 mAb, shows more rapid killing than a culture of Priess cells induced into apoptosis using anti-CD95 mAb. An Annexin V/PI staining technique identifies necrotic cells by Annexin V positive and PI positive staining.
- 15 b. Incubation of Priess cells with the anti-HLA-DR antibody fragment MS-GPC-8, cross-linked using the anti-FLAG M2 mAb, shows little evidence of an apoptotic mechanism compared to an apoptotic culture of Priess cells induced using anti-CD95 mAb. An Annexin V/PI staining technique identifies apoptotic cells by Annexin V positive and PI negative staining.

Figure 9

- 20 a. Immunosuppressive properties of the IgG forms of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-41 & MS-GPC-8-6-13 using an assay to determine inhibition of IL-2 secretion from T-hybridoma cells.
- 25 b. Immunosuppressive properties of the monovalent Fab forms of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8-27-41 & MS-GPC-8-6-19 using an assay to determine inhibition of IL-2 secretion from T-hybridoma cells.
- Concentrations for the IgG forms (bivalent) are represented as molar concentrations, while those for the Fab forms (monovalent) are expressed in terms of half the concentration of the Fab form to enable direct comparison to concentrations of IgG forms.

30

Figure 10

Immunosuppressive properties of the IgG forms of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-27-41 in an assay to determine inhibition of T cell proliferation.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Figure 11

Vector map and sequence of scFv phage display vector pMORPH13_scFv.

The vector pMORPH13_scFv is a phagemid vector comprising a gene encoding a fusion between the C-terminal domain of the gene III protein of filamentous phage and a HuCAL scFv. In Figure 11, a vector comprising a model scFv gene (combination of VH1A and VA3 (Knappik et al., 2000) is shown.

The original HuCAL master genes (Knappik et al. (2000); see Fig. 3 therein) have been constructed with their authentic N-termini: VH1A, VH1B, VH2, VH4 and VH6 with Q (=CAG) as the first amino acid. VH3 and VH5 with E (=GAA) as the first amino acid. Vector pMORPH13_scFv comprises the short FLAG peptide sequence (DYKD) fused to the VH chain, and thus all HuCAL VH chains in, and directly derived from, this vector have E (=GAA) at the first position (e.g. in pMx7_FS vector, see Figure 12).

15

Figure 12

Vector map and sequence of scFv expression vector pMx7_FS_5D2.

The expression vector pMx7_FS_5D2 leads to the expression of HuCAL scFv fragments (in Figure 12, the vector comprises a gene encoding a "dummy" antibody fragment called "5D2") when VH-CH1 is fused to a combination of a FLAG tag (Hopp et al., 1988; Knappik and Plückthun, 1994) and a STREP tag II (WSHPQFEK) (IBA GmbH, Göttingen, Germany; see: Schmidt and Skerra, 1993; Schmidt and Skerra, 1994; Schmidt et al., 1996; Voss and Skerra, 1997).

Figure 13

Vector map and sequence of Fab expression vector pMx9_Fab_GPC8.

The expression vector pMx9_Fab_GPC8 leads to the expression of HuCAL Fab fragments (in Figure 13, the vector comprises the Fab fragment MS-GPC8) when VH-CH1 is fused to a combination of a FLAG tag (Hopp et al., 1988; Knappik and Plückthun, 1994) and a STREP tag II (WSHPQFEK) (IBA GmbH, Göttingen, Germany; see: Schmidt and Skerra, 1993; Schmidt and Skerra, 1994; Schmidt et al., 1996; Voss and Skerra, 1997).

In pMx9_Fab vectors, the HuCAL Fab fragments cloned from the scFv fragments (see figure caption of Figure 11) do not have the short FLAG peptide sequence

WO 01/87338

PCT/US01/15626

(DYKD) fused to the VH chain, and all HuCAL VH chains in, and directly derived from, that vector have Q (=CAG) at the first position

Figure 14

- 5 Vector map and sequence of Fab phage display vector pMORPH18_Fab_GPC8.
The derivatives of vector pMORPH18 are phagemid vectors comprising a gene encoding a fusion between the C-terminal domain of the gene III protein of filamentous phage and the VH-CH1 chain of a HuCAL antibody. Additionally, the vector comprises the separately encoded VL-CL chain. In Figure 14, a vector
10 comprising the Fab fragment MS-GPC-8 is shown.

In pMORPH18_Fab vectors, the HuCAL Fab fragments cloned from the scFv fragments (see figure caption of Figure 11) do not have the short FLAG peptide sequence (DYKD) fused to the VH chain, and all HuCAL VH chains in, and directly derived from, that vector have Q (=CAG) at the first position.

15

Figure 15

Amino acid sequences of VH and VL domains of MS-GPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15 & 16, and MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-27, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-10-57, and MS-GPC-8-27-41.

- 20 The sequences in Figure 15 show amino acid 1 of VH as constructed in the original HuCAL master genes (Knappik et al. (2000): see Fig. 3 therein). In scFv constructs, as described in this application, amino acid 1 of VH is always E (see figure caption of Figure 11), in Fab constructs as described in this application, amino acid 1 of VH is always Q (see figure caption of Figure 13)

25

Detailed Description of the Invention

The following examples illustrate the invention.

Examples

- All buffers, solutions or procedures without explicit reference can be found in standard
30 textbooks, for example Current Protocols of Immunology (1997 and 1999) or Sambrook et al., 1989 (this reference has no publisher). Where not given otherwise, all materials were purchased from Sigma, Deisenhofen, DE, or Merck, Darmstadt, DE, or sources are given in the literature cited. Hybridoma cell lines LB3.1 and L243 were obtained from LGC Reference Materials, Middlesex, UK; data on

WO 01/87338

PCT/US01/15626

antibody 8D1 were generously supplied by Dr. Matyas Sandor, University of Michigan, Madison, WI, USA.

1. Preparation of a human antigen

5 To demonstrate that we could identify cytotoxic antigen-binding domains of human composition, we first prepared a purified form of a human antigen, the human MHC class II DR protein (DRA*0101/DRB1*0401) from PRIESS cells (Gorga et al., 1984; Gorga et al., 1986; Gorga et al., 1987; Stern et al., 1992) as follows.

10 First, PRIESS cells (ECACC, Salisbury UK) were cultured in RPMI and 10% fetal calf serum (FCS) using standard conditions, and 10^{10} cells were lysed in 200 ml phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.5) containing 1% NP-40 (BDH, Poole, UK), 25 mM iodoacetamide, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and 10 mg/l each of the protease inhibitors chymostatin, antipain, pepstatin A, soybean trypsin inhibitor
15 and leupeptin. The lysate was centrifuged at 10,000 g (30 minutes, 4°C) and the resulting supernatant was supplemented with 40 ml of an aqueous solution containing 5% sodium deoxycholate, 5 mM iodoacetamide and 10 mg/l each of the above protease inhibitors and centrifuged at 100,000 g for two hours (4°C). To
20 remove material that bound non-specifically and endogenous antibodies, the resulting supernatant was made 0.2 mM with PMSF and passed overnight (4°C) through a rabbit serum affigel-10 column (5 ml; for preparation, rabbit serum (Charles River, Wilmington, MA, USA) was incubated with Affigel 10 (BioRad, Munich, DE) at a volume ratio of 3:1 and washed following manufacturer's directions) followed by a
25 Protein G Sepharose Fast Flow column (2 ml; Pharmacia) using a flow rate of 0.2 ml/min.

Second, the pre-treated lysate was batch incubated with 5 ml Protein G Sepharose Fast Flow beads coupled to the murine anti-HLA-DR antibody LB3.1 (obtained by
30 Protein G-Sepharose FF (Pharmacia) affinity chromatography of a supernatant of hybridoma cell line LB3.1) (Stern et al., 1993) overnight at 4°C using gentle mixing, and then transferred into a small column which was then washed extensively with three solutions: (1) 100 ml of a solution consisting of 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 10% glycerol and 0.03% sodium azide at a flow rate of 0.6 ml/min). (2) 25 ml of a solution consisting of 50 mM

WO 01/87338

PCT/US01/15326

Tris/HCl (pH 9.0), 0.5 M NaCl, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 10% glycerol and 0.03% sodium azide at a flow rate of 0.9 ml/min; (3) 25 ml of a solution consisting of 2 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1% octyl- β -D-glucopyranoside, 10% glycerol and 0.03% sodium azide at a flow rate of 0.9 ml/min.

5

Third, MHC class II DR protein (DRA*0101/DRB1*0401) was eluted using 15 ml of a solution consisting of 50 mM diethylamine/HCl (pH 11.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% octyl- β -D-glucopyranoside (Alexis Corp., Lausen, CH), 10% glycerol, 10 mM iodoacetamide and 0.03% sodium azide at a flow rate of 0.4 ml/min.

10 800 μ l fractions were immediately neutralised with 100 μ l 1M Tris/HCl (pH 6.8), 150 mM NaCl and 1% octyl- β -D-glucopyranoside. The incubation of the lysate with LB3.1-Protein G Sepharose Fast Flow beads was repeated until the lysate was exhausted of MHC protein. Pure eluted fractions of the MHC class II DR protein (as analyzed by SDS-PAGE) were pooled and concentrated to 1.0-1.3 g/l using Vivaspin concentrators (Greiner, Solingen, DE) with a 30 kDa molecular weight cut-off.

15 Approximately 1 mg of the MHC class II DR preparation was re-buffered with PBS containing 1% octyl- β -D-glucopyranoside using the same Vivaspin concentrator to enable direct coupling of the protein to BIAcore CM5 chips.

20 2. Screening of HuCAL

2.1. Introduction

We identified certain antigen binding antibody fragments of human composition (MS-GPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15 & 16) against the human antigen (DRA*0101/DRB1*0401) from a human antibody library based on a novel concept

25 that has been recently developed (Knappik et al., 2000). A consensus framework resulting in a total of 49 different frameworks here represents each of the VH- and VL-subfamilies frequently used in human immune responses. These master genes were designed to take into account and eliminate unfavorable residues promoting protein aggregation as well as to create unique restriction sites leading to modular

30 composition of the genes. In HuCAL-scFv, both the VH- and VL-CDR3 encoding regions of the 49 master genes were randomized.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

2.2. Phagemid rescue, phage amplification and purification

The HuCAL-scFv (Knappik et al., 2000) library, cloned into a phagemid-based phage display vector pMORPH13_scFv (see Figure 11), in *E. coli* TG-1 was amplified in 2 x TY medium containing 34 µg/ml chloramphenicol and 1% glucose (2 x TY-CG). After helper phage infection (VCSM13) at 37°C at an OD₆₀₀ of about 0.5, centrifugation and resuspension in 2 x TY / 34 µg/ml chloramphenicol / 50 µg/ml kanamycin / 0.1 mM IPTG, cells were grown overnight at 30°C. Phage were PEG-precipitated from the supernatant (Ausubel et al., 1998), resuspended in PBS/20% glycerol and stored at -80°C. Phage amplification between two panning rounds was conducted as follows:

10 mid-log phase TG1-cells were infected with eluted phage and plated onto LB-agar supplemented with 1% of glucose and 34 µg/ml of chloramphenicol. After overnight incubation at 30°C colonies were scraped off, adjusted to an OD₆₀₀ of 0.5 and helper phage added as described above.

15 2.3. Manual solid phase panning

Wells of MaxiSorp™ microtiterplates (Nunc, Roskilde, DK) were coated with MHC-class II DRA*0101/DRB1*0401 (prepared as above) dissolved in PBS (2 µg/well). After blocking with 5% non-fat dried milk in PBS, 1-5 x 10¹² HuCAL-scFv phage purified as above were added for 1h at 20°C. After several washing steps, bound

20 phages were eluted by pH-elution with 100 mM triethylamine and subsequent neutralization with 1M TRIS-Cl pH 7.0. Three rounds of panning were performed with phage amplification conducted between each round as described above.

2.4. Mixed solid phase/whole cell panning

25 Three rounds of panning and phage amplification were performed as described in 2.3. and 2.2. with the exception that in the second round between 1 x 10⁷ and 5 x 10⁷ PRIESS cells in 1 ml PBS/10% FCS were used in 10 ml Falcon tubes for whole cell panning. After incubation for 1h at 20°C with the phage preparation, the cell suspension was centrifuged (2000 rpm for 3 min) to remove non-binding phage, the

30 cells were washed three times with 10 ml PBS, each time followed by centrifugation as described. Phage that specifically bound to the cells were eluted off by pH-elution using 100 mM HCl. Alternatively, binding phage could be amplified by directly adding *E. coli* to the suspension after triethylamine treatment (100 mM) and subsequent neutralization.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

2.5 Identification of HLA-DR binding scFv fragments

Clones obtained after three rounds of solid phase panning (2.3) or mixed solid phase/whole cell panning (02.4) were screened by FACS analysis on PRIESS cells for binding to HLA-DR on the cell surface. For expression, the scFv fragments were cloned via XbaI/EcoRI into pMx7_FS as expression vector (see Figure 12). Expression conditions are shown below in example 3.2

10 Aliquots of 10^6 Priess cells were transferred at 4°C into wells of a 96-well microtiterplate. ScFv in blocking buffer (PBS/5% FCS) were added for 60 min and detected using an anti-FLAG M2 antibody (Kodak) (1:5000 dilution) followed by a polyclonal goat anti-mouse IgG antibody-R-Phycoerythrin-conjugate (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, Cat. No. 115-116-146, F(ab')₂ fragment) (1:200 dilution). Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for storage at 4°C. 15 events were collected for each assay on the FACS-Calibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

Only fifteen out of over 500 putative binders were identified which specifically bound to Priess cells. These clones were further analysed for immunomodulatory ability and for their killing activity as described below. Table 1 contains the sequence characteristics of clones MS-GPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15 & 16 identified thereby. The VH and VL families and the CDR3s listed refer to the HuCAL consensus-based antibody genes as described (Knappik et al., 2000); the sequences of the VH and VL CDRs are shown in Table 1, and the full sequences of the VH and 25 VL domains are shown in Figure 15.

3. Generation of Fab-fragments

3.1. Conversion of scFv to Fab

The Fab-fragment antigen binding polypeptides MS-GPC-1-Fab, MS-GP-6-Fab, MS-GPC-8-Fab and MS-GPC-10-Fab were generated from their corresponding scFv fragments as follows. Both heavy and light chain variable domains of scFv fragments were cloned into pMx9_Fab (Figure 13), the heavy chain variable domains as MfeI / SstI-fragments, the variable domains of the kappa light chains as EcoRV/ BsiWI-fragments. The lambda chains were first amplified from the corresponding

WO 01/87338

PCT/US01/15626

pMORPH13_scFv vector as template with PCR-primers CRT5 (5' primer) and CRT6 (3' primer), wherein CRT6 introduces a unique DraIII restriction endonuclease site.

CRT5: 5' GTGGTGGTCCGATATC 3'

5

CRT6: 5' AGCGTCACACTCGGTGCGGCTTTCGGCTGGCCAAGAACGGGTTA 3'

The PCR product is cut with EcoRV / DraIII and cloned into pMx9_Fab (see Figure 13). The Fab light chains could be detected with a polyclonal goat anti-human IgG antibody-R-Phycoerythrin-conjugate (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, Cat. No. 109-116-088, F(ab)₂ fragment) (1:200 dilution).

3.2. Expression and purification of HuCAL-antibody fragments in *E. coli*
Expression in *E. coli* cells (JM83) of scFv and Fab fragments from pMx7_FS or pMx9_Fab, respectively, were carried out in one litre of 2 x TY-medium supplemented with 34 µg/ml chloramphenicol. After induction with 0.5 mM IPTG (scFv) or 0.1 mM IPTG (Fab), cells were grown at 22°C for 12 hours. Cell pellets were lysed in a French Press (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) in 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, and 10 mM imidazole (pH 7.4). Cell debris was removed by centrifugation and the clear supernatant filtered through 0.2 µm pores before subjecting it to STREP tag purification using a Streptactin matrix and purification conditions according to the supplier (IBA GmbH, Göttingen, Germany). Purification by size exclusion chromatography (SEC) was performed as described by Rheinacker et al. (1996). The apparent molecular weights were determined by SEC with calibration standards and confirmed in some instances by coupled liquid chromatography-mass spectrometry (TopLab GmbH, Martinsried, Germany).

4. Optimization of antibody fragments

In order to optimize certain biological characteristics of the HLA-DR binding antibody fragments, one of the Fab fragments, MS-GPC-8-Fab, was used to construct a library of Fab antibody fragments by replacing the parental VL λ1 chain by the pool of all lambda chains λ 1-3 randomized in CDR3 from the HuCAL library (Knappik et al., 2000).

WO 01/87338

PCT/US01/15626

The Fab fragment MS-GPC-8-Fab (see 3.1) was cloned via *Xba*I/*Eco*RI from pMx9_Fab_GPC-8 into pMORPH18_Fab, a phagemid-based vector for phage display of Fab fragments, to generate pMORPH18_Fab_GPC-8 (see Figure 14). A lambda chain pool comprising a unique *Dra*III restriction endonuclease site (Knappik et al., 2000) was cloned into pMORPH18_Fab_GPC-8 cut with *Nsi*I and *Dra*III (see vector map of pMORPH18_Fab_GPC-8 in Figure 14).

The resulting Fab optimization library was screened by two rounds of panning against MHC-class II DRA*0101/DRB1*0401 (prepared as above) as described in 2.3 with the exception that in the second round the antigen concentration for coating was decreased to 12 ng/well). FACS identified optimized clones as described above in 2.5. Six of these clones, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18 and MS-GPC-8-27, were further characterized and showed cell killing activity as found for the starting fragment MS-GPC-8. Table 1 contains the sequence characteristics of MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18 and MS-GPC-8-27. The VH and VL families and the CDR3s listed refer to the HuCAL consensus-based antibody genes as described (Knappik et al., 2000), the full sequences of the VH and VL domains of MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17 and MS-GPC-8-27 are shown in Figure 15.

The optimized Fab forms of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8-6 and MS-GPC-8-17 showed improved characteristics over the starting MS-GPC-8. For example, the EC50 of the optimized antibodies was 15-20 and 5-20 nM (compared to 20-40 nM for MS-GPC-8, where the concentration is given as the concentration of the bivalent cross-linked Fab dimer), and the maximum capacity to kill MHH-Cell 4 cells determined as 78 and 78% for MS-GPC-8-6 and MS-GPC-8-17 (compared to 65% for MS-GPC-8) respectively.

For further optimization, the VL CDR1 regions of a set of anti-HLA-DR antibody fragments derived from MS-GPC-8 (including MS-GPC-8-10 and MS-GPC-8-27) were optimized by cassette mutagenesis using trinucleotide-directed mutagenesis (Virnekäs et al., 1994). In brief, a VL CDR1 library cassette was synthesized containing six randomized positions (total variability: 7.43×10^8), and was cloned into

WO 01/87338

PCT/US01/15626

a V_H framework. The CDR1 library was digested with EcoRV and BbsI, and the fragment comprising the CDR1 library ligated into the lambda light chains of the MS-GPC-8-derived Fab antibody fragments in pMORPH18_Fab (as described above), digested with EcoRV and BbsI. The resulting library was screened as described above. Ten clones were identified as above by binding specifically to HLA DR (MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 & MS-GPC-8-27-41) and showed cell killing activity as found for the starting fragments MS-GPC-8, MS-GPC-8-10 and MS-GPC-8-27. Table 1 contains the sequence characteristics of MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 & MS-GPC-8-27-41. The V_H and V_L families and the CDR3s listed refer to the HuCAL consensus-based antibody genes as described (Knappik et al., 2000), the full sequences of the V_H and V_L domains of MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-10-57 & MS-GPC-8-27-41 are shown in Figure 15.

From these 10 clones, four Fab fragments were chosen (MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-27-41) as demonstrating significantly improved EC₅₀ of cell killing as described in example 10. Table 1 shows the sequences of clones optimised at the CDR1 region.

Optimisation procedures not only increased the biological efficacy of anti-HLA DR antibody fragments generated by the optimisation process, but a physical characteristic - affinity of the antibody fragment to HLA DR protein - was also substantially improved. For example, the affinity of Fab forms of MS-GPC-8 and its optimised descendants was measured using a surface plasmon resonance instrument (Biacore, Uppsala Sweden) according to example 7. The affinity of the MS-GPC-8 parental Fab was improved over 100 fold from 346 nM to ~ 60 nM after VLCDR3 optimisation and further improved to single digit nanomolar affinity (range 3 - 9 nM) after VLCDR3+1 optimisation (Table 2).

WO 01/87338

PCT/US01/15326

5. Generation of IgG

5.1 Construction of HuCAL-immunoglobulin expression vectors

Heavy chains were cloned as follows. The multiple cloning site of pcDNA3.1+ (Invitrogen) was removed (NheI / ApaI), and a stuffer compatible with the restriction sites used for HuCAL-design was inserted for the ligation of the leader sequences (NheI / EcoRI), VH-domains (EcoRI / BglI) and the immunoglobulin constant regions (BglI / ApaI). The leader sequence (EMBL M83133) was equipped with a Kozak sequence (Kozak, 1987). The constant regions of human IgG1 (PIR J00228), IgG4 (EMBL K01316) and serum IgA1 (EMBL J00220) were dissected into overlapping oligonucleotides with lengths of about 70 bases. Silent mutations were introduced to remove restriction sites non-compatible with the HuCAL-design. The oligonucleotides were spliced by overlap extension-PCR.

Light chains were cloned as follows. The multiple cloning site of pcDNA3.1/Zeo+ (Invitrogen) was replaced by two different stuffers. The κ -stuffer provided restriction sites for insertion of a κ -leader (NheI / EcoRV), HuCAL-scFv V κ -domains (EcoRV / BsiWI) and the κ -chain constant region (BsiWI / ApaI). The corresponding restriction sites in the λ -stuffer were NheI / EcoRV (λ -leader), EcoRV / HpaI (V λ - domains) and HpaI / ApaI (λ -chain constant region). The κ -leader (EMBL Z00022) as well as the λ -leader (EMBL L27692) were both equipped with Kozak sequences. The constant regions of the human κ - (EMBL J00241) and λ -chain (EMBL M18645) were assembled by overlap extension-PCR as described above.

5.2 Generation of IgG-expressing CHO-cells

All cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in media recommended by the supplier. CHO-K1 (CRL-9618) were from ATCC and were co-transfected with an equimolar mixture of IgG heavy and light chain expression vectors. Double-resistant transfectants were selected with 600 μ g/ml G418 and 300 μ g/ml Zeocin (Invitrogen) followed by limiting dilution. The supernatant of single clones was assessed for IgG expression by capture-ELISA. Positive clones were expanded in RPMI-1640 medium supplemented with 10% ultra-low IgG-FCS (Life Technologies). After adjusting the pH of the supernatant to 8.0 and sterile filtration, the solution was subjected to standard protein A column chromatography (Poros 20A, PE Biosystems).

WO 01/87338

PCT/US01/15626

The IgG forms of anti-HLA-DR antigen binding domains show improved characteristics over the antibody fragments. These improved characteristics include affinity (Example 7) and killing efficiency (Examples 9, 10 and 14).

5

6. HLA-DR specificity assay and epitope mapping

To demonstrate that antigen-binding domains selected from the HuCAL library bound specifically to a binding site on the N-terminal domain of human MHCII receptor largely conserved between alleles and hitherto unknown in the context of cell killing by receptor cross linking, we undertook an assessment of their binding specificity, and it was attempted to characterise the binding epitope.

10

The Fab antibody fragments MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-27-41, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8 and MS-GPC-8-6 showed specificity of binding to HLA-DR protein but not to non-HLA-DR proteins. Fab fragments selected from the HuCAL library were tested for reactivity with the following antigens: HLA-DR protein (DRA*0101/DRB1*0401; prepared as example 1, and a set of unrelated non-HLA-DR proteins consisting of BSA, testosterone-BSA, lysozyme and human apotransferrin. An empty well (Plastic) was used as negative control. Coating of the antigen MHCII was performed over night at 1 µg/well in PBS (Nunc-MaxiSorp™) whereas for the other antigens (BSA, Testosterone-BSA, Lysozyme, Apotransferrin) 10 µg/well was used. Next day wells were blocked in 5% non-fat milk for 1 hr followed by incubation of the respective antibodies (anti-MHCII-Fabs and an unrelated Fab (Mac1-8A)) at 100 ng/well for 1h. After washing in PBS the anti-human IgG F(ab')₂-peroxidase-conjugate at a 1:10000 dilution in TBS (supplemented with 5% w/v non-fat dry-milk/0.05% v/v Tween 20) was added to each well for 1h. Final washes were carried out in PBS followed the addition the substrate POD (Roche). Color-development was read at 370 nm in an ELISA-Reader

20

All anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-27-41, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8 and MS-GPC-8-6 demonstrated high specificity for HLA-DR, as evidenced by the much higher fluorescence intensity resulting from incubation of these antibody

WO 01/87338

PCT/US01/15626

fragments with HLA-DR derived antigens compared to controls (Figure 1a). In a similar experiment, the Fab fragments MS-GPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15 & 16 were found to bind to both the DRA*0101/DRB1*0401 (prepared as above) as well as to a chimeric DR-IE consisting of the N-terminal domains of DRA*0101 and DRB1*0401 with the remaining molecule derived from a murine class II homologue IEd (Ito et al., 1996) (Figure 1b).

To demonstrate the broad-DR reactivity of anti-HLA-DR antibody fragments and IgGs of the invention, the scFv forms of MS-GPC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15 & 16, and IgG forms of MS-GPC-8, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-51 & MS-GPC-8-6-13 were tested for reactivity against a panel of Epstein-Barr virus transformed B cell lines obtained from ECACC (Salisbury UK), each homozygous for one of the most frequent DR alleles in human populations (list of cell lines and alleles shown in Figure 2). The antibody fragments were also tested for reactivity against a series of L cells transfected to express human class II isotypes other than DRB1: L105.1, L257.6, L25.4, L256.12 & L21.3 that express the molecules DRB3*0101, DRB4*0101, DP0103/0402, DP 0202/0201, and DQ0201/0602 respectively (Klohe et al., 1988).

Reactivity of an antigen-binding fragment to the panel of cell-lines expressing various MHC- class II molecules was demonstrated using an immunofluorescence procedure as for example, described by Otten et al (1997). Staining was performed on 2×10^6 cells using an anti-FLAG M2 antibody as the second reagent against the M2 tag carried by each anti-HLA-DR antibody fragment and a fluorescein labelled goat anti-mouse Ig (BD Pharmingen, Torrey Pine, CA, USA) as a staining reagent. Cells were incubated at 4°C for 60 min with a concentration of 200 nM of the anti-HLA-DR antibody fragment, followed by the second and third antibody at concentrations determined by the manufacturers. For the IgG form, the second antibody was omitted and the IgG detected using a FITC-labeled mouse anti-human IgG4 (Serotec, Oxford, UK). Cells were washed between incubation steps. Finally the cells were washed and subjected to analysis using a FACS Calibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

Figure 2 shows that the scFv-fragments MS-GPC-1, 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15 & 16, and IgG forms of MS-GPC-8, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-51 & MS-GPC-8-6-13

WO 01/87338

PCT/US01/15326

react with all DRB1 allotypes tested, while MS-GPC-3 & 4 react with over 3 DRB1 allotypes tested. This observation taken together with the observation that all anti-HLA-DR antibody fragments react with chimeric DR-IE, suggests that all selected anti-HLA-DR antibody fragments recognize the extracellular first domain of the monomorphic DR α chain or a monomorphic epitope on extracellular first domain of the DR β chain.

We then attempted to localize the binding domains of MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-27-41 further by examining competitive binding with murine antibodies for which the binding domains on HLA-DR are known. The murine antibodies L243 and LB3.1 are known to bind to the α 1 domain, 1-1C4 and 8D1 to the β 1 domain and 10F12 to the β 2 domain (Vidovic et al. 1995b). To this end, an assay was developed wherein a DR-expressing cell line (LG-2) was at first incubated with the IgG4 forms of MS-GPC-8-10-57 or MS-GPC-8-27-41, the Fab form of MS-GPC-8-10-57 or the Fab form of GPC 8, and an unrelated control antibody. Subsequently murine antibodies were added and the murine antibodies were detected. If the binding site of MS-GPC-8-10-57 or MS-GPC-8-27-41 overlaps with the binding of a murine antibody, then a reduced detection of the murine antibody is expected.

Binding of the IgG4 forms of GPC-8-27-41 and MS-GPC-8-10-57 and the Fab form of MS-GPC-8-10-57 substantially inhibited (mean fluorescence intensity reduced by > 90%) the binding of 1-1C4 and 8D1, whereas L243, LB3.1 and 10F12 and a control were only marginally affected. The Fab form of MS-GPC-8 reduced binding of 1-1C4 by ~ 50% (mean fluorescence dropped from 244 to 118), abolished 8D1 binding and only marginally affected binding of L243, LB3.1 and 10F12 or the control. An unrelated control antibody had no effect on either binding. Thus, MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-27-41 seem to recognise a β 1 domain epitope that is highly conserved among allelic HLA-DR molecules.

The whole staining procedure was performed on ice. 1×10^7 cells of the human B-lymphoblastoid cell line LG-2 was preblocked for 20 Min. in PBS containing 2% FCS and 35 μ g/ml Guinea Pig IgG ("FACS-Buffer"). These cells were divided into 3 equal parts A, B, and C of approximately 3.3×10^6 cells each, and it was added to A.) 35 μ g MS-GPC-8-10-57 or MS-GPC-8-27-41 IgG4, to B.) 35 μ g MS-GPC-8-10-57 Fab or

WO 01/87338

PCT/US01/15626

MS-GPC-8 Fab, and to C.) 35 µg of an unrelated IgG4 antibody as negative control, respectively, and incubated for 90 min. Subsequently A, B, C were divided in 6 equal parts each containing 5.5×10^5 cells, and 2 µg of the following murine antibodies were added each to one vial and incubated for 30 min: 1.) purified mIgG ; 2.) L243; 3.) 5 .LB3.1; 4.) 1-1 C4; 5.) 8D1; 6.) 10F12. Subsequently, 4ml of PBS were added to each vial, the vials were centrifuged at 300g for 8 min, and the cell pellet resuspended in 50 µl FACS buffer containing a 1 to 25 dilution of a goat-anti-murine Ig-FITC conjugate at 20 µg/ml final concentration (BD Pharmingen, Torrey Pines, CA, USA). Cells were incubated light-protected for 30 min. Afterwards, cells were washed with 4 ml PBS, 10 centrifuged as above and resuspended in 500 µl PBS for analysis in the flow cytometer (FACS Calibur, BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

The PepSpot technique (US 6040423; Heiskanen et al., 1999) is used to further identify the binding epitope for MS-GPC 8-10-57. Briefly, an array of 73 overlapping 15mer peptides is synthesised on a cellulose membrane by a solid phase peptide 15 synthesis spotting method (WO 00/12575). These peptide sequences are derived from the sequence of the $\alpha 1$ and $\beta 1$ domains of HLA-DR4Dw14, HLA-DRA1*0101 (residues 1-81) and HLA-DRB1*0401 (residues 2-92), respectively, and overlap by two amino acids. Second, such an array is soaked in 0.1% Tween-20/PBS (PBS-T), 20 blocked with 5% BSA in PBS-T for 3 hours at room temperature and subsequently washed three times with PBS-T. Third, the prepared array is incubated for 90 minutes at room temperature with 50 ml of a 5 mg/l solution of the IgG form of GPC-8-10-57 in 1% BSA/PBS-T. Fourth, after binding, the membrane is washed three times with PBS-T and subsequently incubated for 1 hour at room temperature with a goat anti- 25 human light chain antibody conjugated to horseradish peroxidase diluted 1/5000 in 1% BSA/PBS-T. Finally, the membrane is washed three times with PBS-T and any binding determined using chemiluminescence detection on X-ray film. As a control for unspecific binding of the goat anti-human light chain antibody, the peptide array is stripped by the following separate washings each at room temperature for 30 min: 30 PBS-T (2 times), water, DMF, water, an aqueous solution containing 8M urea, 1% SDS, 0.5% DTT, a solution of 50% ethanol, 10% acetic acid in water (3 times each) and, finally, methanol (2 times). The membrane is again blocked, washed, incubated with goat anti-human light chain antibody conjugated to horseradish peroxidase and developed as described above.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

7. Affinity of anti-HLA-DR antibody and antibody fragments

In order to demonstrate the superior binding properties of anti-HLA antibody fragments of the invention, we measured their binding affinities to the human MHC class II DR protein (DRA*0101/DRB1*0401) using standard equipment employing plasmon resonance principles. Surprisingly, we achieved affinities in the sub-nanomolar range for IgG forms of certain anti-HLA-DR antibody fragments of the invention. For example, the affinity of the IgG forms of MS-GPC-8-27-41, MS-GPC-8-6-13 & MS-GPC-8-10-57 was measured as 0.3, 0.5 and 0.8 nM respectively (Table 3a). Also, we observed high affinities in the range of 2-8 nM for Fab fragments affinity matured at the CDR1 and CDR3 light chain regions (Table 3b), Fab fragments affinity matured at only the CDR3 light chain region showed affinities in the range of 40 to 100 nM (Table 3c), and even Fab fragments of non-optimised HuCAL antigen binding domains showed affinities in the sub μ M range (Table 3d). We were surprised to observe that despite only a moderate increase in K_{on} (2-fold) following CDR3 optimisation, K_{on} remained approximately constant throughout the antibody optimisation process in the order of $1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, whilst a significant decrease in K_{off} was a feature of the optimisation process – sub $100 s^{-1}$, sub $10 s^{-1}$, sub $1 s^{-1}$ and sub $0.1 s^{-1}$ for the unoptimised Fabs, CDR3 optimised Fabs, CDR3/CDR1 optimised Fabs and IgG forms of anti-HLA-DR antibody fragments of the invention.

The affinities for anti-HLA antibody fragments of the invention were measured as follows. All measurements were conducted in HBS buffer (20mM HEPES, 150mM NaCl, pH7.4) at a flow rate of 20 μ l/min at 25°C on a Biacore3000 instrument (Biacore AB, Sweden). MHC class II DR protein (prepared as example 1) was diluted in 100mM sodium acetate pH 4.5 to a concentration of 50 - 100 mg/ml, and coupled to a CM5 chip (Biacore AB) using standard EDC-NHS coupling chemistry with subsequent ethanolamine treatment as manufacturers directions. The coating density of MHCII was adjusted to between 500 and 4000 RU. Affinities were measured by injection of 5 different concentrations of the different antibodies and using the standard software of the Biacore instrument. Regeneration of the coupled surface was achieved using 10mM glycine pH2.3 and 7.5mM NaOH.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

8. Multivalent killing activity of anti HLA-DR antibodies and antibody fragments

To demonstrate the effect of valency on cell killing, a cell killing assay was performed using monovalent, bivalent and multivalent compositions of anti-HLA-DR antibody fragments of the invention against GRANTA-519 cells. Anti-HLA-DR antibody fragments from the HuCAL library showed much higher cytotoxic activity when cross-linked to form a bivalent composition (60 – 90% killing at antibody fragment concentration of 200 nM) by co-incubation with anti-FLAG M2 mAb (Figure 3) compared to the monovalent form (5 – 30% killing at antibody fragment concentration of 200 nM). Incubation of cell lines alone or only in the presence of anti-FLAG M2 mAb without co-incubation of anti-HLA-DR antibody fragments did not lead to cytotoxicity as measured by cell viability. Treatment of cells as above but using 50 nM of the IgG4 forms (naturally bivalent) of the antibody fragments MS-GPC-8, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-27-41 without addition of anti-FLAG M2 mAb showed a killing efficiency after 4 hour incubation of 76%, 78%, 78% and 73% respectively.

Furthermore, we observed that higher order valences of the anti-HLA-DR antibody fragments further decrease cell viability significantly. On addition of Protein G to the incubation mix containing the IgG form of the anti-HLA-DR antibody fragments, the multivalent complexes thus formed further decrease cell viability compared to the bivalent composition formed from incubation of the anti-HLA-DR antibody fragments with only the bivalent IgG form.

The killing efficiency of anti-HLA-DR antibody fragments selected from the HuCAL library was tested on the HLA-DR positive tumor cell line GRANTA-519 (DSMZ, Germany). 2×10^5 cells were incubated for 4 h at 37°C under 6% CO₂ with 200 nM anti-HLA-DR antibody fragments in RPMI 1640 (PAA, Germany) supplemented with 2.5% heat inactivated FBS (Biowittaker Europe, BE), 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 0,1 mg/ml kanamycin. Each anti-HLA-DR antibody fragment was tested for its ability to kill activated tumor cells as a monovalent anti-HLA-DR antibody fragment or as a bivalent composition by the addition of 100 nM of a bivalent cross-linking anti-FLAG M2 mAb. After 4 h incubation at 37°C under 6% CO₂, cell viability was determined by trypan blue staining and

WO 01/87338

PCT/US01/15626

subsequent counting of remaining viable cells (Current Protocols in Immunology, 1997).

The above experiment was repeated using KARPAS-422 cells against a multivalent form of IgG forms of MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-27-41 prepared by a pre-incubation with a dilution series of the bacterial protein Protein G. Protein G has a high affinity and two binding sites for IgG antibodies, effectively cross-linking them to yield a total binding valency of 4. In a control using IgG alone without preincubation with Protein G, approximately 55% of cells were killed, while cell killing using IgG pre-incubated with Protein G gave a maximum of approximately 75% at a molar ratio of IgG antibody/Protein G of ~ 6 (based on a molecular weight of Protein G of 28.5 kD). Higher or lower molar ratios of IgG antibody/Protein G approached the cell killing efficiency of the pure IgG antibodies.

15 *9. Killing efficiency of anti-HLA-DR antibody fragments*

Experiments to determine the killing efficiency of the anti-HLA-DR cross-linked antibody fragments against other tumor cell lines that express HLA-DR molecules were conducted analogous to example 8. Tumor cell lines that show greater than 50% cell killing with the cross linked Fab form of MS-GPC-8 after 4 h incubation include MHH-CALL4, MN 60, BJAB, BONNA-12 which represent the diseases B cell acute lymphoid leukemia, B cell acute lymphoid leukemia, Burkitt lymphoma and hairy cell leukemia respectively. Use of the cross-linked Fab form of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-1, 6 and 10 also shows similar cytotoxic activity to the above tumor cell lines when formed as a bivalent agent using the cross-linking anti-FLAG M2 mAb.

The method described in example 8 was used to determine the maximum killing capacity for each of the cross-linked bivalent anti-HLA-DR antibody fragments against Priess cells. The maximum killing capacity observed for MS-GPC-1, MS-GPC-6, MS-GPC-8 & MS-GPC-10 was measured as 83%, 88%, 84% and 88% respectively. Antibody fragments generated according to example 4, when cross linked using anti-FLAG M2 mAb as above, also showed improved killing ability against GRANTA and Priess cells (Table 4).

WO 01/87338

PCT/US01/15626

10. Killing efficiency of anti-HLA-DR IgG antibodies of human composition

Compared to corresponding murine antibodies (Vidovic et al, 1995b; Nagy & Vidovic, 1996; Vidovic & Toral; 1998), we were surprised to observe significantly improved killing efficiency of IgG forms of certain anti-HLA-DR antibody fragments of the invention (Table 5). Following the method described in examples 8 and 9 but at 50 nM, repeated measurements (3 to 5 replica experiments where cell number was counted in duplicate for each experiment) were made of the killing efficiency of the IgG forms of certain antibody fragments of the invention. When applied at a final concentration of only 50 nM, IgGs of the antibody fragments MS-GPC-8, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-10-57 & MS-GPC-8-27-41 killed more than 50% of cells from 16, 22, 19 and 20 respectively of a panel of 24 human tumor cell lines that express HLA-DR antigen at a level greater than 10 fluorescent units as determined by example 11. Cells were treated with the two murine anti-HLA-DR antibodies L243 (Vidovic et al, 1995b) and 8D1 (Vidovic & Toral; 1998) at a significantly higher final concentration of mAb (200 nM), which reduced cell viability to a level below 50% viable cells in only 13 and 12 of the 24 HLA-DR expressing cells lines, respectively. The cell line MHH-PREB-1 was singled out and not accounted as part of the panel of 24 cell lines despite its expression of HLA-DR antigen at a level greater than 10 fluorescent units due to the inability of any of the above antibodies to induce any significant reduction of cell viability. This is further explained in example 12.

Indeed, even at the significantly increased concentration, the two murine antibodies treated at 200 nM showed significantly efficient killing compared to the IgG forms of anti-HLA DR antibody fragments of the invention. Not only do IgG forms of the human anti-HLA-DR antibody fragments of the invention show an overall increase in cell killing compared to the murine antibodies, but they show less variance in killing efficiency across different cell lines. The coefficient of variance in killing for the human antibodies in this example is 32% (mean %killing = 68 +/- 22% (SD)), compared to over 62% (mean %killing = 49 +/- 31% (SD)) for the mouse antibodies. Statistically controlling for the effect on killing efficiency due to HLA expression by fitting logistic regression models to mean percentage killing against log(mean HLA DR expression) supports this observation (Figure 4). Not only is the fitted curve for the murine antibodies consistently lower than that for the human, but a larger variance in

WO 01/87338

PCT/US01/15626

residuals from the murine antibody data (SD = 28%) is seen compared to the variance in residuals from the human antibody data (16%).

11. *Killing selectivity of antigen-binding domains against a human antigen for activated versus non-activated cells*

Human peripheral B cells were used to demonstrate that human anti-HLA-DR mAb-mediated cell killing is dependent on cell-activation. 50 ml of heparinised venous blood was taken from an HLA-DR typed healthy donor and fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque Gradient Centrifugation (Histopaque-1077; Sigma) as described in Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc.; 1999). Purified B cells (~5% of peripheral blood leukocytes) were obtained from around 5×10^7 PBMC using the B-cell isolation kit and MACS LS⁺VS⁺ columns (Miltenyi Biotec, Germany) according to manufacturers guidelines. Successful depletion of non-B cells was verified by FACS analysis of an aliquot of isolated B cells (HLA-DR positive and CD19 positive). Double staining and analysis is done with commercially available antibodies (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) using standard procedures as for example described in Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc.; 1999). An aliquot of the isolated B cells was tested for the ability of the cells to be activated by stimulation with Pokeweed mitogen (PWM) (Gibco BRL, Cat. No. 15360-019) diluted 1:25 in RPMI 1640 (PAA, Germany) supplemented with 10% FCS (Biowittaker Europe, BE), 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 0.1mg/ml kanamycin by incubation at 37°C under 6% CO₂ for three days. Successful activation was verified by FACS analysis of HLA-DR expression on the cell surface (Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc.; 1999).

The selectivity for killing of activated cells versus non-activated cells was demonstrated by incubating 1×10^6 /ml B cells activated as above compared to non-activated cells, respectively with 50 nM of the IgG forms of MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-41 or the murine IgG 10F12 (Vidovic et al., 1995b) in the medium described above but supplemented with 2,5% heat inactivated FCS instead of 10%, or with medium alone. After incubation at 37°C under 6% CO₂ for 1 or 4h, cell viability was determined by fluorescein diacetate staining (FDA) of viable and propidium iodide staining (PI) of dead cells and subsequent counting of the green (FDA) and red

WO 01/87338

PCT/US01/15626

(PI) fluorescent cells using a fluorescence microscope (Leica, Germany) using standard procedures (Current Protocols in Immunology, 1997).

B cell activation was shown to be necessary for cell killing. In non-activated cells after 5
1 h of incubation with the anti-HLA-DR antibodies, the number of viable cells in the
media corresponded to 81%, 117% 126% and 96% of the pre-incubation cell density
for MS-GPC-8-10-57 (IgG), MS-GPC-8-27-41 (IgG), 10F12 and medium alone,
respectively. In contrast, the number of viable activated B cells after 1 h incubation
corresponded to 23%, 42% 83% and 66% of the pre-incubation cell density for MS-
10 GPC-8-10-57 (IgG), MS-GPC-8-27-41 (IgG), 10F12 and medium alone, respectively.
After 4 h of incubation, 78%, 83% 95% and 97% of the pre-incubation cell density for
MS-GPC-8-10-57 (IgG), MS-GPC-8-27-41 (IgG), 10F12 and medium alone were
found viable in non-activated cells, whereas the cell density had dropped to 23%, 24%
15 53% and 67% of the pre-incubation cell density for MS-GPC-8-10-57 (IgG), MS-GPC-
8-27-41 (IgG), 10F12 and medium alone, respectively, in activated cells.

12. Killing activity of anti-HLA antibody fragments against the cell line MHH PreB 1

As evidenced in Table 5, we observed that our cross-linked anti-HLA-DR antibody
fragments or IgGs did not readily kill a particular tumor cell line expressing HLA-DR
20 at significant levels. We hypothesized that although established as a stable cell line,
cells in this culture were not sufficiently activated. Therefore, we conducted an
experiment to stimulate activity of the MHH preB1 cell line, using increased cell-
surface expression of HLA-DR molecule as a marker of activation as follows.

25 Non-adherently growing MHH preB1 cells were cultivated in RPMI medium containing
the following additives (all from Gibco BRL and Bio Whittaker): 10% FCS, 2 mM
L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 1x
Kanamycin. Aliquots were activated to increase expression of HLA-DR molecule by
incubation for one day with Lipopolysaccharide (LPS, 10 µg/ml), Interferon-gamma
30 (IFN-γ, Roche, 40 ng/ml) and phyto-hemagglutinin (PHA, 5 µg/ml). The cell surface
expression of HLA-DR molecules was monitored by flow cytometry with the FITC-
conjugated mAb L243 (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).
Incubation of MHH preB1 for one day in the presence of LPS, IFN- γ and PHA
resulted in a 2-fold increase in HLA-DR surface density (mean fluorescence shift

WO 01/87338

PCT/US01/15626

from 190 to 390). Cell killing was performed for 4 h in the above medium but containing a reduced FCS concentration (2.5%). A concentration series of the IgG forms of MS-GPC-8-27-41 & MS-GPC-8-10-57 was employed, consisting of final antibody concentrations of 3300, 550, 92, 15, 2.5, 0.42 and 0.07 nM, on each of an aliquot of non-activated and activated cells. Viable cells were identified microscopically by exclusion of Trypan blue. Whereas un-activated cell viability remains unaffected by the antibody up to the highest antibody concentration used, cell viability is dramatically reduced with increasing antibody concentration in activated MHH PreB1 cells (Figure 5).

10

13. Killing efficiency of anti-HLA-DR IgG antibodies of human composition against ex-vivo chronic lymphoid leukemia cells

Using B cells isolated and purified from 10 patients suffering from chronic lymphoid leukemia (CLL), we demonstrated that IgG forms of anti-HLA-DR antibody fragments of the invention showed efficacy in killing of clinically relevant cells using an *ex-vivo* assay. B-cells were isolated and purified from 10 unrelated patients suffering from CLL (samples kindly provided by Prof Hailek, Ludwig Maximilian University, Munich) according to standard procedures (*Scandinavian J. of Immunology 1968*, I'll need to get that on Monday). 2×10^5 cells were treated with 100 nM of IgG forms of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8, MS-GPC-8-10-57 or MS-GPC-8-27-41 and incubated for 4 or 24 hours analogous to examples 8 and 9. A replica set of cell cultures was established and activated by incubation with HeLa-cells expressing CD40 ligand on their surface for three days before treatment with antibody (Buhmann et al., 1999). As controls, the murine IgG 10F12 (Vidovic et al., 1995b) or no antibody was used. Cell viability for each experiment was determined as described in example 12.

Surprisingly, IgG forms of the anti-HLA-DR antibody fragments of the invention showed highly efficient and uniform killing - even across this diverse set of patient material. After only 4 hours of treatment, all three human IgGs gave a significant reduction in cell viability compared to the controls, and after 24 hours only 33% of cells remained viability (Figure 6). We found that on stimulating the *ex-vivo* cells further according to Buhmann et al (1999), the rate of killing was increased such that

30

WO 01/87338

PCT/US01/15626

after only 4 hours culture with the human antibodies, only 24% of cells remained viable on average for all patient samples and antibody fragments of the invention.

14. Determination of EC50 for anti-HLA-DR antibody fragments

- 5 We demonstrated superior Effective Concentration at 50% effect (EC50) values in a cell-killing assay for certain forms of anti-HLA-DR antibody fragments selected from the HuCAL library compared to cytotoxic murine anti-HLA-DR antibodies (Table 6).

The EC50 for anti-HLA-DR antibody fragments selected from the HuCAL library were
10 estimated using the HLA-DR positive cell line PRIESS or LG2 (ECACC, Salisbury UK). 2×10^6 cells were incubated for 4 h at 37°C under 6% CO₂ in RPMI 1640 (PAA, Germany) supplemented with 2,5% heat inactivated FBS (Biowhitaker Europe, BE), 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 0,1mg/ml kanamycin, together with dilution series of bivalent anti-HLA-DR antibody
15 fragments. For the dilution series of Fab antibody fragments, an appropriate concentration of Fab fragment and anti-FLAG M2 antibody were premixed to generate bivalent compositions of the anti-HLA-DR antibody fragments. The concentrations stated refer to the concentration of bivalent composition such that the IgG and Fab EC50 values can be compared.

20 After 4 h incubation with bivalent antibody fragments at 37°C under 6% CO₂, cell viability was determined by fluorescein diacetate staining and subsequent counting of remaining viable cells (Current Protocols in Immunology, 1997). Using standard statistical software (R; <http://cran.r-project.org>), non-linear logistic regression curves
25 were fitted to replica data points and the EC50 estimated for each antibody fragment.

When cross-linked using the anti-FLAG M2 antibody, the Fab fragments MS-GPC-1, MS-GPC-8 & MS-GPC-10 selected from the HuCAL library (Example 4) showed an
30 EC50 of less than 120 nM as expressed in terms of the concentration of the monovalent fragments, which corresponds to a 60 nM EC50 for the bivalent cross-linked (Fab)dimer-anti-Flag M2 conjugate, (Figure 7a). When cross-linked using the anti-FLAG M2 antibody, anti-HLA-DR antibody fragments optimised for affinity within the CDR3 region (Example 4) showed a further improved EC50 of less than 50 nM, or 25 nM in terms of the bivalent cross-linked fragment (Figure 7b), and those

WO 01/87338

PCT/US01/15326

5 additionally optimised for affinity within the CDR1 region showed an EC50 of less than 30 nM (15 nM for bivalent fragment). In comparison, the EC50 of the cytotoxic murine anti-HLA-DR antibodies 8D1 (Vidovic & Toral; 1998) and L243 (Vidovic et al; 1995b) showed an EC50 of over 30 and 40 nM, respectively, within the same assay (Figure 7c).

10 Surprisingly, the IgG form of certain antibody fragments of the invention showed approximately 1.5 orders of magnitude improvement in EC50 compared to the murine antibodies (Figure 7d). For example, the IgG forms of MS-GPC-8-10-57 & MS-GPC-8-27-41 showed an EC50 of 1.2 and 1.2 nM respectively. Furthermore, despite being un-optimised for affinity, the IgG form of MS-GPC-8 showed an EC50 of less than 10 nM.

15 As has been shown in examples 11 and 12, the efficiency of killing of un-activated cells (normal peripheral B and MHH PreB cells respectively) is very low. After treatment with 50 nM of the IgG forms of MS-GPC-8-10-57 & MS-GPC-8-27-41, 78% and 83% of normal peripheral B cells, respectively, remain viable after 4 hours. Furthermore, at only 50nM concentration of either IgG, virtually 100% viability is seen for MHH PreB1 cells. Indeed, a decrease in the level of viability to below 50% cannot
20 be achieved with these un-activated cells using reasonable concentration ranges (0.1 to 300 nM) of IgG or bivalent cross-linked Fab forms of the anti-HLA DR antibody fragments of the invention. Therefore, the EC50 for these un-activated cell types can be estimated to be at least 5 times higher than that shown for the non-optimised Fab forms (EC50 ~ 60 nM with respect to cross-linked bivalent fragment), and at least 10
25 times and 100 times higher than EC50s shown for the VHCDR3 optimised Fabs (~ 25 nM with respect to cross-linked bivalent fragment) and IgG forms of MS-GPC-8-10-57 (~1.2 nM) & MS-GPC-8-27-41 (~1.2 nM) respectively.

15. Mechanism of cell-killing

30 The examples described above show that cell death occurs - needing only certain multivalent anti-HLA-DR antibody fragments to cause killing of activated cells. No further cytotoxic entities or immunological mechanisms were needed to cause cell death, therefore demonstrating that cell death is mediated through an innate pre-programmed mechanism of the activated cell. The mechanism of apoptosis is a

WO 01/87338

PCT/US01/15626

- widely understood process of pre-programmed cell death. We were surprised by certain characteristics of the cell killing we observed that suggested the mechanism of killing for activated cells when exposed to our human anti-HLA-DR antibody fragments was not what is commonly understood in the art as "apoptosis". For example, the observed rate of cell killing appeared to be significantly greater than the rate reported for apoptosis (reference; I still need to get that from Zoltan on Monday). Two experiments were conducted to demonstrate that the mechanism of cell killing proceeded by a non-apoptotic mechanism.
- 10 First, we used Annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) staining techniques to distinguish between apoptotic and non-apoptotic cell death – cells undergoing apoptosis, "apoptotic cells", (Annexin-V positive/PI negative) can be distinguished from necrotic ("Dead") (Annexin-V positive/PI positive) and fully functional cells (Annexin-V negative/PI negative). Using the procedures recommended by the
- 15 manufacturers of the AnnexinV and PI assays, 1×10^6 /ml Priesa cells were incubated at 37°C under 6% CO₂ with or without 200 nM anti-HLA-DR antibody fragment MS-GPC-8 together with 100 nM of the cross-linking anti-FLAG M2 mAb in RPMI 1640 (PAA, DE) supplemented with 2.5% heat inactivated FCS (Biowhittaker Europe, BE), 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 0,1
- 20 mg/ml kanamycin. To provide an apoptotic cell culture as control, 1×10^6 /ml Priesa cells were induced to enter apoptosis by incubation in the above medium at 37°C under 6% CO₂ with 50 µg/ml of the apoptosis-inducing anti-CD95 mAb DX2 (BD Pharmingen, Torrey Pine, CA, USA) cross-linked with 10 µg/ml Protein-G. At various incubation times (1, 15 and 60 min, 3 and 5 h) 200 µl samples were taken, washed
- 25 twice and stained with Annexin-V-FITC (BD Pharmingen, Torrey Pine, CA, USA) and PI using Annexin-V binding buffer following the manufacturer's protocol. The amount of staining with Annexin-V-FITC and PI for each group of cells is analysed with a FACS Calibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).
- 30 Cell death induced through the cross-linked anti-HLA-DR antibody fragments shows a significantly different pattern of cell death than that of the anti-CD95 apoptosis inducing antibody or the cell culture incubated with anti-FLAG M2 mAb alone. The percentage of dead cells (as measured by Annexin-V positive/PI positive staining) for the anti-HLA-DR antibody fragment/anti-FLAG M2 mAb treated cells increases far

WO 01/87338

PCT/US01/15626

more rapidly than that of the anti-CD95 or the control cells (Figure 8a). In contrast, the percentage of apoptotic cells (as measured by Annexin-V positive/PI negative staining) increases more rapidly for the anti-CD95 treated cells compared to the cross-linked anti-HLA-DR antibody fragments or the control cells (Figure 8b).

5

Second, we inhibited caspase activity using zDEVD-fmk, an irreversible Caspase-3 inhibitor, and zVAD-fmk, a broad spectrum Caspase inhibitor (both obtained from BioRad, Munich, DE). The mechanism of apoptosis is characterized by activity of caspases, and we hypothesized that if caspases were not necessary for anti HLA-DR mediated cell death, we would observe no change in the viability of cells undergoing cell death in the presence of these caspase inhibitors compared to those without. 2×10^5 Pries cells were preincubated for 3 h at 37°C under 6% CO₂ with serial dilutions of the two caspase inhibitors ranging from 180 μM to 10 mM in RPMI 1640 (PAA, DE) supplemented with 2,5% heat inactivated FCS (Biowhittaker Europe, BE), 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 0,1mg/ml kanamycin. HLA-DR mediated cell death was induced by adding 200 nM of the human anti-HLA-DR antibody fragment MS-GPC-8 and 100 nM of the cross-linking anti-M2 mAb. An anti-CD95 induced apoptotic cell culture served as a control for the activity of inhibitors (Drenou et al., 1999). After further incubation at 37°C and 6% CO₂, cell viability after 4 and 24 h was determined by trypan blue staining and subsequent counting of non-stained cells. As we expected, cell viability of the anti-HLA-DR treated cell culture was not significantly modified by the presence of the Caspase inhibitors, while cell death induced through anti-CD95 treatment was significantly decreased for the cell culture pre-incubated with the Caspase inhibitors.

25 This observation supports our hypothesis that HLA-DR mediated cell death proceeds through a non-apoptotic mechanism that is independent of caspase proteases that can be inhibited by zDEVD-fmk or zVAD-fmk.

16. *In vivo therapy for cancer using an HLA-DR specific antibody*

30 We demonstrate that antigen-binding domains of human composition can successfully be used as a therapeutic for the treatment of cancer. Immunocompromised mice - such as scid, nude or Rag-1 knockout - are inoculated with a DR+ human lymphoma or leukemia cell line of interest. The tumor cell dose, usually 1×10^6 to 1×10^7 /mouse, is established for each tumor tested and administered

WO 01/87338

PCT/US01/15626

subcutaneously (s.c.) or intravenously (i.v.). The mice are treated i.v. or s.c with the IgG form of the anti-HLA-DR antibody fragments MS-GPC-8, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-41 or others of the invention prepared as described above, using doses of 1 to 25 mg/kg over 5 days. Survival of anti-HLA-DR treated and control untreated mice is monitored for up to 8 weeks after cessation of treatment. Tumor progression in the mice inoculated s.c. is additionally quantified by measuring tumor surface area. Significant prolongation of survival of up to 80% of anti-HLA-DR treated mice is observed during the experiment, and up to 50% mice survive at the end of the experiment. In s.c. inoculated and untreated mice, the tumor reaches a surface area of 2 - 3 cm², while in anti-HLA-DR treated animals the tumor surface area is significantly less.

17. Immunosuppression using anti-HLA-DR antibody fragments measured by reduction in IL-2 secretion

Anti-HLA DR antibody fragments of the invention displayed substantial immunomodulatory properties within an assay measuring IL-2 secretion from immortalized T-cells. IgG forms of the antibody fragments MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-10-57 & MS-GPC-8-27-41 showed very strong immunosuppressive properties in this assay with sub-nanomolar IC50 values and virtually 100% maximal inhibition (Figure 9a). Surprisingly, even monovalent compositions of the antibody fragments of the invention were able to strongly inhibit IL-2 secretion in the same assay. For example, Fab forms of the VHCDR3-selected and VLCDR3/VLCDR1 optimised antibody fragments showed low single-digit nano-M IC50s and also almost 100% maximal inhibition (Figure 9b). Other monovalent anti-HLA DR antibody fragments of the invention showed significant immunosuppressive properties in the assay compared to control IgG and Fab fragments (Table 7).

The immunomodulatory properties of anti-HLA DR antibody fragments was investigated by measuring IL-2 secretion from the hybridoma cell line T-Hyb 1 stimulated using DR-transgenic antigen presenting cells (APC) under conditions of half-maximal antigen stimulation. IL-2 secretion was detected and measured using a standard ELISA method provided by the OptiEIA mouse IL-2 kit of Pharmingen (Torrey Pine, CA, USA). APCs were isolated from the spleen of unimmunized chimeric 0401-IE transgenic mice (Ito et al. 1996) according to standard procedures.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

1.5x10⁵ APCs were added to 0.2 ml wells of 96-well in RPMI medium containing the following additives (all from Gibco BRL and PAA): 10 % FCS, 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 0.1 g/l kanamycin. Hen egg ovalbumin was added to a final concentration of 200 µg/ml in a final volume of 100 µl of the above medium, the cells incubated with this antigen for 30 min at 37°C under 6% CO₂. Anti-HLA DR antibody fragments were added to each well at various concentrations (typically in a range from 0.1 to 200 nM), the plate incubated for 1 h at 37°C/6% CO₂ and 2x10⁵ T-Hyb 1 cells added to give a final volume of 200 µl in the above medium. After incubation for 24 h, 100 µl of supernatant was transferred to an ELISA plate (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp surface, Nunc, Roskilde, DK) previously coated with IL-2 Capture Antibody (BD Pharmingen, Torrey Pine, CA, USA), the amount of IL-2 was quantified according to the manufacturer's directions using the OptEIA Mouse IL-2 kit and the plate read using a Victor V reader (Wallac, Finland). Secreted IL-2 in pg/ml was calibrated using the IL-2 standards provided in the kit.

The T-cell hybridoma line T-Hyb1 was established by fusion of a T-cell receptor negative variant of the thymoma line BW 5147 (ATCC) and lymph node cells from chimeric 0401-IE transgenic mice previously immunized with hen egg ovalbumin (Ito et al. 1996). The clone T-Hyb1 was selected for the assay since it responded to antigen specific stimulation with high IL-2 secretion.

18. Immunosuppression using an HLA-DR specific antibody measured by T cell proliferation

Immunomodulatory properties of anti-HLA DR antibody fragments were confirmed using a second assay that measures T cell proliferation. The IC50 value for inhibition of T cell proliferation of the IgG form of MS-GPC-8-10-57 and MS-GPC-8-27-41 were 11 and 20 nM respectively (Figure 10). The anti-HLA DR antibody fragments were tested as follows to inhibit the proliferative T cell response of antigen-primed lymph node cells from mice carrying a chimeric mouse-human class II transgene with an RA-associated peptide binding site, and lack murine class II molecules (Muller et al., 1990; Woods et al., 1994; Current Protocols in Immunology, Vol. 2, 7.21; Ito et al., 1996). Here, the immunization takes place *in vivo*, but the inhibition and readout are *ex vivo*. Transgenic mice expressing MHC class II molecules with binding sites of the RA associated molecule, DRB1* 0401 were previously generated (Ito et al 1996).

WO 01/87338

PCT/US01/15626

These mice lack murine MHC class II, and thus, all Th responses are channelled through a single human RA-associated MHC class II molecule (Ito et al. 1996). These transgenic mice represent a model for testing human class II antagonists.

- 5 The inhibitory effect of the anti-HLA-DR antibody fragments and their IgG forms were tested on T-cell proliferation measured using chimeric T-cells and antigen presenting cells isolated from the lymph nodes of chimeric 0401-IE transgenic mice (Taconic, USA) previously immunized with hen egg ovalbumin (Ito et al. 1996) according to standard procedures. 1.5×10^5 cells are incubated in 0.2 ml wells of 96-well tissue
10 culture plates in the presence of ovalbumin (30 μ g per well - half-maximal stimulatory concentration) and a dilution series of the anti-HLA DR antibody fragment or IgG form under test (0.1 nM - 200 nM) in serum free HL-1 medium containing 2 mM L-glutamine and 0.1 g/l Kanamycin for three days. Antigen specific proliferation is measured by ^3H -methyl-thymidin (1 μ Ci/well) incorporation during the last 16h of
15 culture (Falcioni et al., 1999). Cells are harvested, and ^3H incorporation measured using a scintillation counter (TopCount, Wallac Finland). Inhibition of T-cell proliferation on treatment with the anti-HLA DR antibody fragment and its IgG form may be observed by comparison to control wells containing antigen.

20 *19. Selection of useful polypeptide for the treatment of cancers*

- In order to select the most appropriate protein/peptide to enter further experiments and to assess its suitability for use in a therapeutic composition for the treatment of cancers, additional data are collected. Such data for each IgG form of the anti-HLA antigen antibody fragments can include the binding affinity, *in vitro* killing efficiency as
25 measured by EC50 and cytotoxicity across a panel of tumor cell lines, the maximal percentage cell killing as estimated *in vitro*, and tumor reduction data and mouse survival data from *in vivo* animal models.

- The IgG form of the anti-HLA antigen antibody fragments that shows the highest
30 affinity, the lowest EC50 for killing, the highest maximal percentage cell killing and broadest across various tumor cell lines, the best tumor reduction data and/or the best mouse-survival data may be chosen to enter further experiments. Such experiments may include, for example, therapeutic profiling and toxicology in animals and phase I clinical trials in humans.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

20. *Selection of useful polypeptide for the treatment of diseases of the immune system*

In order to select the most appropriate protein/peptide to enter further experiments and to assess its suitability for use in a therapeutic composition for the treatment of diseases of the immune system, additional data are collected. Such data for each monovalent antibody fragment or IgG form of the anti-HLA antigen antibody fragments can include the affinity, reactivity, specificity, IC50-values, for inhibition of IL-2 secretion and of T-cell proliferation, or *in vitro* killing efficiency as measured by EC50 and the maximal percentage cell killing as estimated *in vitro*, and DR-transgenic models of transplant rejection and graft vs. host disease.

The antibody fragment or IgG form of the anti-HLA antigen antibody fragments that shows the lowest EC50, highest affinity, highest killing, best specificity and/or greatest inhibition of T-cell proliferation or IL-2 secretion, and high efficacy in inhibiting transplant rejection and/or graft vs. host disease in appropriate models, might be chosen to enter further experiments. Such experiments may include, for example, therapeutic profiling and toxicology in animals and phase I clinical trials in humans.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Table 1:
 VH and VL families, VL CDR1 and VH/VL CDR 3 sequences of HLA-DR-specific polypeptides

Clone	VH	CDR3 Length	VH-CDR3-Seq.	VL	VL-CDR1-Seq.	CDR3 Length	VL-CDR3-Seq.	Families
MS-GPC-1	H2	10	QYGHRRGGFDH	λ 1	SGSSSNIGSNVVS	8	QSYDFNES	H2 λ 1
MS-GPC2	H6	19	SHMKWRFYNY SLYDFDF	κ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQESGFPY	H6 κ 3
MS-GPC3	H1B	7	LSTRMDP	κ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQDDNFPI	H1B κ 3
MS-GPC4	H2	16	YYVSVGYGVTHY DDV	κ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQDYSYPS	H2 κ 3
MS-GPC5	H1A	6	HSFFDY	λ 3		9	QSYDNYDIS	H1A λ 3
MS-GPC-6	H3	9	GYGRYSPDL	κ 3	RASQSVSSSYLA	8	QQYSNLPF	H3 κ 3
MS-GPC7	H2	13	SONGFYGGNLDI	λ 1	SGSSSNIGSNVVS	8	QSRDPSNV	H2 λ 1
MS-GPC-8	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSSSNIGSNVVS	8	QSYDMPQA	H2 λ 1
MS-GPC-10	H2	10	QLHYRGGFDL	λ 1	SGSSSNIGSNVVS	8	QSYDLTMG	H2 λ 1
MS-GPC11	H2	10	SGYRGGLDV	λ 1	SGSSSNIGSNVVS	8	QSYDYGIV	H2 λ 1

5

WO 01/87338

PCT/US01/15626

MS-GPC14	H3	12	SSMPMYGEGFDL	λ3		10	QSYDFGVSHS	H3λ3
MS-GPC15	H3	10	FYSHVLAMDN	λ3		10	QSRDIHNE	H3λ3
MS-GPC16	H6	8	TQLYFDY	κ2		8	QQYNSYPR	H6κ2
MS-GPC-8-1	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIIGSNVVS	8	QSYDFSHY	H2λ1
MS-GPC-8-6	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIIGSNVVS	8	QSYDYDHY	H2λ1
MS-GPC-8-9	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIIGSNVVS	8	QSYDIQLH	H2λ1
MS-GPC-8-10	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIIGSNVVS	8	QSYDLIRH	H2λ1
MS-GPC-8-17	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIIGSNVVS	8	QSYDFSVY	H2λ1
MS-GPC-8-18	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIIGSNVVS	8	QSYDFSiy	H2λ1
MS-GPC-8-27	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSSSNIIGSNVVS	8	QSYDMNVH	H2λ1
MS-GPC-8-6-2	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIIGSNVHV	8	QSYDYDHY	H2λ1
MS-GPC-8-6-18	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIIGSNVVA	8	QSYDYDHY	H2λ1
MS-GPC-8-6-27	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSDSNIIGANVVT	8	QSYDYDHY	H2λ1
MS-GPC-8-6-45	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSEPNIGSNVVF	8	QSYDYDHY	H2λ1
MS-GPC-8-6-13	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIIGANVVT	8	QSYDYDHY	H2λ1
MS-GPC-8-6-47	H2	10	SPRYRGAFDY	λ1	SGSESNIIGSNVVS	8	QSYDYDHY	H2λ1

WG 01/87338

PCT/US01/15626

MS-GPC-8-10-57	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNIGNVVQ	8	QSYDLIRH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-7	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNIGNVVG	8	QSYDMNVH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-10	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNIGNVYN	8	QSYDMNVH	H2 λ 1
MS-GPC-8-27-41	H2	10	SPRYRGAFDY	λ 1	SGSESIGNIGNVVQ	8	QSYDMNVH	H2 λ 1

Table 2:

Steps in Antibody optimisation	Fab	k_{on} [$s^{-1}M^{-1}$] $\times 10^5$ +/- SD	k_{off} [s^{-1}] $\times 10^4$ +/- SD	K_D (nM) +/- SD	L-CDR3	L-CDR1
Parental Fab	MS-GPC-8	0.89 \pm 0.40	29.0 \pm 6.40	348.1 \pm 140.8 ^{a)}	QSYDMIPQA	SGSSSNIGSNYYYS
L-CDR3-optim.	-8-1	1.93	20.9	108 ^{b)}		
L-CDR3-optim.	-8-6	0.96 \pm 0.14	5.46 \pm 0.73	58.6 \pm 11.7 ^{b)}		
L-CDR3-optim.	-8-9	1.85	16.6	90.1 ^{b)}		
L-CDR3-optim.	-8-10	nd	7.0 ^{b)}	nd		
L-CDR3-optim.	-8-17	1.0	5.48	54.7 ^{b)}		
L-CDR3-optim.	-8-18	1.06	8.3	78.3 ^{b)}		
L-CDR3-optim.	-8-27	nd	6.6 ^{b)}	nd		
L-CDR3-optim.	-8-6	0.96 \pm 0.14	5.48 \pm 0.73	58.6 \pm 11.7 ^{b)}	QSYDYDHY	SGSSSNIGSNYYYS
L-CDR3*1-optim.	-8-6-2	1.23 \pm 0.11	0.94 \pm 0.07	7.61 \pm 0.25 ^{b)}	QSYDYDHY	SGSESNIGSNYYH
L-CDR3*1-optim.	-8-6-19	1.10 \pm 0.08	0.96 \pm 0.15	8.74 \pm 1.33 ^{b)}	QSYDYDHY	SGSESNIGSNYYA
L-CDR3*1-optim.	-8-6-27	1.80 \pm 0.24	1.10 \pm 0.15	6.30 \pm 0.63 ^{b)}	QSYDYDHY	SGSDSNIGSNYYT
L-CDR3*1-optim.	-8-6-45	1.20 \pm 0.07	1.03 \pm 0.04	8.63 \pm 0.61 ^{b)}	QSYDYDHY	SGSEPNIGSNYYF
L-CDR3*1-optim.	-8-6-13	1.90 \pm 0.28	0.55 \pm 0.05	2.86 \pm 0.46 ^{b)}	QSYDYDHY	SGSESNIGSNYYT
L-CDR3*1-optim.	-8-6-47	1.87 \pm 0.29	0.62 \pm 0.04	3.18 \pm 0.33 ^{b)}	QSYDYDHY	SGSESNIGSNYYYS
L-CDR3*1-optim.	-8-10-57	1.65 \pm 0.21	0.44 \pm 0.06	2.67 \pm 0.25 ^{b)}	QSYDLIRH	SGSESNIGSNYYQ
L-CDR3*1-optim.	-8-27-7	1.74 \pm 0.21	0.57 \pm 0.07	3.30 \pm 0.34 ^{b)}	QSYDMNVH	SGSESNIGSNYYG
L-CDR3*1-optim.	-8-27-10	1.76 \pm 0.21	0.53 \pm 0.05	3.01 \pm 0.21 ^{b)}	QSYDMNVH	SGSESNIGSNYYN

WO 01/87338

PCT/US01/15626

L-CDR3*1-opt.	-9-27-41	1.87 ± 0.18	0.49 ± 0.03	2.98 ± 0.27 ^{ns}	QSYDMNVH	SGSESIGNNYVQ
---------------	----------	-------------	-------------	---------------------------	----------	--------------

- a) Affinity data of MS-GPC-8 are based on 8 different Fab-preparations which were measured on 4 different chips (2 x 500, 1000, 4000RU)
 - b) For MS-GPC-8 mean and standard deviation of 3 different preparations on 3 different chips (500, 4000, 3000RU) is shown.
 - c) 3000RU MHCII were immobilized on a CM5-chip. For each measurement 7 different concentrations from 1µM to 18nM were injected on the surface. Dissociation time: 150sec, regeneration was reached by 6M 10mM Glycine pH2.3 followed by 8M 7.5mM NaOH. For MS-GPC-8-19 mean and standard deviation of 4 different preparations are shown whereas for all other binders mean and standard deviation of 3 different preparations are shown.
 - d) One protein preparation is measured on 3 different chips (5000, 2800 and 6500RU).
 - e) Affinity determination of matured MHCII binder on a 4000RU density chips; single measurement.
- Molecular weights were determined after size exclusion chromatography and found 100% monomeric with the right molecular weight between 45 and 48 kDa.

Table 3a

Affinities of selected IgG4 monoclonal antibodies constructed from F_{ab}'s. Errors represent standard deviations

Binder (IgG ₄)	k _{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] x10 ⁵	k _{off} [s ⁻¹] x10 ⁶	K _D [nM]
MS-GPC-8-27-41	1.1 ± 0.2	3.1 ± 0.4	0.31 ± 0.06
MS-GPC-8-6-13	0.7 ± 0.1	3 ± 1	0.5 ± 0.2
MS-GPC-8-10-57	0.7 ± 0.2	4 ± 1	0.6 ± 0.2

Table 3b

Affinities of binders obtained out of affinity maturation of CDR1 light chain optimisation following CDR3 heavy chain optimisation. Errors represent standard deviations

Binder (F _{ab})	k _{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] x10 ⁵	k _{off} [s ⁻¹] x10 ⁶	K _D [nM]
MS-GPC-8-6-2	1.2 ± 0.1	0.94 ± 0.07	7.6 ± 0.3
MS-GPC-8-6-19	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2	9 ± 1
MS-GPC-8-6-27	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.2	6.3 ± 0.6
MS-GPC-8-6-45	1.20 ± 0.07	1.03 ± 0.04	8.6 ± 0.6
MS-GPC-8-6-13	1.9 ± 0.3	0.55 ± 0.05	3.0 ± 0.5
MS-GPC-8-6-47	2.0 ± 0.3	0.62 ± 0.04	3.2 ± 0.3
MS-GPC-8-10-57	1.7 ± 0.2	0.44 ± 0.06	2.7 ± 0.3
MS-GPC-8-27-7	1.7 ± 0.2	0.57 ± 0.07	3.3 ± 0.3
MS-GPC-8-27-10	1.8 ± 0.2	0.53 ± 0.05	3.0 ± 0.2
MS-GPC-8-27-41	1.7 ± 0.2	0.49 ± 0.03	2.9 ± 0.3

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Table 3c

Binders obtained out of affinity maturation of GPC8 by CDR3 light chain optimisation

Binder (Fab)	$k_{on} [M^{-1}s^{-1}] \times 10^5$	$k_{off} [s^{-1}] \times 10^{-3}$	$K_D [nM]$
MS-GPC 8-18	1.06	8.3	78.3
MS-GPC 8-9	1.85	16.6	90.1
MS-GPC 8-1	1.93	20.9	108
MS-GPC 8-17	1.0	5.48	54.7
MS-GPC-8-6 ^{a)}	1.2 +/- 0.1	5.5 +/- 0.7	8 +/- 12

Chip density 4000RU MHCII

a) For MS-GPC-8-6 mean and standard deviation of 3 different preparations on 3 different chips (500, 4000, 3000RU) is shown.

Table 3d

Binders obtained out of HuCAL in scFv form and their converted Fabs

Binder	scFv			Fab		
	$k_{on} [M^{-1}s^{-1}] \times 10^5$	$k_{off} [s^{-1}] \times 10^{-3}$	$K_D [nM]$	$k_{on} [M^{-1}s^{-1}] \times 10^5$	$k_{off} [s^{-1}] \times 10^{-3}$	$K_D [nM]$
MS-GPC 1	0.413	61	1500	0.639	53	820
MS-GPC 3	0.445	530	11800			
MS-GPC 4	0.55	550	10000			
MS-GPC 6	0.435	200	4600	0.135	114	8470 (1 curve)
MS-GPC 7	0.312	264	8140	0.783	190	2410
MS-GPC 8	0.114	76	560	0.99 +/- 0.40	29.0 +/- 8.4	346 ^{b)} +/- 141
MS-GPC 10	0.187	180	9625	0.22	63	2860
MS-GPC 11	0.384	100	2500	0.361	65	1800

Chip density 500RU MHCII

a) Affinity data of MS-GPC-8 are based on 8 different Fab-preparations which were measured on 4 different chips (2 x 500, 1000, 4000RU) and are shown with standard deviation.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Table 4

Killing efficiency after 4 hour incubation of cells with cross-linked anti-HLA-DR antibody fragments, and maximum killing after 24 hour incubation

Cross-linked Fab fragment	Killing efficiency against GRANTA	Maximum killing against Priess
MS-GPC-1	+	+
MS-GPC-6	+	+
MS-GPC-8	+	+
MS-GPC-10	+	+
MS-GPC-8-6	++	++
MS-GPC-8-17	++	++
MS-GPC-8-6-13	+++	+++
MS-GPC-8-10-57	+++	+++
MS-GPC-8-27-41	+++	+++

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Table 5

Killing efficiency of anti-HLA-DR IgG antibodies of human composition compared to murine anti-HLA-DR antibodies against a panel of lymphoid tumor cell lines.

Name	Cell line		HLA-DR expression mean-FL	% Killing by mAb					
	DR type	Type		murine mAbs		human mAbs			
			L243	L243	8D1	MS-GPC-8	8-27-41	8-10-57	8-5-13
LG-2	1.1	B-lymphoblastoid	458	79	85	86	87	88	82
Press	4.4	B-lymphoblastoid	621	87	83	85	88	93	74
ARH-77	12	B-lymphoblastoid	301	88	73	84	85	88	87
GRANTA-519	2.11	B cell non-Hodgkin	1465	83	56	76	78	78	73
KARPAS-422	2.4	B cell non-Hodgkin	186	25	32	51	66	68	71
KARPAS-299	1.2	T cell non-Hodgkin	919	78	25	81	82	79	76
DOHH-2	1.2	B cell lymphoma	444	29	23	58	59	60	53
SR-786	1.2	T cell lymphoma	142	3	8	1	53	44	26
MHH-CALL-4	1.2	B-ALL	348	35	41	43	63	46	43
MIN-60	10.13	B-ALL	1120	46	22	71	69	66	67
BJAB	12.13	Burkitt lymph.	338	53	59	49	71	67	64
RAJI	10.17	Burkitt lymph.	617	69	64	81	84	86	83
L-428	12	Hodgkin's lymph.	244	82	81	82	91	91	92
HDLM-2		Hodgkin's lymph.	326	77	73	89	88	84	90

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Table 6

EC50 values for certain anti-HLA-DR antibody fragments of the invention in a cell-killing assay against lymphoid tumor cells. All EC50 refer to nanomolar concentrations of the bivalent agent (IgG or cross-linked Fab) such that values for cross-linked Fab and IgG forms can be compared.

Antibody fragment	Form	Cell line tested	EC50 of cell killing (nM) +/- SE for bivalent agent
MS-GPC-1	Fab	PRIESS	54 ± 14
MS-GPC-8	Fab	PRIESS	31 ± 9
MS-GPC-10	Fab	PRIESS	33 ± 5
MS-GPC-8-17	Fab	PRIESS	16 ± 4
MS-GPC-8-6-2	Fab	PRIESS	8 ± 2
MS-GPC-8-10-57	Fab	LG2	7.2
MS-GPC-8-27-41	Fab	LG2	7.2
MS-GPC-8-27-41	Fab	PRIESS	7.7
MS-GPC-8	IgG4	PRIESS	8.3
MS-GPC-8-27-41	IgG4	PRIESS	1.1 ± 0.1
MS-GPC-8-10-57	IgG4	PRIESS	1.1 ± 0.2
MS-GPC-8-27-41	IgG4	LG2	1.23 ± 0.2
MS-GPC-8-10-57	IgG4	LG2	1.0 ± 0.1
8D1	mIgG	PRIESS	33
L243	mIgG	PRIESS	47

WO 01/87338

PCT/US01/15626

Table 7

IC50 values for certain anti-HLA-DR antibody fragments of the invention in an assay to determine IL-2 secretion after antigen-specific stimulation of T-Hyb 1 cells. IC50 for the IgG forms (bivalent) are represented as molar concentrations, while in order to provide easy comparison, IC50s for the Fab forms (monovalent) are expressed in terms of half the concentration of the Fab to enable direct comparison to IgG forms.

Anti-HLA-DR antibody fragment	Form	IC50		Maximum inhibition(%)
		(IgG/nM)		
		(Fab)/2/nM)	SE	
MS-GPC-8-10-57	IgG	0.31	0.01	100
MS-GPC-8-27-41	IgG	0.28	0.07	100
MS-GPC-8-6-13	IgG	0.42	0.06	100
MS-GPC-8-6-2	IgG	3.6	1.1	100
MS-GPC-8-6	IgG	6.7	2.0	100
MS-GPC-8	IgG	11.0	0.8	100
MS-GPC-8-6-2	Fab	4.7	1.9	100
MS-GPC-8-6-13	Fab	2.1	0.8	100
MS-GPC-8-6-19	Fab	5.3	0.2	100
MS-GPC-8-10-57	Fab	2.9	1.0	100
MS-GPC-8-6-27	Fab	3.0	1.2	100
MS-GPC-8-6-47	Fab	2.6	0.6	100
MS-GPC-8-27-7	Fab	5.9	2.2	100
MS-GPC-8-27-10	Fab	7.3	1.9	100
MS-GPC-8-27-41	Fab	3.6	0.7	100
MS-GPC-8-6	Fab	20		100
MS-GPC-8	Fab	110		100

WO 01/87338

PCT/US01/15626

References

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1998) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, U.S.A.
- Babbitt B, Allen PM, Matsueda G, Hane E, Ulanue ER, (1985), Nature 317:359.
- Baxevanis, C.N., Wernet, D., Nagy, Z.A., Maurer, P.H., and Klein, J. (1980). Immunogenetics, 11, 617.
- Billing, R., and Chatterjee, S. (1983). Transplant. Proc. 15, 649.
- Bird, R.E. et al. Single-chain antigen-binding proteins [published erratum appears in Science 1989 Apr 28;244(4903):409]. Science 242, 423-6 (1988).
- Bonagura, V.R., Ma, a., McDowell, J., Lewison, A., King, D.W. and Suciu-Foca, N. (1987). Cell. Immunol., 108(2), 356.
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S., Lee, B. & Pastan, I. (1993). A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7538-7542.
- Brown JH, Jardetsky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC., (1993), Nature 364: 33.
- Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M., (1999) Blood 93: 1992
- Current Protocols in Immunology, Vol. 2, 7.21.
- Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, Fauchet R, Charron DJ, Mooney NA., (1999), J. Immunol. 163: 4115.
- Falcioni et al. (1999). Nat Biotechnol. 17: 562-567.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I. & Plückhun, A. (1990). A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. Biochemistry 29, 1362-1367.
- Gorga J.C., Foran, J., Burakoff, S.J., Strominger, J.L., (1984) Meth Enzym., 108, 607-813.
- Gorga, J.C., Horejsi, V., Johnson, D.R., Raghupathy, R., Strominger, J.L., J.Biol. Chem. 262 (1987)16087-94.
- Gorga, J.C., Knudsen, P.J., Foran, J.A., Strominger, J.L., Burakoff, S.J., (1986), Cell. Immunol. 103 160-73.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

- Heiskanen T, Lundkvist A, Soliymani R, Koivunen E, Vaheri A, Lankinen H (1999) *Virology*, 282(2), 321.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L. & Conton, P.J. (1988), *Bio/Technology* 6, 1204-1210.
- Huston, J.S. et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5879-83 (1988).
- Ito K, Bian H.-J, Molina M, Han J, Magram J, Saar E, Belunis C, Bolin DR, Arceo R, Campbell R, Falcioni F, Vidovic' D, Nagy ZA., (1996), *J. Exp. Med.* 183: 2635-2644.
- Jones et al., (1986), *Nature* 321: 522-525.
- Jonker, M., Schellekens, P.T., Harpprecht, J., and Slingerland, W. (1991), *Transplant. Proc.*, 23, 264.
- Jonker, M., van Lambalgen, R., Mitchell, D.J., Durham, S.K., and Steinman, L. (1988), *Autoimmunity*, 1, 389.
- Kahoury E.L. and Marshall L.A., (1990) *Cell. Tissue Res.*, 262(2):217-24
- Kashmiri S.V., Iwahashi, M., Tamura., Pacian, E.A., Milenic, D.E. & Sclom, J (2001) *Crit Rev Oncol Hematol.* 38: 3-16.
- Klohe EP, Watts R, Bahl M, Alber C, Yu W-Y, Anderson R, Silver J, Gregersen PK, Karr RK., (1988), *J. Immunol.* 141: 2158-2164.
- Knappik, A. & Plückthun, A., (1994), *Biotechniques* 17, 754-761.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Welthofer, G., Hoess A., Wölle, J., Plückthun, A. and Virnekäs, B., (2000), *J. Mol. Biol.* 298, 55.
- Kozak, M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 947.
- Kuby, J. *Immunology*, 1994, 2nd edition.
- McMichael, S.J., Sasazuki, T., McDevitt, H.O., and Payne, R.O., (1977), *Arthritis Rheum.*, 20, 1037.
- Muller et al., (1990), *J. Immunol.*, 145: 4006.
- Nagy, Z & Vidovic, D. (1996) WO9617874.
- Naquet, P., Marchetto, S., and Pierres, M., (1983), *Immunogenetics*, 18, 559.
- Nepom, G.T., Benacerraf, B., and Germain, R.N., (1981), *J. Immunol.*, 127, 31.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

- Nepom, G.T., Byers, P., Seyfried, C., Healey, L.A., Wilske, K.R., Stage, D., and Nepom, B.S., (1989), *Arthritis Rheum.*, 32,15.
- Ohta, N., Nishimura, Y.K., Tanimoto, K., Horiuchi, Y., Abe, C., Shiokawa, Y., Abe, T., Katigari, M., Yoshiki, T., and Sasazuki, T., (1982), *Hum. Immunol.*, 5, 123.
- Otten et al (1997) pp 5.4.1 - 5.4.19 in *Current Protocols in Immunology*, Eds. Coligan et al. Green & Wiley, New York.
- Pack, P. and Plückthun, A., (1992), *Biochemistry* 31, 1579-1584.
- Pack, P., (1994), Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knüpfel, U., Wenderoth, R., Riesenberg D. and Plückthun, A. (1993), *Bio/Technology* 11, 1271-1277.
- Pichla, S.L., Murali, R. & Burnett, R.M (1997) *J Struct Biol.* 119: 6-16.
- Presta, (1992), *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596.
- Riechmann et al., (1988), *Nature* 332: 323-329.
- Rheinhecker, M., Hardt, C., Ilag, L.L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Plückthun, A. and Pack, P., (1996), *J. Immunol.* 157, 2989.
- Rosenbaum, J.T., Adelman, N.E., and McDevitt, H.O., (1983), *J. Exp. Med.*, 154, 1694.
- Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed.
- Schiff, B., Mizrahi, Y., Orgad, S., Yaron, M., and Gazit, I., (1982), *Ann. Rheum. Dis.*, 41, 403.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (1993). *Prot. Engineering* 6, 109-122.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (1994). *J. Chromatogr. A* 676, 337-345.
- Schmidt, T. G. M. et al. (1996). *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.
- Skerra, A. and Plückthun, A. (1988). *Science* 240, 1038.
- Slavin-Chiorini, D.C., Kashmiri, S.V., Milenic, D.E., Poole, D.J., Berman, E., Schlom, J. & Hand, P.H (1997) *Cancer Biother Radiopharm* 12: 305-316.
- Smith, R.M., Morgan, A., and Wraith, D.C. (1994). *Immunology*, 83, 1.
- Stasny, P. (1978). *N. Engl. J. Med.*, 298, 869.
- Stausbøl-Grøn, B., Wind, T., Kjær, S., Kahns, L., Hansen, N.J.V., Kristensen, P. and Clark, B.F.C. (1996) *FEBS Lett.* 391, 71.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

- Stern, A.S. and Podlaski, F.J. (1993) *Techniques in Protein Chemistry IV*, Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Stevens, H.P., Roche, N., Hovius, S.E., and Jonker, M., (1990), *Transplant. Proc.*, 22, 1783.
- Tiwari, J., and Terasaki, P., (1985), *HLA and disease association*. (New York: Springer Verlag).
- Vidovic D, Falcioni F, Bolin DR, Nagy ZA., (1995a), *Eur. J. Immunol.*, 25: 1326.
- Vidovic D, Falcioni F, Siklodi B, Belunis CJ, Bolin DR, Ito K, Nagy ZA., (1995b), *Eur J. Immunol.*, 25:3349.
- Vidovic D, & Toral, J. (1998) *Cancer Letters* 128: 127-135.
- Vimekäs, B., Ge, L., Plukthun, A., Schneider, K.C., Wellenhofer, G. & Moroney, S.E. (1994) *Nucleic Acids Res* 22 : 5600-5607.
- Vose, J.M., Colcher, D., Gobar, L., Bierman, P.J., Augustine, S., Tempero, M., Leichner, P., Lynch, J.C., Goldenberg, D. & Armitage, J.O. (2000) *Leuk Lymphoma* 38 : 91-101.
- Voss, S. & Skerra, A. (1997). *Protein Eng.* 10, 975-982.
- Waldor, M.K., Sriram, S., McDevitt, H.O., and Steinman, L. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2713.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. (1994) *Making antibodies by phage display technology. Annu. Rev. Immunol.* 12, 433.
- Woods et al., (1994), *J Exp Med.* 180: 173-81.

Claims

1. A composition including a polypeptide comprising at least one antibody-based antigen-binding domain of human composition with a binding specificity for an antigen expressed on the surface of a cell, wherein treating cells expressing said antigen with one or more of said polypeptides causes or leads to suppression of an immune response, and wherein the IC₅₀ for said suppression of an immune response is 1 μ M or lower.
2. A composition including a polypeptide comprising at least one antibody-based antigen-binding domain with a binding specificity for human HLA DR antigen, wherein treating cells expressing HLA DR with said polypeptide causes or leads to suppression of an immune response, and wherein said antibody based antigen-binding domain includes a combination of a VH domain and a VL domain, wherein said combination is found in one of the clones taken from the list of MS-GPC-1, MS-GPC-2, MS-GPC-3, MS-GPC-4, MS-GPC-5, MS-GPC-6, MS-GPC-7, MS-GPC-8, MS-GPC-10, MS-GPC-11, MS-GPC-14, MS-GPC-15, MS-GPC-16, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18, MS-GPC-8-27, MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 and MS-GPC-8-27-41.
3. The composition of claim 1, wherein said antigen expressed on the surface of said cell is a human MHC class II antigen.
4. A composition including a polypeptide comprising at least one antibody-based antigen-binding domain with a binding specificity for a human MHC class II antigen with a K_d of 1 μ M or less, wherein treating cells expressing said antigen with said polypeptide causes or leads to suppression of an immune response.
5. A composition including a polypeptide comprising at least one antibody-based antigen-binding domain with a binding specificity for a human MHC class II antigen with a K_d of 1 μ M or less, said antibody based antigen-binding domain being isolated by a method which includes isolation of VL and VH domains of human composition from a recombinant antibody library by ability to bind to human MHC class II antigen, wherein treating cells expressing MHC Class II with said polypeptide causes or leads to suppression of an immune response.
6. The composition of claim 5, wherein the method for isolating the antibody based antigen-binding domain includes the further steps of:

WO 01/87338

PCT/US01/15626

- a. generating a library of variants at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences of one or both of the VL and VH domains, and
 - b. isolation of VL and VH domains from the library of variants by ability to bind to human MHC class II antigen with a K_d of $1\mu\text{M}$ or less.
7. The composition of any of claims 3 to 6, wherein said antibody based antigen-binding domain binds to HLA-DR
 8. The composition of any of claims 2 to 7 wherein said antibody based antigen-binding domain binds to the β -chain of HLA-DR.
 9. The composition of claim 8, wherein said antibody based antigen-binding domain binds to an epitope of the first domain of the β -chain of HLA-DR.
 10. The composition of any of claims 1 to 9, wherein said cells are lymphoids cells.
 11. The composition of any of claims 1 to 9, wherein said cells are non-lymphoid cells and express MHC class II antigens.
 12. The composition of any of claims 1 to 11, having an IC_{50} for suppressing an immune response of $1\mu\text{M}$ or less.
 13. The composition of any of claims 1 to 11, having an IC_{50} of inhibition of IL-2 secretion of $1\mu\text{M}$ or less
 14. The composition of any of claims 1 to 11, having an IC_{50} of inhibition of T cell proliferation of $1\mu\text{M}$ or less
 15. The composition of any of claims 1 to 14, wherein said antibody based antigen-binding domain binds to one or more HLA-DR types selected from the group consisting of DR1-0101, DR2-15021, DR3-0301, DR4Dw4-0401, DR4Dw10-0402, DR4Dw14-0404, DR6-1302, DR6-1401, DR8-8031, DR9-8012, DRw53-B4*0101 and DRw52-B3*0101.
 16. The composition of claim 15, wherein said antibody based antigen-binding domain binds to at least 3 different of said HLA-DR types, preferably to at least 5 different of said HLA-DR types, and more preferably to at least 7 different of said HLA-DR types.
 17. The composition of any of claims 3 to 16, wherein said antibody based antigen-binding domain includes a combination of a VH domain and a VL domain, wherein said combination is found in one of the clones taken from the list MS-GPC-1, MS-GPC-2, MS-GPC-3, MS-GPC-4, MS-GPC-5, MS-GPC-6, MS-GPC-7, MS-GPC-8, MS-GPC-10, MS-GPC-11, MS-GPC-14, MS-GPC-15, MS-GPC-16, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18, MS-GPC-

WO 01/87338

PCT/US01/1526

8-27, MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 and MS-GPC-8-27-41.

18. The composition of any one of claims 3 to 16, wherein said antibody based antigen-binding domain includes of a combination of HuCAL VH2 and HuCAL VA1, wherein the VH CDR3, VL CDR1 and VL CDR3 is found in one of the clones taken from the list of list MS-GPC-1, MS-GPC-4, MS-GPC-7, MS-GPC-8, MS-GPC-10, MS-GPC-11, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18, MS-GPC-8-27, MS-GPC-8-6-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 and MS-GPC-8-27-41.
19. The composition of any of claims 3 to 16, wherein said antibody based antigen-binding domain includes a combination of HuCAL VH2 and HuCAL VA1, wherein the VH CDR3 sequence is taken from the consensus CDR3 sequence

nnnnRGnFDn

wherein each n independently represents any amino acid residue; and/or

wherein the VL CDR3 sequence is taken from the consensus CDR3 sequence

QSYDnnnn

wherein each n independently represents any amino acid residue.

20. The composition of claim 19, wherein the VH CDR3 sequence is SPRYGAFDY and/or the VL CDR3 sequence is QSYDLIRH or QSYDMNVH.
21. The composition of any of claims 3 to 16, wherein said antibody based antigen-binding domain competes for antigen-binding with an antibody including a combination of HuCAL VH2 and HuCAL VA1, wherein the VH CDR3 sequence is taken from the consensus CDR3 sequence

nnnnRGnFDn

each n independently represents any amino acid residue; and/or

the VL CDR3 sequence is taken from the consensus CDR3 sequence

QSYDnnnn

each n independently represents any amino acid residue.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

22. The composition of claim 21, wherein the VH CDR3 sequence is SPRYGAFDY and/or the VL CDR3 sequence is QSYDLIRH or QSYDMNVH.
23. The composition of any of claims 3 to 22, wherein said antibody based antigen-binding domain includes a VL CDR1 sequence represented in the general formula
- $$\text{SGSnnNIGnNYVn}$$
- wherein each n independently represents any amino acid residue.
24. The composition of claim 23, wherein the CDR1 sequence is SGSESNIGNNYVQ.
25. The composition of any one of claims 1 to 24, wherein said suppression of an immune response is brought about by or manifests itself in down-regulation of expression of said antigen expressed on the surface of said cell.
26. The composition of any one of claims 1 to 24, wherein said suppression of an immune response is brought about by or manifests itself in inhibition of the interaction between said cell and other cells, wherein said interaction would normally lead to an immune response.
27. The composition of any one of claims 1 to 24, wherein said suppression of an immune response is brought about by or manifests itself in the killing of said cells.
28. The composition of claim 27, wherein said killing is mediated by treating said cells expressing antigen with a plurality of antibody based antigen-binding domains, wherein said antibody based antigen-binding domains are part of at least one multivalent polypeptide, and where neither cytotoxic entities nor immunological mechanisms are needed to causes or leads to said killing.
29. The composition of claim 27 or 28, wherein said killing affects at least 50%, preferably at least 75%, more preferably at least 85% of activated cells compared to killing of less than 30%, preferably less than 20%, more preferably less than 10% of non activated cells.
30. The composition of claim 27 to 29, wherein said killing is mediated by an innate, pre-programmed process of said cells.
31. The composition of claim 30, wherein said killing is non-apoptotic.
32. The composition of claim 30, wherein said killing is dependent (**only?**) on the action of non-caspase proteases.
33. The composition of claim 30, wherein said killing is independent of caspases that can be inhibited by zVAD-fmk or zDEVD-fmk.

WO 01/87338

PCT/US01/15626

34. The composition of any one of claims 1 to 33, wherein said composition comprises antibody fragments selected from Fv, scFv, dsFv and Fab fragments
35. The composition of any one of claims 1 to 33, wherein said composition comprises a F(ab')₂ antibody fragment or a mini-antibody fragment.
36. The composition of any one of claims 1 to 33, wherein said composition comprises at least one full antibody selected from the antibodies of classes IgG1, 2a, 2b, 3, 4, IgA, and IgM.
37. The composition of any one of claims 34 to 36, wherein said composition further comprises a cross-linking moiety or moieties.
38. The composition of claim 37, wherein the antigen-binding sites are cross-linked to a polymer.
39. The composition of any one of claims 1 to 38, formulated in a pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent.
40. A pharmaceutical preparation comprising the composition of claim 12 in an amount sufficient to suppress an immune response in an animal, such as where said animal is human.
41. A pharmaceutical preparation comprising the composition of claim 13 in an amount sufficient to inhibit IL-2 secretion in an animal, such as where said animal is human.
42. A pharmaceutical preparation comprising the composition of claim 14 in an amount sufficient to inhibit T cell proliferation in an animal, such as where said animal is human.
43. A diagnostic composition including the composition of any of claims 1 to 38.
44. The use of a composition of any one of claims 1 to 38, for preparing a pharmaceutical preparation for the treatment of animals, such as where said animals are human.
45. A nucleic acid including a protein (need to check definition) coding sequence for a polypeptide of the composition of any of claims 1 to 38.
46. A vector comprising the nucleic acid of claim 45, and a transcriptional regulatory sequence operably linked thereto.
47. A host cell harboring a nucleic acid of claim 45 or the vector of claim 46.
48. A method for the production of an immunosuppressive composition, comprising culturing the cells of claim 47 under conditions wherein the nucleic acid is expressed.

WO 01/87338

PCT/US01/1526

49. A method for suppressing activation of a cell of the immune system, comprising treating the cell with a composition of any of claims 1 to 39.
50. A method for suppressing proliferation of a cell of the immune system, comprising treating the cell with a composition of any of claims 1 to 39.
51. A method for suppressing IL-2 secretion by a cell of the immune system, comprising treating the cell with a composition of any of claims 1 to 39.
52. A method of suppressing the interaction of a cell of the immune system with another cell, comprising contacting the cell with the composition of any of claims 1 to 39.
53. A method for immunosuppressing a patient, comprising administering to the patient an effective amount of a composition of any of claims 1 to 39.
54. A method for killing a cell expressing an antigen on the surface of said cell comprising the step of treating the cell with a composition including a plurality of antibody based antigen-binding domains of any one of claims 1 to 39, wherein said antibody based antigen-binding domains are part of at least one multivalent polypeptide, and where neither cytotoxic entities nor immunological mechanisms are needed to cause or lead to said killing.
55. The method according to claim 54, wherein said antigen is HLA DR.
56. The use according to claim 44, wherein said treatment is the treatment of a disorder selected from rheumatoid arthritis, juvenile arthritis, multiple sclerosis, Grave's disease, insulin-dependent diabetes, narcolepsy, psoriasis, systemic lupus erythematosus, ankylosing spondylitis, transplant rejection, graft vs. host disease, Hashimoto's disease, myasthenia gravis, pemphigus vulgaris, glomerulonephritis, thyroiditis, pancreatitis, insulinitis, primary biliary cirrhosis, irritable bowel disease and Sjogren syndrome.
57. The use according to claim 44, wherein said treatment is the treatment of a disorder selected from myasthenia gravis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, transplant rejection and graft vs. host disease.
58. A method to identify patients that can be treated with a composition of any one of claims 1 to 38, formulated in a pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent, comprising the steps of
 - a. Isolating cells from a patient;
 - b. Contacting said cells with the composition of any one of claims 1 to 39
 - c. Measuring the degree of killing, immunosuppression, IL2 secretion or proliferation of said cells.

WO 01/87338

PCT/US01/15326

59. A kit to identify patients that can be treated with a composition of any of claims 1 to 38, formulated in a pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent, comprising
- d. A composition of any of claims 1 to 39
 - e. Means to measure the degree of killing or immunosuppression, IL2 secretion or proliferation of said cells
60. A kit comprising
- f. a composition according to any one of claims 1 to 39, and
 - g. a cross-linking moiety.
61. A kit comprising
- h. a composition according to any one of claims 1 to 39 or the diagnostic composition of claim 43, and
 - i. a detectable moiety or moieties, and
 - j. reagents and/or solutions to effect and/or detect binding of (i.) to an antigen.
62. A cytotoxic composition comprising a composition of any one of claims 1 to 38 operably linked to a cytotoxic agent.
63. An immunogenic composition comprising a composition of any one of claims 1 to 38 operably linked to an immunogenic agent.
64. A method to kill a cell expressing an antigen on the surface of said cell, comprising contacting said cell with a composition of any one of claims 1 to 38 operably linked to a cytotoxic or immunogenic agent.
65. The use of a composition of any one of claims 1 to 38 operably linked to a cytotoxic or immunogenic agent for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of animals
66. A method for conducting a pharmaceutical business comprising:
- (i) isolating one or more antibody based antigen-binding domains that bind to MHC class II expressed on the surface of human cells with a K_d of $1\mu M$ or less;
 - (ii) generating a composition comprising said antibody based antigen-binding domains, which composition is immunosuppressant with an IC_{50} of $100nM$ or less;
 - (iii) conducting therapeutic profiling of said composition for efficacy and toxicity in animals;

WO 01/87338

PCT/US01/15626

- (iv) preparing a package insert describing the use of said composition for immunosuppression therapy; and
 - (v) marketing said composition for use as an immunosuppressant.
67. A method for conducting a life science business comprising:
- (i) isolating one or more antibody based antigen-binding domains that bind to MHC class II expressed on the surface of human cells with a K_d of $1\mu\text{M}$ or less;
 - (ii) generating a composition comprising said antibody based antigen-binding domains, which composition is immunosuppressant with an IC_{50} of 100nM or less;
 - (iii) licensing, jointly developing or selling, to a third party, the rights for selling said composition.
68. The method of any of claims 66 or 67, wherein the antibody based antigen-binding domain is isolated by a method which includes
- a. isolation of VL and VH domains of human composition from a recombinant antibody library by ability to bind to HLA DR,
 - b. generating a library of variants at least one of the CDR1, CDR2 and CDR3 sequences of one or both of the VL and VH domains, and
 - c. isolation of VL and VH domains from the library of variants by ability to bind to HLA DR with a K_d of $1\mu\text{M}$ or less.
69. The method of any of claims 66 to 68, wherein antibody based antigen-binding domain is a combination of VH and VL domains found in the clones taken from the list of MS-GPC-1, MS-GPC-2, MS-GPC-3, MS-GPC-4, MS-GPC-5, MS-GPC-6, MS-GPC-7, MS-GPC-8, MS-GPC-10, MS-GPC-11, MS-GPC-14, MS-GPC-15, MS-GPC-16, MS-GPC-8-1, MS-GPC-8-6, MS-GPC-8-9, MS-GPC-8-10, MS-GPC-8-17, MS-GPC-8-18, MS-GPC-8-27, MS-GPC-8-8-2, MS-GPC-8-6-19, MS-GPC-8-6-27, MS-GPC-8-6-45, MS-GPC-8-6-13, MS-GPC-8-6-47, MS-GPC-8-10-57, MS-GPC-8-27-7, MS-GPC-8-27-10 and MS-GPC-8-27-41.

Figure 1b

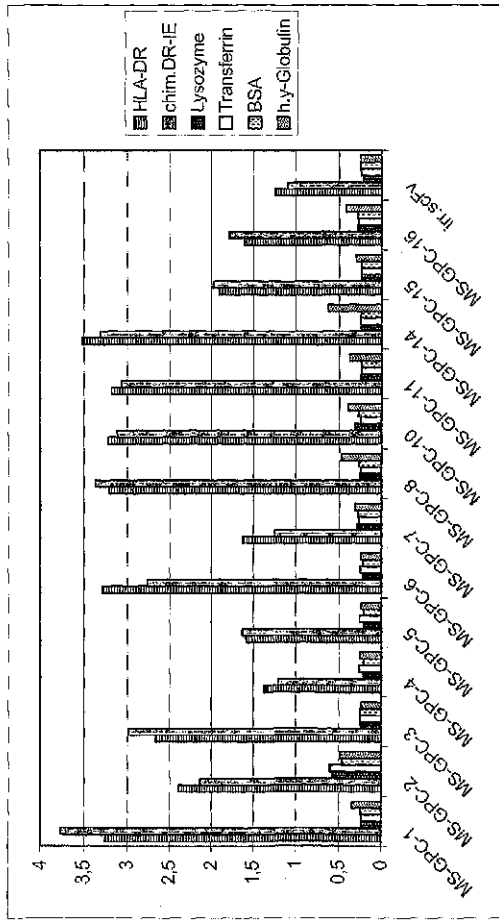


Figure 3

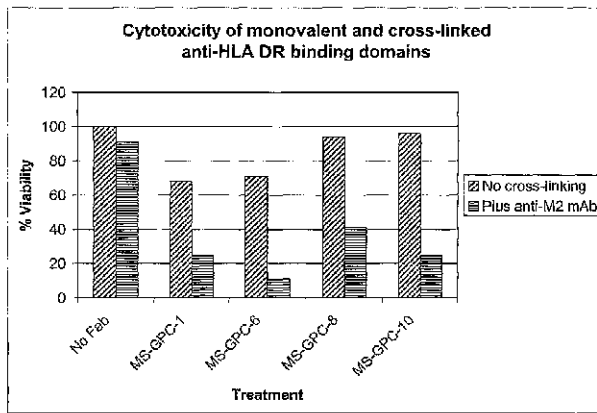
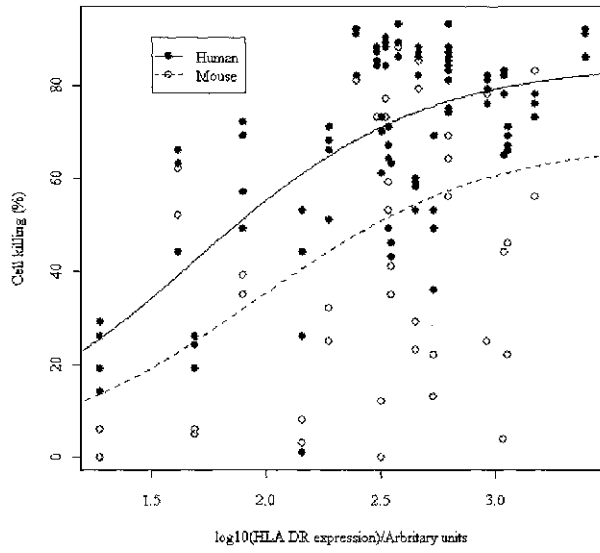


Figure 4



WO 01/87338

6/52

PCT/US01/15626

Figure 5

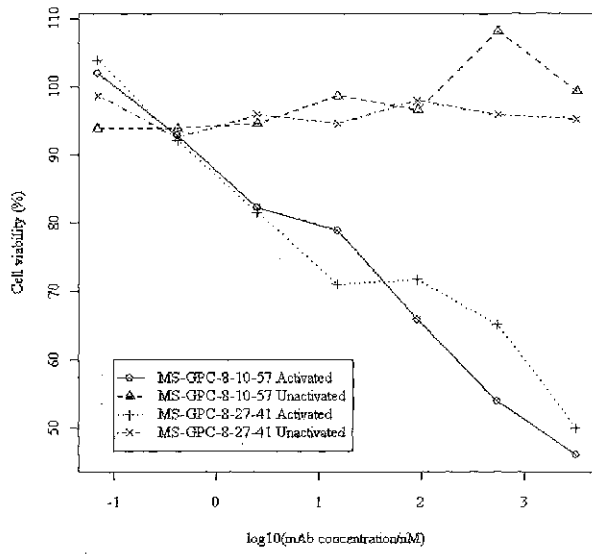


Figure 6

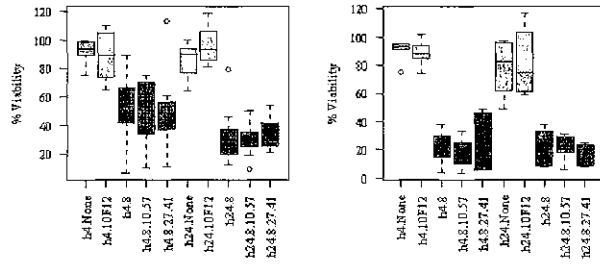
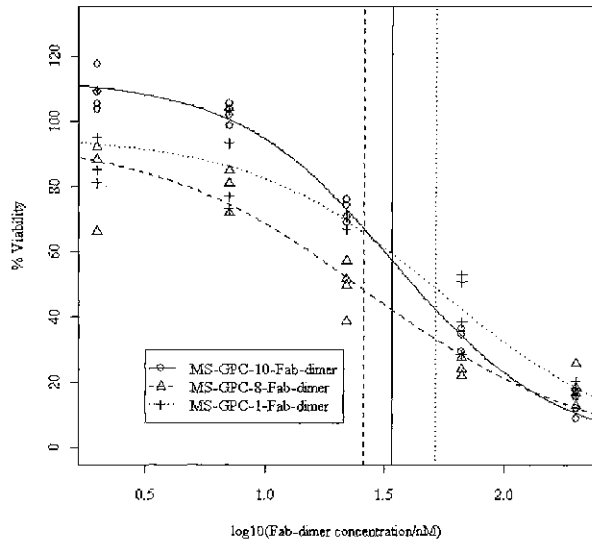


Figure 7a

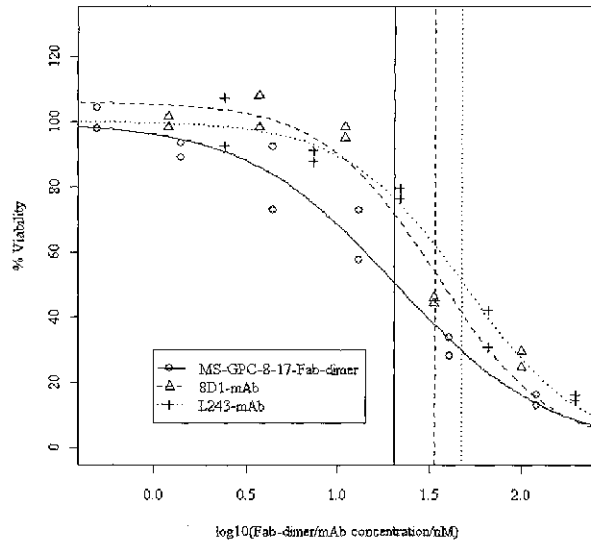


WO 01/87338

9/52

PCT/US01/15626

Figure 7b

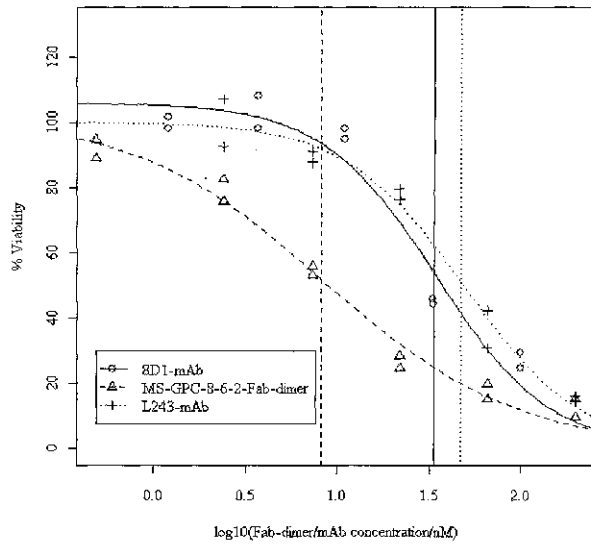


WO 01/87338

10/52

PC/T/US01/15626

Figure 7c



WO 01/87338

11/52

PCT/US01/15626

Figure 7d

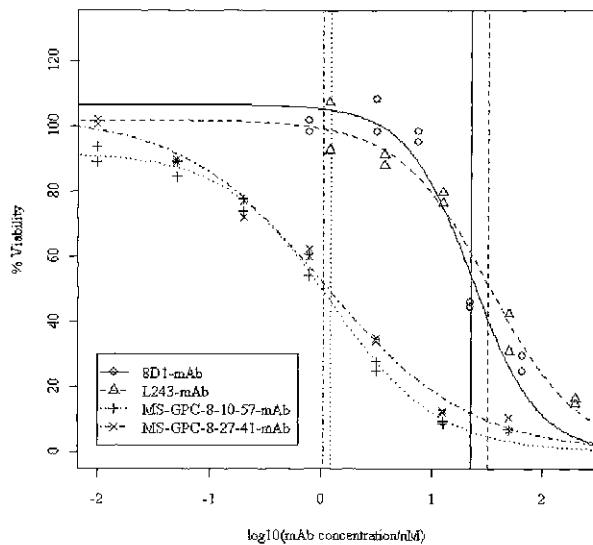
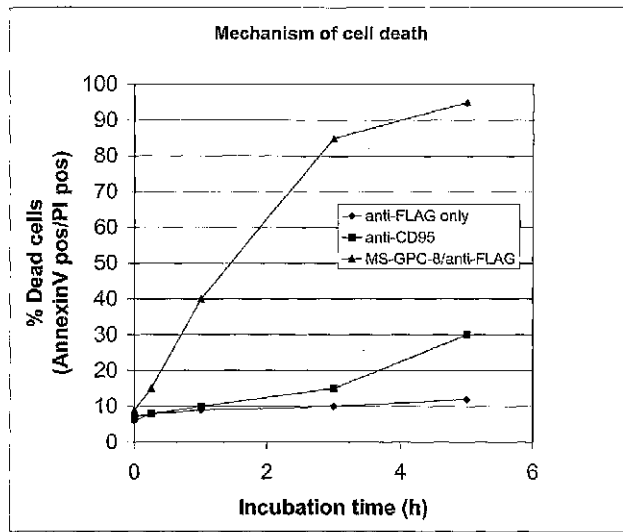


Figure 8a

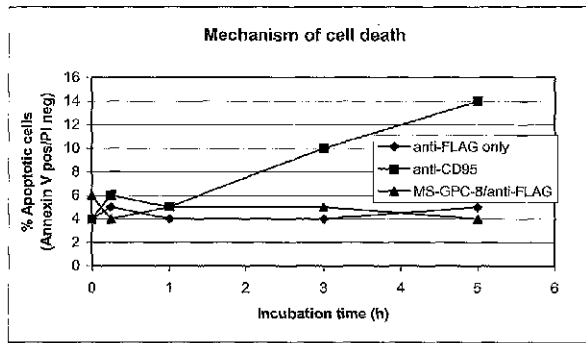


WO 01/87338

13/52

PCT/US01/15626

Figure 8b

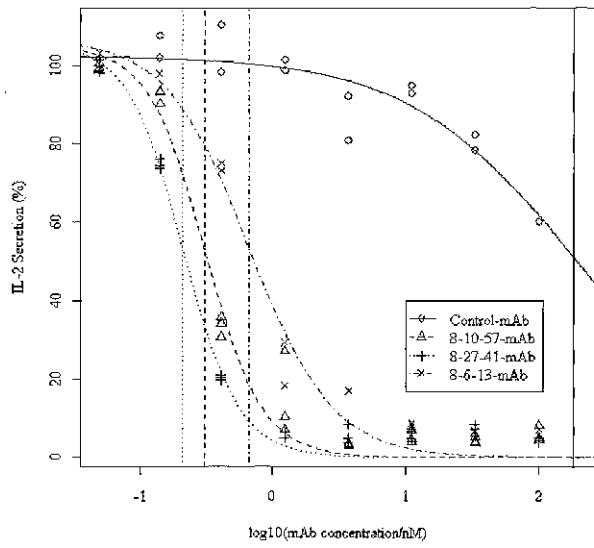


WO 01/87338

14/52

PCT/US01/15626

Figure 9a

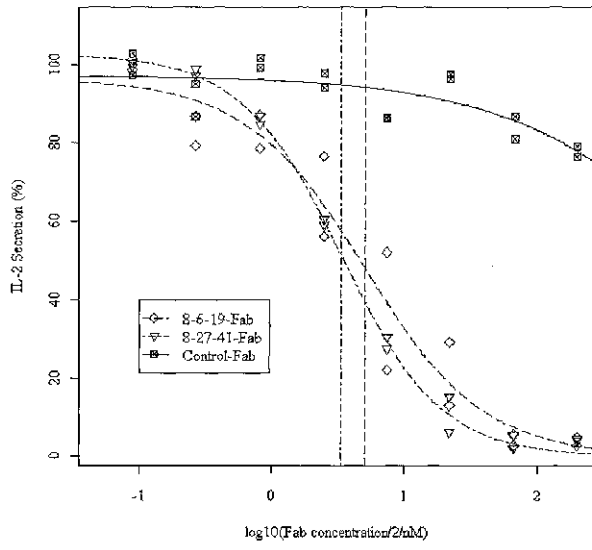


WO 01/87338

15/52

PCT/US01/15626

Figure 9b

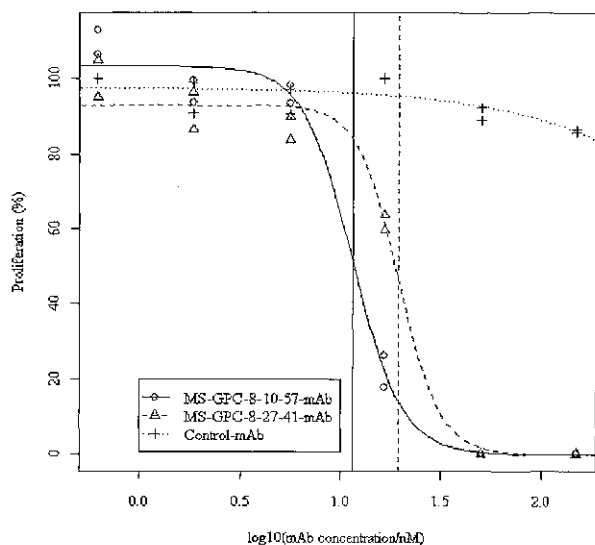


WO 01/87338

16/52

PCT/US01/15626

Figure 10



WO 01/87338

18/52

PCT/US01/15626

Figure 11 (cont)

XbaISphI

 1 AGAGCATGCG TAGGAGAAAA TAAAATGAAA CAAAGCACTA TTGCACATGGC
 TCTCGTACGC ATCCTCTTTT ATTTTACTTT GTTTCGTGAT AACGTGACCG

51 ACTCTTACCG TTGCTCTTCA CCGCTGTTAC CAAAGCCGAC TACAAAGATG
 TGAGAAATGCG AACGAGAAGT GGGGACAATG GTTTCGGCTG ATGTTTCTAC

MfeI

 101 AAGTGCATTT GGTTCAGTCT GCGCGGGAAG TGA AAAAAC C GGCAGCAGC
 TTCACGTTAA CCAAGTCAGA CCGCGCCTTC ACTTTTTTGG CCGCTGCTCG

BspEI

 151 GTGAAATGTA GCTGCAAAAGC CTCGGGAGGC ACTTTTAGCA GCTATGCGAT
 CACTTTCAC T CGACGTTTCG GAGGCTCTCC TGAAAATCGT CGATACGCTA

XhoI

 AvaI

 201 TAGCTGGGTG CGCCAAAGCC CTGGGCAGGG TCTCGAGTGG ATGGGCGGCA
 ATCGACCCAC GCGGTTCGGG GACCCGTCCC AGAGCTCACC TACCCGCGGT

BstEII

 251 TTATTCCGAT TTTTGGCAGG GCGAACTACG CCGCAGAAGTT TCAGGGCCCGG
 AATAAGGCTA AAAACCGTGC CGCTTGATGC GCGTCTTCAA AGTCCCGGCC

BstEII

 301 GTGACCATTA CCGCGGATGA AAGCACCAGC ACCCGGTATA TGGAACTGAG
 CACTGGTAAT GCGCCCTACT TTCGTGGTCC TGGCGCATAT ACCTTGACTC

EagI BssHII

 351 CAGCCTGCGT AGCGAAGATA CGGCCGTGTA TTATFGCGCG GGTATTATG
 GTCGGACGCA TCGCTTCTAT GCGGCAAT AATAACCGCG GCARTAATAC

StyI

 401 ATCGTAATGTA TAATATGGAT TATTGGGGCC AAGGCACCCT GGTGACGGTT
 TAGCATACAT ATTATACCTA ATAACCCCGG TTCGTGGGA CCACTGCCAA

BlpI

 ClaII

 451 AGCTCAGCGG GTGGCGGTTG TGGCGGCGGT GCGAGCGGTG GCGGTGGTTC
 TCGAGTCGCC CACCGCCAG ACCGCGGCCA CCTCGCCAC GCGCACCAAG

EcoRV

 501 TGGCGGTGGT GGTTCGATA TCGAACTGAC CCGCCCGCCT TCACTGAGCG

WO 01/87338

PC/US01/15626

19/52

ACCGCCACCA CCAAGGCTAT AGCTTGACTG GGTGGGCGGA AGTCACTCGC

SexAI

551 TTGCACCAGG TCAGACCCCG CGTATCTCGT GTAGCCGCGA TGGCTGGGC
AACGTGGTCC AGTCTGGGCG GCATAGAGCA CATGCGCGCT ACGGACCCCG

XmaI

KpnI

SmaI

Acc65I

AvaI

601 GATAAATACG CGAGCTGGTA CCAGCGAAA CCGGGGCGG CGCCAGTTCT
CTATTATGCG GCTCGACCAT GGTGCTCTTT GGGCCCGTCC GCGTCAAGA

Bsu36I

651 GGTGATTTAT GATGATTCG ACCGTCCTC AGGCATCCCG GAACGCTTGA
CCACTAAATA CTACTAAGAC TGGCAGGGAG TCCGTAGGGC CTTGCGAAAT

BamHI

701 GCGGATCCAA CAGCGGCSAC ACCGCGACC TGACCATAG CGGCACTCAG
CGCCTAGGTT GTGCGCGTGG TGGGCGTGGG ACTGGTAATC GCGGTGAGTC

EpuAI

BbsI

751 GCGGAGACCG AAGCGATTA TTATTGCCAG AGCTATGACG CTCATATGCG
CGCCTTCTGC TTGCGCTAAT AATAACGGTC TCGATACTGC GAGTATACGC

HpaI

MscI

EcoRI

801 TCCTGTGTTT GCGGCGGCA CGAAGTTAAC CGTTCTTGGC CAGGAATTCG
AGGACACAAA CCGCGCCCGT GCTTCAATTG GCAAGAACC GTCCTTAAGC

851 AGCAGAAGCT GATCTCTGAG GAGGATCTGA ACTAGGCTGG TGGCTCTGGT
TCGTCTTCGA CTAGAGACTC CTCCTAGACT TGATCCCAAC ACCGAGACCA

901 TCCGGTGATT TTGATTATGA AAAGATGGCA AACGCTAATA AGGGGGCTAT
AGGCCACTAA AACTAATACT TTCTACCGT TTGGGATTAT TCCCCGATA
gIIIseq9 100.0%

951 GACCGAAAAT GCCGATGAAA ACGCGCTACA GTCTGACGCT AAAGGCAAAC
CTGGCTTTTA GGGTACTTTT TCGCGGATGT CAGACTGCGA TTTCCGTTTG

Clai

1001 TTGATTCGTG CGCTACTGAT TACCGTCTG CTATCGATGG TTTCATGGT
AACTAAGACA GCGATGACTA ATGCCACGAC GATAGCTACC AAAGTAACCA

1051 GACGTTCCG GCCTTGCTAA TGGTAAATGGT GCTACTGGTG ATTTGCTGG
CTGCAAGGC CGGAACGATT ACCATTACCA CGATGACCAC TAAACGACC

WO 01/87338

20/52

PCT/US01/15626

```

1101 CTCTAAATTC CAAATGGGTC AAGTCGGTGA CGGTGATAAT TCACCTTTAA
    GAGATTAAGG GTTTACCGAG TTCAGCCACT GCCACTATTA AGTGGAAATP
1151 TGAATAATTT CCGTCAATAT TTACCTTCCC TCCCICAATC GGTGAAATGT
    ACTTATTAATA GGCAGTATA AATGGAAAGG AGGGAGTTAG CCAACTTACA
1201 CGCCCTTTTG TCTTNGGCGC TGGTAAACCA TATGAATTTT CTATTGATIG
    CGCGGAAAC AGAAACCGCG ACCATTGCGT ATACTTAATA GATAACTAAC
1251 TGACAAATAA AACTTATTCG GTGGTGTCTT TCGGTTCCTT TTATATGTFG
    ACTGTTTTTAT TTGAATAAGG CACCACAGAA ACGCAAAGAA AATATACAAC
1301 CCACCTTTAT GTATGTATT TCTACGTTG CTAACATACT GCGTAATAAG
    GGTGGAAATA CATACATAAA AGATGCAAAC GATTGTATGA CGCATTATTC

    HindIII
    ~~~~~
1351 GAGTCTTGAT AAGCTTGACC TGTGAAGTGA AAAATGGCCG AGATTGTGCG
    CTCAGAACTA TTGGAAGTGG ACACCTCACT TTTTACCGCG TCTAACACGC
    OGLI13 100.0%
    =====
1401 ACATTTTTTT TGCTGCGCGT TTAATGAAAT TGTAACCGTT AATATTTTGT
    TGTAATAAAA ACAGACGGCA AATTACTTTA ACATTGCGAA TTATAAACA
1451 TAAAAATTCG GETAAATTTT TGTAAATCA GCTCATTTT TAACCAATAG
    ATTTTAAAGC CAATTTAATA ACATTTAGT CGACTAATAA ATTGGTTATC
1501 GCGGAAATCG GCAAAATCC TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG
    CGGCTTTAGC CGTTTTAGG AATAFTTAGT TTTCTTATCT GGCTCTATCC
1551 GTTGAGTGTG GTTCCAGTTT GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG
    CAACTCACAA CAAGGTCAAA CCTTGTCTC AGGTGATAAT TTCTTGCAAC
1601 ACTCCAAAGT CAAAGGCGGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA TGGCCCACTA
    TGAGGTTGCA GTTCCCGCT TTTTGGCAGA TAGTCCCGCT ACCGGGTGAT
1651 CGAGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTG GGGTCGAGST GCCGTAAAGC
    GCTCTTGGTA GTGGATTAG TTCAAAAAC CCCAGCTCCA CGGCAATTCG
1701 ACTAAATCGG AACCTAAAG GGAGCCCGCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA
    TGATTTAGCC TTGGGATTC CCTCGGGGC TAAATCTCGA ACTGCCCTT
1751 AGCCCGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC
    TCGGCGGCTT GCACCGCTCT TTCTTCCCT TCTTTGCTT TCCTCGCCCG
1801 GCTAGGGCGC TGSCAAGTGT AGCGGTCAAG CTGCGCGTAA CCACCACACC
    CGATCCCGCG ACGGTTCAAA TCGCCAGTGC GACCGCGATT GGTGGTGTGG
1851 CGCCGCGCTT AATGGCCGCG TACAGGGCGC GTCCTAGCCA TGTGAGCAA
    CGCGCGCGAA TTACGCGCGG ATGTCCCGCG CACGATCGGT ACACFGTPTT
1901 AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCOCGCTG CTGGGTTTTT
    TCCGCTCGTT TTCCGGTCTT TGGCATTTTT CCGGCGCAAC GACCGCAAAA
1951 TCCATAGGCT CCGCCCTCTT GACGAGCATC ACRAAATCG ACGCTCAAGT
    AGGTATCCGA GCGCGGGGA CTGCTCGTAG TGTTTTTAGC TGCGAGTCA

```

WO 01/87338

21/52

PCT/US01/15626

2001 CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCC
 GTCCTCACCG CTTTGGGCTG TCCTGATATT TCCTATGCTC GCAAAGGGGG

2051 TGGAAAGCTCC CTCGTGGCT CTCCCTGTCC GACCCCTCCG CTTACCGGAT
 ACCTTCGAGG GAGCACGCGA GAGGACAAGG CTGGGACGGC GAATGGCCCTA

2101 ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGGCTTTC TCATAGCTCA
 TGGACAGGCG GAAAGAGGGA AGCCCTTCGC ACCGCGAAAG AGTATCGAGT

2151 GCCTGTAGGT ATCTGAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG
 GCGACATCCA TAGAGTCAAG CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCCGAC

ApaLI
 ~~~~~

2201 TGTGCACGAA CCCCCGTC AGTCCGACCG CTGGCCCTTA TCCGTAACT  
 ACACGTGCTT GGGGGCAAG TCAGGCTGGC GACCGGAAAT AGCCATTGA

2251 ATCTCTTTGA GTCCAAACCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA  
 TAGCAGAACT CAGGTGGGC CRTTCTGTGC TGATAGCCGG TGACCCGCTG

2301 GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGGG GTGCTACAGA  
 CGGTGACCAT TGTCCTAATC GTCTCGCTCC ATACATCCGC CAGCATGTCT

2351 GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA ACAGTATTTG  
 CAAGAACTTC ACCACCGGAT TGATGCCGAT GTGATCTTCT TGTATAAAC

2401 GTATCTGGCC TCTGCTGTAG CCAGTTACCT TCGGAAAAG AGTGTGTAGC  
 CATAGACCGG AGAGCACATC GGTCAATGGA AGCCTTTTTC TCAACCATGG

2451 TCTTGATCCG GCAAACAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTGTTTG  
 AGAACTAGGC CGTTTGTTTG GTGGGACCA TCGCCACCAA AAAACAAC

2501 CAAGCAGCAG ATTACCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA  
 GTTCTGTCTC TAATGCGGCT CTTTTTTTCC TAGAGTCTT CTAGGAAACT

2551 TCTTTCTAC GGGTCTGAC GCTCAGTGA ACGAAAACCT ACGTAAAGGG  
 AGAAAAGATG CCCCAGACTG CGAGTCACTT TGCTTTGAG TGCAATTCCT

2601 ATTTTGGTCA GATCTAGCAC CAGGCGTTTA AGGGCACCAA TAATGCTCTT  
 TAAAACCAAT CTAGATCGTG GTCCGCAAT TCCCTGGTIT ATGACGSA

2651 AAAAABATTA CCCCCGCC TGCCACTCAT GCGACTACTG TTGTAATTC  
 TTTTTTAAT GCGGGCGGG ACGGTGAGTA GCGTCATGAC AACATTAAGT

2701 TTAAGCATTC TGCCGACATG GAAGCCATCA CAAACGGCAT GATGAACCTG  
 AATTCGTAG ACGGCTGTAC CTTCCGTAGT GTTTGCCGTA CTACTTGGAC

2751 AATCGCCAGC GGCATCAGCA CCTTGTCCGC TTCCCTATAA TATTTGCCCA  
 TTAGCGGTCC CCGTAGTCTG GAACACGCG AACCCTATT ATAAACGGGT

2801 TAGTGAABAC GGGGGCGAAG AAGTGTCCA TATGGCTAC GTTAAATCA  
 ATCACTTTTG CCCCCGCTTC TTCAACAGGT ATAACCGATG CAAATTTAGT

2851 AAATGCTGA AACTCACCCA GGGATTGGCT GAGACGAAA ACATATTCTC  
 TTTGACCACT TTGAGTGGGT CCCTAACCGA CTCTGCTTTT TGTATAAGAG

WO 01/87338

22/52

PCT/US01/15626

```

2901 AATAAACCCCT TTAGGGAAAT AGGCCAGGTT TTCACCGTAA CACGCCACAT
TTATTTGGGA AATCCCTTTA TCCGSTCCAA AAGTGGCATT GTGCGGTGTA

2951 CTTGCCAATA TATGTGTAGA AACTGCCGGA AATCGTCGTG GTATTCACTC
GAACGCTTAT ATACACATCT TTGACGGCCT TTAGCAGCAC CATAAGTGAG

3001 CAGAGCGATG AAAACGTTTC AGTTTGCTCA TGGAAAACGG TGTAAACAAGG
GTCTCGCTAC TTTTGCAAG TCAACCGAGT ACCTTTTGCC ACMTTGTTC

3051 GTGAACACTA TCCCATATCA CCAGCTCACC GTCTTTCATT GCCATACGGA
CACTTGTGAT AGGGTATAGT GGTGAGTGG CAGAAAGTAA CCGTATGCCT

3101 ACTCCGGGTG AGCATTCAATC AGGCCGGCAA GAATGTGAAT AAAGGCCGGA
TGAGGCCAC TCGTAAGTAG TCCGCCGTT CTACACTTA TTTCCGGCCT

3151 TAAAACCTGT GCTTATTTTT CTTACGGTC TTTAAAAGG CCGTAATAIC
ATTTTGAACA CGAATAAAAA GAAATGCCAG AAATTTTCC GGCATTATAG

3201 CAGCTGAACG GTCTGTTAT AGGTACATG AGCAACTGAC TGAATGCCT
GTGCACTGC CAGACCAATA TCCATGTAAC TCGTTGACTG ACTTTACGGA

3251 CAAAATGTTT TTTACGATG CATTGGGATA TATCAACGGT GGTATATCCA
GTTTACAAG AATGCTACG GTAACCCAT ATAGTTGCCA CCRATAGGT

3301 GTGATTTTTT TCTCCATTTT AGCTTCCTTA GCTCCTGAAA ATCTCGATAA
CACTAAAAAA ASAGSTAAA TCGAAGGAAT CAGGACTTT TAGAGCTATT

3351 CTCAAAAAAT ACGCCCGGTA GTGATCTTAT TTCATTATGG TGAAGTTGG
GAGTTTTTTA TCGGGCCAT CACTAGAATA AAGTAATACC ACTTTCACCC

3401 AACCTCACCC GACGTCTAAT GTGAGTTAGC TCACCTCATTA GGCACCCCG
TTGGAGTGG CTGCAGATTA CACTCAATCG AGTGAATAT CCGTGGGGTC

3451 GCTTACACT TTATGCTTCC GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG
CGAAATGTGA AATACGAAGG CCGAGCATAC AACACACCTT AACACTCGCC

M13 Reverse primer 100.0% XbaI
=====
3501 ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GAATTTCT
TATGTATAAA GTGTGTCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CTTAAGA

```



WO 01/87338

24/52

PCT/US01/15626

**Figure 12 (cont)**

KbaI SphI  
 -----  
 1 TCTAGGCAT GCGTAGGAGA AAATAAATG AAACAAGCA CTATTGCACCT  
 AGATCTCGTA CGCATCCTCT TTTATTTTAC TTTGTTTCGT GATAACGTGA  
  
 51 GGCACCTTA CGTTGCTCT TCACCCCTGT TACCAAGCC GACTACAAAG  
 CCGTAGAAT GCCAACGAGA AGTGGGACA ATGGTTTCGG CTGATGTTTC  
  
 MfeI  
 -----  
 101 ATGAAGTCCA ATTGGTGGAA AGCCGCGCGC GCGTGGTGCA ACCGGGCGGC  
 TACTTCACCT TAACCACCTT TCGCCGCGC CGGACCACGT TGGCCGCGC  
  
 BspEI  
 -----  
 151 AGCCTGCGTC TGAGCTGCGC GGCCPCGGGA TTTACCTTA GCAGCTATGC  
 TCGGACGCAG ACTCGACCGC CCGGAGGCTT AAATGGAAAT CGTCGATACG  
  
 XhoI  
 -----  
 AvaI  
 -----  
 201 GATGAGCTGG GTGCGCCAAG CCCCTGGGA GSGTCTCGAG TGGGTGAGCG  
 CTACTCGACC CACGCGGTTT GGGGACCTT CCGAGAGCTC ACCCACTGCG  
  
 251 CGATTAGCGG TAGCGGCGGC AGCACCTATT ATGCGGATAG CGTGAAAGGC  
 GCTAATCGCC ATCGCCGCGC TCGTGGATA TACGCCTATC GCACTTTCGG  
  
 EstBI  
 -----  
 SfuI  
 -----  
 NspV  
 -----  
 301 CGTTTTACCA TTTCACGTGA TAATTCGAAA AACACCTGT ATCTGCAAAT  
 GCAAAATGTT AAAGTGCACCT ATTAAAGCTTT TTGTGGGACA TAGACGTTTA  
  
 EagI BssHII  
 -----  
 351 GAACAGCCTG CGTGGGAAAG ATACGGCCGT GTATTATTGC GCGCGTGTTA  
 CTTTGGGAC GCACGCCTTC TATGCGGCA CATAATAACG CGGCACAAT  
  
 StyI  
 -----  
 401 AGAAGCATTT TTCTCGTAAG AATTGGTTT ATTATTGGG CCAAGGCACC  
 TCTTCGTAAA AAGAGCATTC TTAACCAAC TAATAACCC GGTTCGTTGG

WO 01/87338

25/52

PCT/US01/15626

```

          BlnI
          -----
          ClaI
          -----
451  CTGGTGACCG TTAGCTCAGC GGGTGGCGGT TCTGGCGCGG GTGGGAGCGG
    GACCACATGCC AATCGAGTCC CCCACCGCCA AGACCGCCCG CACCCCTGGCC

          EcoRV
          -----
501  TGGCGCTGCT TCTGGCGGTG GTGGTTCGGA TATCGTGATG ACCCGAGAGC
    ACCGCCACCA AGACCGCCAC CACCAAGGCT ATAGCACTAC TGGGTCTCGG

          PstI
          -----
551  CACTGAGCCT GCCAATGACT CCGGGCGAGC CTGCGAGCAT TAGCTGCAGA
    GTGACTCGGA CGTCACTGA GGCCTGCTCG GACGCTCGTA ATCGACGTCT

          KpnI
          -----
          Acc65I
          -----
601  AGCAGCCAAA GCCTGTGCA TGCACAACGC TATAACTATC TGGATTGGTA
    TGTGCGGTTT CGGACGAGCT ATCGTTGCCG ATATTGATAG ACCTAACCAT

          KpnI
          -----
          Acc65I      SexAI
          -----
651  CCTTCAAAAA CCAGTCAAAA GCGCGAGCT ATTAATTTAT CTGGGCAGCA
    GGAAGTTTTT GGTCCAGTTT CCGGCGTCGA TAATTAAATA GACCCGTGCT

          BamHI
          -----
701  ACCGTGCCAG TGGGTCCCG GATCGTTTTA GCGGCTCTGG ATCCGGCACC
    TGGCACGGTC ACCCCAGGCG CTAGCAAAAT CCGCGAGACC TAGCCCGTGG

          BpuAI
          -----
          BbsI
          -----
751  GATTTTACCC TGAAAATTAG CCTGTGGA GCTGAAGACC TGGGCGTCTA
    CTAATAATGG ACTTTTAATC GGCACACCTT CGACTTCTGC ACCCGCACAT

          MscI
          -----
801  TTATTGCCAG CAGCAATTATA CCACCCCGCC GACCTTTGGC CAGGTTACGA
    AATAACGGTC GTCGTAATAT GGTGGGGCGG CTGGAAACCG GTCCCATGCT

```

WO 01/87338

26/52

PC1/US01/15626

```

          BsiWI  EcoRI
          -----
851  AAGTTGAAAT  TAAACGTACG  GAATTCGACT  ATAAAGATGA  CGATGACAAA
      TTCAACTTTA  ATTGCAATGC  CTTAAGCTGA  TATTCTACT  GCTACTGTTT

      BssHII                      HindIII
      -----
901  GGCGCGCGGT  GGAGCCACCC  GCAGTTGAA  AAATGATAAG  CTGACCTGT
      CCGCGCGGCA  CCTCGGTGGG  CGTCARACT  TTTACTATTC  GAACTGGACA
                                  OGIII3 100.0%
                                  =====

951  GAAGTGAAAA  ATGGCGCAGA  TTGTGCGACA  TTTTTTTTGT  CTGCCGTTTA
      CTTCACTTTT  TACCGGTGCT  AACACGCTGT  AAAAAAAAAA  GACGGCAAAT
      OGIII3 100.0%
      =====

1001  ATTAAAGGGG  GGGGGGGGCC  GGCCTGGGGG  GGGGTGTACA  TGAATTGTA
      TAATTTCCCC  CCCCCCCCGG  CCGGACCCCC  CCCCACATGT  ACTTTAACAT

1051  AACGTTAATA  TTTTGTAAA  ATTGCGGTTA  AATTTTGTGT  AAATCAGCTC
      TTGCATTTAT  AAACAATTT  TAGCGCAAT  TAAAAACAA  TTTAGTCGAG

1101  ATTTTAAAC  CAATAGCCCG  AAATCGCAA  AATCCCTTAT  AAATCAAAG
      TAAAAAATG  GTTATCCGC  TTTAGCGTT  TTAGGGAATA  TTTAGTTTC

1151  AATAGACCGA  GATAGGTTG  AGTGTGTTT  CAGTTTGAA  CAGAGTCCA
      TTATCTGGCT  CTATCCCAAC  TCACAACAAG  GTCAAACTT  GTTCTCAGGT

1201  CTATTAAGA  ACGTGGACTC  CAACGTCAA  GGGCGAAAAA  CCGTCTATCA
      GATAATTTCT  TGCACCTGAG  GTTGCACTT  CCGCTTTTT  GGCAGATAGT

1251  GGGCGATGGC  CCACTACGAG  AACCATCACC  CTAATCAAGT  TTTTGGGGT
      CCGCTACCG  GGTGATGCTC  TTGTTAGTGG  GATTAGTTCA  AAAAACCCCA

1301  CGAGGTGCCG  TAAAGCACTA  AATCGGAACC  CTAAGGGAG  CCCCCGATT
      GCTCCACGGC  ATTTCTGTAT  TTAGCCTTGG  GATTTCCCTC  GGGGGCTAAA

1351  AGAGCTTGAC  GGGGAAAGCC  GCGAACGTC  CCGAGAAAGG  AAGGGAGAA
      TCTCSAACTG  CCGCTTTCGG  CCGCTTGCA  CGCTCTTTC  TTCCTTCTT

1401  AGCGAAAGGA  GCGGGCGCTA  GCGCGTSGC  AAGTGTAGCG  GTCACGCTGC
      TCGCTTTCT  CGCCCGCGAT  CCGCGACCG  TTCACATCGC  CAGTGGGACG

1451  GCGTAACCAC  CACACCGGCC  GCGCTTAATG  CGCCGCTACA  GGGCGCGTGC
      CGCATGGTG  GTGTGGGCG  CGCAATTAC  GCGCGGATGT  CCGCGCACG

```

WO 01/87338

27/52

PCT/US01/15626

1501 TAGACTAGTG TTTAAACCGG ACCGGGGGGG GGCTTAAGTG GGCTGC AAAA  
 ATCTGATCAC AAATTTGGCC TGGCCCCCCC CCGAATTCAC CCGACGTTTT

1551 CAAAACGGCC TCCGTG CAGG AAGCCGCTTT TATCGGGTAG CCTCACTGCC  
 GTTTTGCCGG AGGACAGTCC TTCGGCGAAA ATAGCCCATC GGAGTGAOGG

1601 CGCTTTCAG TCGGGAACC TGTCTGCCA GCTGCATCAG TGRATCGGGC  
 GCGAAAGGTC AGCCCTTTGG ACAGCACGGT CGACGTAGTC ACTTAGCCGG

1651 AACCGCGGG GAGAGCGGT TTGCGTATG GGAGCCAGGG TGGTTTTTCT  
 TTGGCGCCC CTCCTCGCCA AACGCATAAC CCTCGGTCCC ACCAAAAGA

1701 TTTCAACAGT GAGACGGCA ACAGCTGATT GCCCTTCACC GCCTGGCCCT  
 AAAGTGTCA CTCCTGCCGT TGTGACTAA CCGGAAGTGG CCGACCGGGA

1751 GAGAGATTTG CAGCAAGCGG TCCACGCTGG TTTGCCCCAG CAGCCGAAAA  
 CTCCTCAAC CTCCTCGCC AGGTGCGACC AAACCGGGTC GTCCGCTTTT

1801 TCCGTGTTGA TGGTGGT CAG CCGCGGGATA TAACATGAGC TGTCTCGGT  
 AGGACAAACT ACCACCACTC GCGGCCCTAT ATGTACTCG ACAGGAGCCA

1851 ATCTCTGAT CCCACTACCG AGATGTCGCG ACCAACCGCG AGCCCGGACT  
 GCGACACATA GGGTGTGCG TCTACAGGCG TGGTTGCGCG TCGGGCTGTA

1901 CGGTAATGGC ACGCATGCG CCGAGCGCA TCTGATCGTT GGCACCGAGC  
 GCCATTACCG TGGTAAACGC GGGTGGCGGT AGACTAGCAA CCGTTGGTGG

1951 ATCGCAGTGG GAACGATGCC CTCATTGAGC ATTTGCATGG TTGTTGAAA  
 TAGCGTACC CTGCTACCG GAGTAAGTGG TAAACGTACC AAACAACCTT

2001 ACCGGACATG CCACTCCAGT CGCCTTCCCG TTCGGCTATC GGCTGAATTT  
 TGGCCTGTAC CGTGAGGTCA CCGGAAGGGC AAGGCGATAG CCGACTTAAA

2051 GATTCGGAGT GAGATATTTA TCCAGCCAG CCAGACCGAG ACCGCGCGAG  
 CTAACGCTCA CTCATAAAT ACGGTCCGTC GGTCTGCGTC TCGCGGGCTC

2101 ACAGAACTTA ATGGGCCAGC TAACAGCGCG ATTTGCTGGT GGCCTAATGC  
 TGTCTTGAAT TACCGGTCG ATGTGCGGCG TAAACGACCA CCGGTTACG

2151 GACCAGATGC TCCACGCCC GTGCGGTACC GTCCCTCATGG GAGAAAATAA  
 CTGCTCTACG AGGTGCGGGT CAGCGCATGG CAGGATACC CTCCTTTATT

2201 TACTGTTGAT GGGTGTCTGG TCAGAGACAT CAAGAAATAA CCGCGGAACA  
 ATGACAACTA CCCACAGACC AGTCTCTGTA GTCTTTATT CCGCCCTTGT

2251 TTAGTGCAGG CAGCTTCCAC AGCAATAGCA TCCTGGTCAI CAGCGGATA  
 AATCACGTCC GTCGAAGGTG TCGTTATCGT AGGACCASTA GGTCCCTAT

ApaLI  
 ~~~~~

2301 GTTAATAATC AGCCCACTGA CACGTTGCGC GAGAAGATTG TGCAACGCGC
 CAATTATTAG TCGGGTGAAT GTGCAACGCG CTCCTCAAC ACGTGGCGGC

2351 CTTTACAGGC TTCAGCGCG CTCGTTCTA CCATCGACAG GACCACGCTG
 GAAATGTCGG AAGCTGCGGC GAAGCAGAT GGTAGCTGTG CTGTTGCGAC

WO 01/87338

28/52

PCT/US01/15626

2401 GCACCCAGTT GATCGGCGCG AGATTTAATC GCCCGGACAA TTTGCGACGG
 CGTGGGTCAA CTAGCCCGGC TCTAATATAG CCGCGCTGTT AAACGCTGCC
 2451 GCGGTGCAGG GCCAGACTGG AGGTGGCAAC GCCAATCAGC AACGACTGTT
 GCGCACGTCC CGTCTGACC TCCACCGTTG CCGTTAGTCG TTGCTGACAA
 2501 TGCCGGCCAG TTGTTTGGC ACGCGGTTAG GAATGTAATT CAGTCCGCC
 ACGGGCGGTC ARCAACACGG TCGCCCAATC CTTACATTA A GTCAGGCGG
 2551 ATCGCCGCTT CCACTTTTTT CCGCGTTTTT CGGAAAGCT GCGTGGCCTG
 TAGCGGCGAA GGTGAAAAAG GCGGCAAAAG CGTCTTTGCA CCGACCGGAC
 2601 GTTCACCACG CGGGAACCGG TCTGATAAGA GACACCGGCA TACTCTGGCA
 CAAGTGTGTC GCCCTTTGCC AGACTATTCT CTGTGGCCGT ATGAGACGCT
 2651 CATCGTATAA CGTTACTGGT TTCACATTC A CCACTTCAA TTGACTCTCT
 GTAGCATATT GCATAGACA AAGTGTAAAT GGTGGGACTT AACTGAGAGA
 2701 TCCGGGCGCT ATCATGCCAT ACCGGGAAG GTTTTGCGCC ATTGATGCT
 AGGCCCGCGA TAGTACGGTA TGGCGCTTTC CAAAACCGCG TAGCTACGA
 2751 AGCCATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGCC CAGGAACCGT AAAAGGCCG
 TCGGTACACT GGTTTTCCGG TCGTTTTCCG GTCCTTGGCA TTTTCCGGC
 2801 GTTTGTGGC GTTTTTCCAT AGCTCCGCC CCGCTGACGA GCATCACAAA
 GCACGACCG CAAAAGGTA TCCGAGGCGG GGGGACTGCT CGTAGTCTTT
 2851 AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA
 TTAGCTGCGA GTTCAGTCTC CACCGCTTTC GGCTGTCTCG ATATTTCTAT
 2901 CCAGGCGTTT CCCCCGGA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC
 GGTCCGCAA GGGGACCTT CGAGGGAGCA CCGGAGAGGA CAAGGCTGGG
 2951 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCTTTC TCCCTCGGG AAGCGTGGCG
 ACGGCGAATG GCCTATGGAC AGGCGGAAAG AGGGAAAGCC TTCGCACCGC
 3001 CTTTCTCATA GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCSTTCG
 GAAAGATAT CGAGTGGAC ATCCATAGAG TCAAGCCACA TCCAGCAAGC

 ApaLI

 3051 CTCCAAGCTG GCGTGTGTGC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG
 GAGTTGAC CCGACACAGG TGCTTGGGGG GCAAGTCGGG CTGGCGAGCG
 3101 CCTTATCCGG TAACATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACAAGACTTA
 GGAATAGGCC ATTGATAGCA GAACTCAGGT TGGGCCATTC TGTGCTGAAT
 3151 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT
 AGCGGTGACC GTCGTGGTG ACCATTGTCC TAATCGTCTC GCTCCATACA
 3201 AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA
 TCCGCCACGA TGTCTCAAGA ACTTCACCAC CGGATGATG CCGATGTGAT
 3251 GAAGAACAGT ATTTGGTATC TCGCTCTGC TGTAGCCAGT TACCTTCGGA
 CTTCTGTCA TAAACATAG ACGCGAGCG ACATCGGTCA ATGGAAGCCT

WO 01/87338

29/52

PCT/US01/15626

3301 AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG
 TTTCTCAAC CAGCGAGAAC TAGGCCGTTT GTTTGGTGGC GACCATCGCC

3351 TGGTTTTTTT GTTTCGAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC
 ACCAAAAAAA CAAACGTTCC TCGTCTAATG CCGCTCTTTT TTTCTTAGAG

3401 AAGAAGATCC TTTGATCITT TCTACGGGCT CTGACGGCTA GTGGAACGAA
 TTCTTCTAGG AACTAGAAA AGATGCCCCA GACTGCGAGT GACCTTGCTT

3451 AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTGAGATCT AGCACCAGGC GTTTAAGGGC
 TTGAGTGCAA TTCCCTAAA CCAGTCTAGA TCGTGGTCCG CAAATTCCCG

3501 ACCAATAACT GCCTAAAAA AATTACGCCC CGCCCTGCCA CTCATCGCAG
 TGGTTATTGA CGGAATTTT TTAATGCGGG GCGGGACGGT GAGTAGCGTC

3551 TACTGTGTGA ATTCATTAAG CATTCTGCCG ACATGGAAGC CACACAACAC
 ATGACAACAT TAAGTAATTC GTAGACCGGC TGTACCTTCG GTAGTGTTCG

3601 GGCATGATGA ACCTGAATCG CCAGCGGCAT CAGCACCTTG TCGCCTTCCG
 CCGTACTACT TGGACTTAGC GGTCCCGGTA GTCGTGAAC AGCGGAACGC

3651 TATAATATTG GCCCATAGTG AAAACGGGGG CGAAGAGTTT GTCCATATTG
 ATATTATAAA CGGGTATCAC TTTGCCCCC GCTTCTTCAA CAGGTATAC

3701 GCTACGTTTA AATCAAACT GGTGAACTC ACCCAGGAT TGGCTGAGAC
 CGATGCAAA TTAGTTTTGA CCACTTTGG TGGTCCCTA ACCGACTCTG

3751 GAAAAACATA TTCTCATATA ACCCTTTAGS GAAATAGGCC AGGTTTTCAC
 CTTTTGTAT AAGAGTTATT TGGGAAATCC CTTTATCCGG TCCAAAAGTG

3801 CGTAACACGC CACATCTTCG GAATATATGT GTAGAAACTG CCGGAAATCG
 GCATTTGTCG GTGTAGAACG CTTATATACA CATCTTTGAC GGCCTTAGC

3851 TCGTGGTATT CACTCCAGAG CGATGAAAAC GTTTCAGTTT GCTCATGGAA
 AGCACCATAA GTGAGGTCTC GCTACTTTTG CAAAGTCAA CGAGTACCTT

3901 AACGGTGTAA CAAGGGTAAA CACTATCCCA TATCACCGAG TCACCCTCTT
 TTGCCACATT GTTCCCATT GTGATAGGGT ATAGTGGTCG AGTGGCAGAA

3951 TCAITGCCAT ACGGAATCC GGGTGGGCT TCATCAGGCG GSCAGAAATG
 AGTAACGGTA TGCCCTGAGG CCCACTCGTA AGTAGTCCGC CCGTTCTTAC

4001 TGAATAAAGG CCGGATAAAA CTTGTGCTTA TTTTCTTTA CCGTCTTTAA
 ACTTATTTCG GGCCTATTTT GAACCGAAT AAAAAGAAAT GCCAGAAATY

4051 AAAGCCCGTA ATATCCAGCT GAACGGTCTG GTTATAGGTA CATTGAGCAA
 TTTCCGGCAT TATAGTGA CTTGCCAGAC CAATATCCAT GTAACCTGTT

4101 CTGACTGAAA TGCCCAAAA TGTTCTTTAC GATGCCATTG GGATATATCA
 GACTGACTTT ACGGAGTTTT ACAAGAAATG CTACGGTAAC CCTATATAGT

4151 ACCGTGGTAT ATCCAGTAT TTTTTCCTCC ATTTTAGCIT CCTTAGCTCC
 TGCCACCATA TAGGTCACTA AAAAAAGAGG TAAAAACGAA GGAATCGAGG

4201 TGAAAATCTC GATAACTCAA AAAATACGCC CCGTAGTGAT CTTATTCAT
 ACTTTTAGAG CTATTGAGTT TTTTATGCCG GCCATCACTA GAATAAGTA

WO 01/87338

30/52

PCT/US01/15626

```
4251 TATGGTGAAA GTTGGAACCT CACCCGACGT CTAATGTGAG TTAGCTCRACT
    ATACCACCTTT CAACCTTGGG GTGGGCTGCA GATTACACTC AATCGAGTGA

4301 CATTAGGCAC CCCAGGCTTT ACACTTTATG CTCCGGCTC GTATGTTGTG
    GTAATCCGTG GGGTCCGAAA TGTGAAATAC GAAGGCCGAG CATACAACAC

    M13 Reverse primer 100.0%
    =====
4351 TGGAAATGTG AGCGGATAAC AATTTACAC AGGAACAGC TATGACCATG
    ACCTTAACAC TCGCCTATTG TTAAAGTGTG TCCTTTGTG ATACTGGTAC

4401 ATTTCGAATT
    TAATGCTTAA
```

WO 01/87338

32/52

PCT/US01/15626

Figure 13 (cont)

```

EcoRV                               SexAI
----                               -
1  ATCGTGCTGA CCCAGCCGCC TTCAGTGTAGT GCGCACCCAG GTCAGCGTGT
   TAGCACGACT GGGTCGGCGG AAGTCACTCA CCGCGTGGTC CAGTCGCACA

51  GACCATCTGG TGTAGCGGCA GCGGCAGCAA CATTTGGCAGC AACTATGTGA
    CTGCTAGAGC ACATCGCCGT CGTCTGTGTT GTAACCGTCT TTGATACACT

                               XmaI
                               -----
                               SmaI
                               -----
KpnI                               AvaI
-----                             -----
Acc65I
-----

101 GCTGGTACCA GCAGTTGCCG GGCACGGCGC CGAAACTGCT GATTTATGAT
    CGACCATGGT CGTCAACGGG CCTGCGCGCG GCTTTGACGA CTAATACTAA

                               Bsu36I
                               -----
                               BamHI
                               -----

151 AACCAACCAGC GTCCCTCAGG CGTGCCGAT  CGTTTTAGCG GATCCAAAG
    TTGTGGTTCG CAGGGAGTCC GCACGGCCTA GCAAAATCGC CTAGGTTTTC

                               EpuAI
                               -----
                               BbsI
                               -----

201 CCGCACCAGC GCGAGCCTTG CGATTACGGG CCGCAAAGC GAAGACGAAG
    GCGTGGTTCG CGCTCGAAC GCTAATGCC  GACGTTTCG CTTCTGCTTC

                               Bsu36I
                               -----

251 CGGATTATTA TTGCCAGAGC TATGACATGC CTCAGGCTGT GTTTGGCGGC
    GCCTAATAAT AACGGTCTCG ATACTGTACG GAGTCCGACA CAAACCGCCG

                               MscI
                               -----
                               DraIII
                               -----

301 GGCACGAAGT TTAACCGTTC TTGGCCAGCC GAAGCCGCA CCGAGTGTGA
    CCGTGCCTCA AATTGSCAAG AACCGGTCCG CTTTCGGCGT GGCTCACACT

351 CGCTGTTTCC GCGGAGCAGC GAAGAATTGC AGGCGAACAA AGCGACCTCG
    GCGACARAGG CCGCTCTGCG CTTCTAAGC TCCGCTTGT TCGCTGGGAC

401 GTGTGCCTGA TTAGCGACTT TTATCCGGGA GCCGTGACAG TGGCTGGAA
    CACACGGACT AATCGCTGAA AATAGGCCCT GGGCACTGTC ACCGGACCTT

451 GGCAGATAGC AGCCCCGTCA AGGCGGGAGT GGAGACCACC ACACCTCCA
    CCGTCTATCG TCGGGCCAGT TCCGCCCTCA CCTCTGGTGG TGTGGGAGGT

501 AACAAAGCAA CAACAAGTAC GCGGCCAGCA GCTATCTGAG CCTGACGCCT
    TTGTTTCGTT GTTGTTCATG CGCCGGTCTG CGATAGACTC GGACTGCGGA

551 GAGCAGTGGG AGTCCCACAG AAGCTACAGC TGCCAGTCA GCGATGAGGG
    CTCTCACCT TCAGGGTGTG TTCGATGTCT ACGGTCCAGT GCGTACTCCC

                               StuI
                               -----
                               SphI
                               -----

```

WO 01/87338

33/52

PC/US01/15626

```

601 GAGCACCGTG GAAAAACCG TTGCGCCGAC TGAGGCCTGA TAAGCATGCG
CTCGTGGCAC CTTTTTGGC AACGCGGCTG ACTCCGGACT ATTGTAACCG

```

```

651 TAGGAGAAA TAAATGAAA CAAAGCCTA TTGCATGGC ACTCTTACCG
ATCTCTTTT ATTTACTTT GTTCGTGAT AACGTGACCG TGAGAATGGC

```

MfeI

```

701 TTCTCTTCA CCCCTGTAC CAAAGCCAG GTCCAATGA AAGAAAGCG
AACGAGAATG GGGACAATG GTTCGGGTC CACGTAACT TTCTTCGCC

```

BspEI

```

751 CCCGCCCTG GTGAAACCGA CCAAACCCT GACCCGACC TGTACCTTTT
GGCCCGGGAC CACTTTGGCT GGGTTGGGA CTGGGACTGG ACATGGAAAA

```

BspEI

```

801 CCGGATTTAG CCTGTCCAGC TCTGGCGTG GCGTGGGCTG GATTCGCCAG
GGCTAAATC GGACAGGTGC AGACCGCAAC CGCACCCGAC CTAAGCGGTC

```

XhoI

AvaI

```

851 CCGCCTGGGA AAGCCCTCGA GTGGCTGGCT CTGATTGATT GGGATGATGA
GGCGGACCCCT TTGGGAGCT CACCGACCGA GACTAACTAA CCTTACTACT

```

```

901 TAAGTATTAT AGCACCAGCC TGAAAACGGG TCTGACCATT AGCAAAGATA
ATTCATAATA TCGTGGTCGG ACTTTGCGC AGACTGGTAA TCCTTCTTAT

```

BstBI

SfuI

NspV

```

951 CTTGAAAAA TCAGGTGGTG CTGACTATGA CCAACAIGGA CCCGCTGGAT
GAAGCTTTT AGTCCACCAC GACTGATACT GGTGTACCT GGGCCACCTA

```

BssHII

```

1001 ACGGCCACCT ATTATTGGC GCGTTCCTT CTTAICGTC GTGCTTTTGA
TGCCGTTGGA TAATAACCG CGCAAGAGGA GCAATAGCAC CACGAAAACT

```

EplI

StyI

CelII

```

1051 TTATTGGGGC CAAGGCACCC TGGTGACGGT TAGCTCAGCG TCGACCAAAG
AATAACCCCG GTTCCGTTGG ACCACTGCCA ATCGAGTCGC AGCTGTTTC

```

```

1101 GTCCAGCGT GTTCCGCTG GCTCCAGCA GCAAAAGCAC CAGCGGCGC
CAGTTCCGA CAAAGGCGAC CGAGGCTCST GGTTTCCSTG GTCGCCSCCG

```

```

1151 ACCGCTGCCC TGGGCTGCCT GGTAAAGAT TATTTCCCG AACCAGTCAC

```

WO 01/87338

PCT/US01/15626

34/52

```

TGCCGACGGG ACCCGACGGA CCAATTCTA ATAAAGGGCC TTGGTCAGTG
1201 CGTGAGCTGG AACAGCGGGG CGCTGACCAG CGCCGTGCAT ACCTTTCCGG
GCACCTCGACC TTGTGCGCCC GCGACTGGTC GCCGCACGTA TGGAAAGGCC
1251 CGGTGCTGCA AAGCAGCGGC CTGTATAGCC TGAGCAGCCT TGTGACCGTG
GCCACGACGT TTCCTCGCCG GACATATCGG ACTCGTCGCA ACACTGGCAC
1301 CCGAGCAGCA GCTTAGGCCAC TCAGACCTAT ATTTGCAACG TGAACCATAA
GGCTCGTCGT CGAATCCGGG AGTCTGGATA TAAACGTTGC ACTTGGTATT
                                         EcoRI
                                         -----
1351 ACCGAGCAAC ACCAAAGTGG ATAAAAAAGT GGAACCGAAA AGCGAATTGG
TGGCTCGTTG TGGTTACACC TATTTTTTCA CCTTGGCTTT TCGCTAAGC
                                         BseHII
                                         -----
1401 ACTATAAAGA TGACGATGAC AAAGGCGCGC CGTGGAGCCA CCCGCGTTTT
TGATATTTCT ACTGCTACTG TTTCGGCGCG GCACCTCGGT GGGCGTCAAA
HindIII
-----
1451 GAAAAATGAT AAGCTTGACC TGTGACTGA AAAATGCGCG AGATTGTCGG
CTTTTTACTA TTCGAAGTGG ACACCTCACT TTTTACCGCG TCTAACCGCG
OGIII3 100.0%
-----
1501 ACATTTTTTT TGTCTGCCGT TTAATTAAAG GGGGGGGGGG GCCGGCCTGG
TGTAATAAAA ACAGACGGCA AATTAATTTT CCCCCCCCCC CGCCGGGACC
1551 GGGGGGTGT ACATGAAATT GTAAACGTTA ATATTTTGTT AAAATTCGCG
CCCCCCCACA TGACTTTTAA CATTTGCAAT TATAAAACAA TTTTAAGCGC
1601 TTAAATTTTT GTTAAATCAG CTCATTTTTT AACCAATAGG CCGAAATCGG
AATTTAAAAA CAATTTAGTC GAGTAAAAAA TTGGTTATCC GGCCTTAGCC
1651 CAAAATCCCT TATAAATCAA AAGMATAGAC CGAGATAGGG TTGAGTGTG
GTTTAGGGA ATATTTAGTT TTCTTATCTG GCTCTATCCC AACTCACAA
1701 TTCCAGTTTG GAACAAGAGT CCACTATTAA AGAACGTTGA CTCCAACGTC
AAGGTCAAAAC CTGTCTCA GGTGATAATT TCTTGCACCT GAGGTTCAG
1751 AAAGGGCGAA AAACCGTCTA TCAGGGCGAT GGGCCACTAC GAGAACCATC
TTTCCCGCTT TTTGGCAGAT AGTCCCGCTA CCGGGTGATG CTCTGGTAG
1801 ACCCTAATCA AGTTTTTTGG GGTGAGGTTG CCGTAAAGCA CTAAATCGGA
TGGGATTAGT TCAAAAACC CCAGCTCCAC GGCATTTCTGT GATTTAGCCT
1851 ACCCTAAAGG GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT GACGGGGAAA GCCGGCGAAC
TGGGATTTCC CTCGGGGGCT AAATCTCGAA CTGCCCTTTT CGGCGCTTG
1901 GTGCCGAGAA AGGAAGGGA GAAAGCGAAA GGAGCGGCGG CTAGGGCGCT
CACCGCTCTT TCCTTCCCTT CTTTCGCTTT CCTCGCCCGC GATCCCGCGA
1951 GGCAGTGTAA GCGGTCAAGC TGGCGTAA CACCACAGC GCCCGCTTA
CCGTTACAT CGCCAGTGG ACGCGCATG GTGCTGTGG CGGCGGAAT

```

WO 01/87338

35/52

PCT/US01/15626

2001 ATGCGCCGCT ACAGGGCCCG TGCTAGACTA GTGTTTAAAC CGGACCCGGG
 TACGCGGGGA TGTCGCCGCG ACGATCTGAT CACAAATTTG GCCTGGCCCC

2051 GGGGGCTTAA GTGGGCTGCA AAACAACACG GCCTCCTGTC AGGAGCCGCG
 CCCCAGAAAT CACCCGACGT TTTGTTTTCG CGGAGGACAG TCCTTCGGCG

2101 TTTTATCGGG TAGCCTCACT GCCCGTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTC
 AAAATAGCCC ATCGGACTGA CGGCGAAAG GTCAGCCCTT TGGACAGCAC

2151 CCAGCTGCAT CAGTGAATCG GCCAACCGCG GGGGAGAGGC GGTTCGCTA
 GGTGACGTA GTCACTTAGC CGGTTCGCG CCCCTCTCCG CCAACGCGAT

2201 TTGGGAGCCA GGTGTGTTTT TCTTTTCACC AGTGAGACGG GCAACAGCTG
 AACCTTCGCT CCCACCAAAA AGAAAAGTGG TCACTCTGCC CGTTCGAC

2251 ATTGCCCTTC ACCGCCTGGC CCTGAGAGAG TTGCAGCAAG CGTCCACGC
 TAACGGGAAG TGGCGGACCG GGACTCTCTC AACGTCTGTC GCCAGTGGC

2301 TGTTTTGCC CAGCAGCGCA AAATCCGTGT TGATGGTGGT CAGCGCCGGG
 ACCAAACGGG GTCGTCCGCT TTTAGGACAA ACTACCACCA CTGCGCGCCC

2351 ATATAACATG AGGTGCTCTC GGTATCGTCG TATCCACTA CCGAGATGTC
 TATATTGTAC TCGACAGSAG CCGTAGCAGC ATAGGCTGAT GGCTCTACAG

2401 CGCACCAACG CGCAGCCCGC ACTCGGTAAT GGCACGCATT GCGCCAGCG
 GCGTGGTTC GCGTCGGGCC TGAGCCATTA CCGTGCCTAA CGCGGTGCG

2451 CCATCTGATC GTTGGCAACC AGCATCGCAG TGGGAACGAT GCCTCATTC
 GGTAGACTAG CAACCGTTGG TCGTAGCGTC ACCCTTGCTA CCGGAGTAAG

2501 AGCATTTGCA TGGTTGTTG AAAACCGGAC ATGGCACTCC AGTCGCCTTC
 TCGTAAACGT ACCAAACAAC TTTTGGCCTG TACCGTGAGG TCAGCGGAAG

2551 CCGTTCGCT ATCGGCTGAA TTTGATGCG AGTGAGATAT TTAGCCAGC
 GGCAAGGCGA TAGCCGACTT AAACCTAACG TCACTCTATA AATACGTCG

2601 CAGCCAGACG CAGACGCGCC GAGACAGAAC TTAATGGGCC AGCTAACAGC
 GTCGGTCTGC GTCTGCGGCG CTCGTCTTCG AATTACCCGG TCGATTGTCG

2651 GCGATTTGCT GGTGGCCCAA TCGGACCAGA TGCTCCAGCG CCGTGGCGT
 CGCTAAACGA CCACCGGTT ACGGTGGTCT ACGAGGTGCG GGTACGCGCA

2701 ACCGTCTTCA TGGGAGAAAA TAATACTGTT GATGGGTGTC TGTGAGAGA
 TGGCAGGAGT ACCCTCTTTT ATTATGACAA CTACCCACAG ACCAGTCTCT

2751 CATCAAGAAA TAAAGCCGGA ACATTAGTGC AGGCAGCTTC CACAGCAATA
 GTAGTTCTTT ATTGCGGCTT TGTAAACAAG TCCGTGGAAG GTGCTGTTAT

2801 GCATCTGGT CATCCAGCG ATAGTTAATA ATCAGCCAC TGACAGTTG
 CGTAGGACCA GTAGSTCGCC TATCAATTAT TAGTCGGTG ACTGTGCAAC

ApaLI
 ~~~~~

2851 CCGGAGAAGA TTGTGACCG CCGCTTACA GGCTTCGAG CCGCTTCGT  
 GCGCTCTTCT AACACGTGGC GCGAAATGT CCGAAGCTGC GCGAGGCAA

WO 01/87338

36/52

PCT/US01/15626

2901 CTACCATCGA CACGACCACG CTGGCACCCA GTTGATCGGC GCGAGATTTA  
 GATGGTAGCT GTGCTGGTGC GACCGTGGGT CAATAGCCG CGCTCTAAAT  
 2951 ATCGCCCGCA CAATTTGCGA CGCGCGTGC AGGGCCACAC TGGAGGTGGC  
 TAGCGGCGCT GTTAAACGCT GCCGCGCACG TCCCGTCTG ACCTCACCG  
 3001 AACCCCAATC AGCAACGACT GTTGGCCCGC CAGTGTGTGT GCCACGCGGT  
 TTGCGGTTAG TCGTTGCTGA CAAACGGGCG GTCAACAACA CGTTCGCGCA  
 3051 TAGGAATGTA ATTCACTCC GCATCGCCG CTTCACCTT TTCCCGCGTT  
 ATCCTTACAT TAAGTCGAGG CGGTAGCGGC GAAGTGAAA AAGGGCGCAA  
 3101 TTCCGAGAAA CGTGGCTGGC CTGGTTCACC ACGCGGAAA CGTCTGATA  
 AAGCGCTTT GCACCGACCG GACCAAGTGG TCGCCCTTT GCCAGACTAT  
 3151 AGAGACACCG GCATACTCTG CGACATCGTA TAACGTTACT GGTTCACAT  
 TCTCTGTGGC CGPATGAGAC GCTGTAGCAT ATTGCAATGA CCAAGTGEA  
 3201 TCACCCCCCT GAATTGACTC TCTTCCGGC GCTATCATGC CATACCGGA  
 AGTGGTGGGA CTTAAGTGG AGAAGGCCCG CGATAGTACG GTATGGCGCT  
 3251 AAGGTTTTCG GCCATTCGAT GCTAGCCATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA  
 TTCCAAAACG CGSTAAGCTA CGATCGGTAC ACTCGTTTT CCGTCTTTT  
 3301 GCGCAGGAAC CGTAAAAGG CCGCGTTCCT GCGTTTTTC CBTAGGCTCC  
 CCGTCTTTG GCATTTTTCC GCGCAACCG CCGCAAAAAG GTATCCGAGG  
 3351 GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA  
 CGGGGGACT GCTCGTAGTG TTTTAGCTG CGAGTTCAGT CTCACCCGT  
 3401 AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT  
 TTGGCTGTC CTGATATTC TATGGTCCGC AAAGGGGAC CTTGAGGGA  
 3451 CGTGGCTCT CTTGTTCGGA CCTGCGCGT TACCGGATAC CTGTCCGCT  
 GCACCGGAGA GGACAAGGCT GGGACGGCGA ATGGCCATG GACAGGCGGA  
 3501 TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTCTC ATAGCTCAGC CTGTAGGTAT  
 AAGAGGGAAG CCCTTCGCAC CCGAAAGAG TATCGAGTGC GACATCCATA  
  
 ApaLI  
 -----  
 3551 CTCAGTCCG TGTAGTCTGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC  
 GATCAAGCC ACATCCAGCA AGCGAGGTTG GACCCGACAC ACSTGCTTGG  
 3601 CCCCGTTCAG CCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATAT CGTCTGAGT  
 GGGCAAGTC GGGCTGGGA CCGGAATAG GCCATTGATA GCAGAACTCA  
 3651 CCAACCCGCT AAGACACGAC TTCTCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGTTAAC  
 GGTGGGCCA TTCTGTGCTG AATAGCGGTG ACCGTCTCTG GTGACCATTG  
 3701 AGGATTAGCA GAGCGAGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG  
 TCCTAATCGT CTCGCTCCAT ACATCCGCA CGATGTCTCA AGAAGTTCAC  
 3751 GTGGCCTAAC TACGGTACA CTAGAAGAAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC  
 CACCGGATG ATGCCGATGT GATCTTCTG TCATAAACCA TAGACCGGAG  
 3801 TGCTGTAGCC ASTTACCTTC GGAAAAGAG TTGTTAGCTC TTGATCCGGC

---

WO 01/87338

PCT/US01/15626

37/52

ACGACATCGG TCAATGGAAG CCTTTTCTC AACCATCGAG AACTAGGCCG  
 3851 AAACAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT  
 TTTGTTTGGT GCGGACCATC GCCACCAAAA AAACAACAGT TCGTCGTCTA  
 3901 TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAGAAGA TCCTTTGATC TTTCTACGG  
 ATGCGCGTCT TTTTTCCCTA GAGTTCCTCT AGGAACCTAG AAAAGATGCC  
 3951 GGTCTGACCG TCACTGGAAC GAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCAGA  
 CCAGACTGCG AGTCACCTTG CTTTGAAGTG CAATTCCTTA AAACCGTCT  
 4001 TCTAGCACCA GCGGTTTAA GGCACCAATA ACTGCCATA AAAAATTACG  
 AGATCGTGGT CCGCAAAATC CCGTGGTTAT TGACGGAAAT TTTTAAATGC  
 4051 CCCC GCCCTG CCACTCATCG CAGTACTGTT GTAATTCATT AAGCATTCTG  
 GGGCGGGGAC GGTGAGTAGC GTCATGACCA CATTAAAGTA TTCGTAAGAC  
 4101 CCGACATGGA AGCCATCACA AACGGCATGA TGAACCTGAA TCGCCAGCGG  
 GGCTGTACCT TCGGTAGTGT TTGCCGTACT ACTTGGACTT AGCGGTGCGC  
 4151 CATCAGCACC TTGTCGCTT GGTATAATA TTTGCCATA GTGAAAACGG  
 GTAGTCGTGG AACAGCGGAA CGCATATTAT AAAAGGGTAT CACTTTTGCC  
 4201 GGGCGAAGAA GTTGTCCATA TTGGCTACGT TTAATCAAA ACTGSGTAAA  
 CCGCTTCTT CACAGGATAT AACCGATGCA AATTAGTTT TGACCCACTTT  
 4251 CTCACCCAGG GATTGGCTGA GACGAAAAAC ATATTCTCAA TAAACCCCTT  
 GGTGGGTCC CTAACCGACT CTGCTTTTTG TATAAGAGTT ATTTGGGAAA  
 4301 AGGGAATAG GCCAGTTTT CACCGTAACA CCGCACATCT TCGGAATATA  
 TCCCTTATC CCGTCCAAA GTGGCATTGT CCGGTGTAGA ACCTTATAT  
 4351 TGTGTAGAAA CTGCCGAAA TCGTGTGGT ATTCACTCCA GAGCGATGAA  
 ACACATCTTT GACGCGCTTT AGCAGCACCA TAAGTGAGGT CTCGCTACTT  
 4401 AACGTTFCAG TTTGCTCATG GAAAACGGTG TAACAAGGGT GAACACTATC  
 TTGCAAGATC AACGAGTAC CTTTGGCCAC ATTTGTTCCA CTGTGATAG  
 4451 CCATATCACC AGCTCACCGT CTTTCATTGC CATACGGAAC TCCGGGTGAG  
 GGTATAGTGG TCCAGTGGCA GAAAGTAACG GTATGCCCTG AGGCCACTC  
 4501 CATTTCATCAG GCGGCAAGA ATGTGAATAA AGGCCGATA AAACCTGTGC  
 GTAAGTAGTC CGCCGTTCT TACACTTATT TCCGGCTAT TTTGAACCG  
 4551 TTATTTTCT TTACGGTCTT TAAAAAGGCC GTAATATCCA GCTGAACGCT  
 AATAAAAAGA AATGCCAGAA ATTTTCCGG CATTATAGGT CGACTTGCCA  
 4601 CTGGTATAG GTACATTGAG CAACTGACTG AAATGCCTCA AAATGTTCTT  
 GACCAATATC CATGTAACCT GTTGACTGAC TTTACGGAGT TTTACAAGAA  
 4651 TACGATGCCA TTGGGATATA TCAACGGTGG TATATCCAGT GATTTTTTTC  
 ATGCTACGGT AACCTATAT AGTTGCCACC ATATAGGTCA CTA AAAAAG  
 4701 TCCATTTTAG CTTCCCTAGC TCCTGAAAT CTCGATAACT CAAAAATAC  
 AGGTAAATC GAAGGATCG AGGACTTTTA GAGCTATTGA GTTTTTATG  
 4751 GCCCGTAGT GATCTTATT CATTATGGTG AAAGTTGGAA CCTCACCCGA

WO 01/87338

PCT/US01/15626

38/52

```

CGGGCCATCA CTAGATAAA GTAATACCAC TTTCACCTT GGAGTGGGCT
4801 CGTCTAATGT GAGTTAGCTC ACTCATTAGG CACCCCAGGC TTACACTTT
GCAGATTACA CTCATPCGAG TGAGTAATCC GTGGGTCCG AATGTGAAA
4851 ATGCTTCCGG CTCGTATGTT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACRATTCA
TACGAGGCC GAGCATAAA CACACCTTA CACTCGCCTA TTGTTAAGT

M13 Reverse primer 100.0% KbaI
=====
4901 CACAGGAAAC AGCTATGACC ATGATTACGA ATTTCTAGAT AACGAGGGCA
GTGTCCITG TCGATACTGG TACTAATGCT TAAAGATCTA TTGCTCCCGT
4951 AAAAAATGAAA AAGACAGCTA TCGCGATTGC ACTGGCACTG GCTGGTTTCG
TTTTTACTTT TTCTGTGAT AGCGCTAACC TCACCGTGAC CGACCAAAGC

EcoRV
---
5001 CTACCGTAGC GCAGGCCGAT
GATGGCATCG CCTCCGGCTA

```

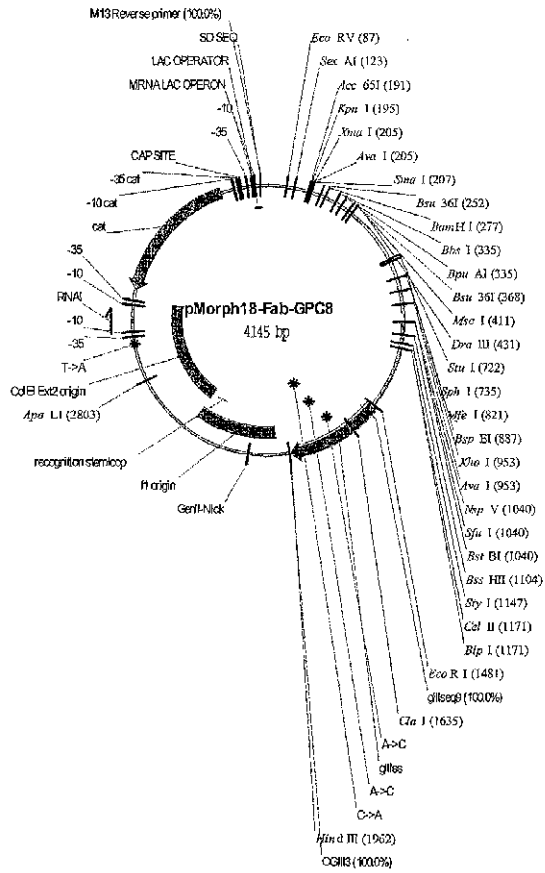
---

WO 01/87338

39/52

PC/T/US01/15626

Figure 14



WO 01/87338

40/52

PCT/US01/15626

**Figure 14 (cont)**

```

1  TCAGATAACG AGGGCAAAA ATGAAAAAGA CAGCTATCGC GATTGCAGTG
   AGTCTATTGC TCCCGTTTT TACTTTTTCT GTCGATAGCG CTAACGTCAC

                                     EcoRV
                                     -----
51  GCACCTGGCTG GTTTCGCTAC CGTAGCCGAG GCCGATATCG TGCTGACCCA
   CGTGACCGAC CAAAGCGATG GCATCGCGTC CCGCTATAGC ACCACTGGGT

                                     SexAI
                                     -----
101 GCGCCCTTCA GTGAGTGGCG CACCAGGTCA GCGTGTGACC ATCTCGTSTA
   CCGGGGAAGT CACTCACCGC GTGGTCCAGT CGCACACTGG TAGAGCACAT

                                     KpnI
                                     -----
                                     Acc65I
                                     -----
151 GCGGCAGCAG CAGCAACATT GGCAGCAACT ATGTGAGCTG GTACCAGCAG
   CGCGTCCGTC GTCGTTGTAA CCGTCTGTGA TACACTCGAC CATGGTCGTC

   XmaI
   -----
   SmaI
   -----
   AvaI                                     Bsu36I
   -----                                     -
201 TTGCCCCGGA CCGCGCCGAA ACTGCTGATT TATGATAACA ACCAGCGTCC
   AACGGGCCCT GCGCGGCTT TGACGACTAA ATACTATTGT TGGTCGCAGG

   Bsu36I                                     BamHI
   -----                                     -----
251 CTCAGGCGTG CCGGATCGTT TTAGCGGATC CAAAAGCGGC ACCAGCGCGA
   GAGTCGCGAC GGCCTAGCAA AATCGCCTAG GTTTTCGCCG TGGTCGCGCT

                                     BpuAI
                                     -----
                                     BbsI
                                     -----
301 GCCTTGGCAT TACGGCCCTG CAAAGCGAG ACGAAGCGGA TTATTATTGC
   CGGAAGGCTA ATGCCCGGAC GTTTCGCTTC TGCTTGGCCT AATAATAACG

                                     Bsu36I
                                     -----
351 CAGAGCTATG ACATGCCCTCA GGCTGTGTTT GCGCGCGGCA CGAAGTTTAA
   GTCTCGATAC TGTACGGAGT CCGACACAAA CCGCGCGCGT GCTTCAAATT

   MscI                                     DraIII
   -----                                     -----
401 CCGTCTTTGG CCAGCCGAAA GCCGCACCGA GTGTGACGCT GTTCCGCGG
   GGCAGAAGCC GGTCCGCTTT CCGCGTGGCT CACACTGCGA CAAAGCGGGC

451 AGCAGCGAAG AATTGCAGGC GAACAAAGCG ACCCTGGTGT GCCTGATTAG
   TCGTCGCTTC TTAACGTCCG CTTGTTTCGC TGGGACCACA CCGACTAATC

501 CGACTTTTAT CCGGGAGCCG TGACAGTGGC CTGGAAGGCA GATAGCAGCC

```

WO 01/87338

PCT/US01/15626

41/52

```

GCTGAAATA GGCCTTCGGC ACTGTCACCG GACCTTCGGT CTATCGTCGG
551 CCGTCAAGGC GGGAGTGGAG ACCACCACAC CCTCCAAACA AAGCAACAAC
GGCAGTTCGG CCTCACCTC TGGTGGTGTG GGAGGTTTGT TTCGTTGTTG
601 AAGTACGCGG CCAGCAGCTA TCTGAGCCTG ACGCCTGAGC AGTGGAAATC
TTCATGCGCC GGTCTCGAT AGRCTCGGAC TCGGACTCG TCACCTTCAG
651 CCACBAAGC TACAGTGGC AGTCAACCA TGAGGGGAGC ACCCTGGAAA
GGTGTCTTG ATGTCGACGG TCCAGTGGT ACTCCCCTCG TGGCACCTTT

          StuI           SphI
          -----
701 AAACCGTTGC GCCGACTGAG GCCTGATAAG CATGCGTAGG AGAAAATAAA
TTTGGCAACG CCGCTGACTC CGGACTATTC GTACGCATCC TCTTTTATTT
751 ATGAAACAAA GCACCTATTG ACTGGCACTC TTACCGTTGC TCTTCACCCC
TACTTTGTTT CGTGTATAACG TGACCGTGAG AATGGCAACG AGAAGTGGGG

          MfeI
          -----
801 TGTTACAAA GCCCAGGTGC AATTGAAGA AAGCGGCCG GCCCTGGTGA
ACAATGGTTT CCGGTCCACG TTAACTTTCT TTCGCCGGGC CGGGACCACT

          BspBI
          -----
851 AACCGACCCA AACCTGACC CTGACCTGTA CCTTTTCCGG ATTTAGCCTG
TTGCTGGGT TTGGGACTGG GACTGGACAT GGAAAAGGCC TAAATCGGAC
901 TCCACGTCG CGGTTGGCGT GGGCTGGATT CGCCAGCCGC CTGGGAAAGC
AGGTGCAGAC CGCAACCGCA CCGGACCTAA GCGGTGCGCG GACCCTTTCG

XhoI
-----
AvaI
-----
951 CCTCGAGTGG CTGGCTCTGA TTGATTGGGA TGATGATAAG TATTATAGCA
GGAGCTCAC GACCGAGACT AACTAACCTT ACTACTATTC ATAATATCGT

          BstBI
          -----
          SfuI
          -----
          NspV
          -----
1001 CCAGCCTGAA AACCGTCTG ACCATTAGCA AAGATACTTC GAAAAATCAG
GGTCGGACTT TTCCGCAGAC TGGTAATCGT TTCTATGAAG CTTTTTAGTC
1051 GTGTTGCTGA CTATGACCAA CATGGAACCG GTGGATAACG CCACCTATTA
CACCACGACT GATACTGGTT GTACCTGGGC CACCTATGCC GGTGGATAAT

          BssHII
          -----
          StyI
          -----
1101 TTGCGGCGGT TCTCCTGGTT ATCGTGGTGC TTTTGATTAT TGGGGCCAG
AACCGCCGCA AGAGGAGCAA TAGCACCCAG AAAACTAATA ACCCCGTTTC

          BlnI

```

WO 01/87338

42/52

PC/US01/15626

```

StyI
-----
1151 GCACCCCTGGT GACGGTTAGC TCAGCGTCCA CCAAGGTCC AAGCGTGTTC
    CGTGGGACCA CTGCCAATCG AGTCGCAGCT GGTTCGAGS TTCGCACAAA

1201 CCGCTGGGCTC CGAGCAGCAA AAGCACCAGC GCGGCACGG CTGCCCTGGG
    GCGGACCGAG GCTCGTCGTT TTCGTGGTCC CCGCCGTGCC GACGGGACCC

1251 CTGCGTGGTT AAAGATTATT TCCCGGAACC AGTCACCCTG AGCTGGAACA
    GACGGACCAA TTCTAATAA AGGGCCTTGG TCAGTGGCAC TCGACCTTGT

1301 GCGGGGGGCT GACCAGCGGC GTGCATACCT TTCGGCGGTT GCTGCAAAGC
    CCGCCCGCGA CTGGTCGCCG CACGTATGGA AAGGCCGCCA CGACGTTTCG

1351 AGCGGCTGTG ATAGCCTGAG CAGCGTTGTG ACCGTGCCGA GCGCAGCTT
    TCGCCGGACA TATCGGACTC GTCGCAACAC TGGCACGGCT CGTCTCGAAA

1401 AGGCACTCAG ACCTATAATT GCAACGTGAA CCATAAACCG AGCAACACCA
    TCCGTGAGTC TGGATATAAA CGTTGCACTT GGTATTTGGC TCGTTGTGGT

EcoRI
-----
1451 AAGTGGATAA AAAAGTGGAA CCGAAAAGCG AATTCCGGGG AGGGAGCGGG
    TTCACCTATT TTTTACCTTT GGTCTTTCGC TTAAGCCCCC TCCCTCGCCC

1501 AGCGGTGATT TTGATTATGA AARGATGGCA AACGCTAATA AGGGGGCTAT
    TCGCCACTAA AACTAATACT TTCTACCGT TTGGATATAT TCCCCGATA
    gIIIseq9 100.0%
    =====

1551 GACCGAAAAT GCCGATGAAA ACGCGCTACA GTCTGACGCT AAAGGCABAAC
    CTGGCTTTTA CGGCTACTTT TGGCGGATGT CAGACTGCCA TTCCGTTTGG

ClaI
-----
1601 TTGATTCTGT CGTACTGAT TAGGGTGGTG CTATCGATGG TTTCATTGGT
    AACTAAGACA CGGATGACTA ATGCCACGAC GATAGCTACC AARGTAACCA

1651 GACCTTTCGG GCCTTGCTAA TGGTAATGGT GCTACTGGTG AFTTTGCTGG
    CTGCAARGGC CGGAACGATT ACCATTACCA CGATGACCAC TAAAACGACC

1701 CTCTAATTCC CAAATGGCTC AAGTCGGTGA CGGTGATAAT TCACCTTTAA
    GAGATTAAGG GTTTACCGAG TTCAGCCACT GCCACTATTA AGTGGAAATT

1751 TGAATATATT CCGTCAATAT TTACCTTCCC TCCCTCAATC GGTTGAATGT
    ACTTATTAAG GGCAGTTATA AATGGAAGGG ACGGAGTTAG CCAACTTACA

1801 CGCCCTTTTG TCTTTGGGCG TGTAAACCA TATGAATTTT CTATGATTTG
    GCGGAAAAC AGAAACCGCG ACCATTGGGT ATACTTAAAA GATAACTAAC

1851 TGACAAAATA AACTTATCC GTGGTGTCTT TSCGTTCTT TTATATGTTG
    ACTGTTTTAT TTGAATAAGG CACCACGAA ACGCAAGAA AATATACRAC

1901 CCACCTTETAT GTATGTATTT TCTACGTTTG CTAACATACT GCGTAATAAG
    GGTGGAAATA CATAATAAA AGATGCBAAC GATTGTATGA CGCATTATTC

```

WO 01/87338

43/52

PC1/US01/15626

HindIII

~~~~~

1951 GAGTCITGAT AAGCITGACC TGTGAAGTGA AAAATGGCCG AGATTGTCCG
 CTCAGAACTA TTCGAACTGG ACACTTCACG TTTTACCCGG TCTAACACGC
 CGIII3 100.0%

2001 ACATTTTTTT TGTCTGCCGT TTAATGAAAT TGTAAACGTT AATATTTTGT
 TGTAAAAAAA ACAGACGGCA AATTACTTTA ACATTTGCAA TTATAAAACA

2051 TAAAAATCGC GTTAAATTTT TGTAAATCA GCTCATTTTT TAACCAATAG
 ATTTTAAGCG CAATTTAAAA ACAATTTAGT CGAGTAAAAA ATTTGGTTATC

2101 CCGGAATCGC GCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG
 CCGCTTTAGC CGTTTtaggg AATATTTAGT TTTCTTATCT GGTCTATCC

2151 GTTGAGTGTG GTTCCAGTTT GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG
 CAACTCACA CAAGGTCAAA CCTTGTCTC AGGTGATAAT TTCTGCACC

2201 ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT ATCAGGGCGA TGGCCCACTA
 TAGAGTTGCA GTTCCCGCT TTTTGGCAGA TAGTCCCGCT ACCGGGTGAT

2251 CGAGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTGG GGGTCGAGGT GCCATAAGC
 GCTCTTGGA GTGGGATTAG TTCAAAAAC CCCAGCTCCA CGGCATTTCC

2301 ACTAAATCGG AACCCATAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA
 TGATTTAGCC TTGGGATTTT CCTCGGGGG TAAATCTCGA ACTGCCCTT

2351 AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC
 TCGGCCGCTT GCACCGCTCT TCCCTCCCT TCTTTCGCTT TCCTCGCCCG

2401 GCTAGGGCGC TGGCAAGTGT AGCGGTCCAG CTGCGCGTAA CCACCACACC
 CGATCCCAGC ACCGTTCA CAAGCAGTGC GACGCGCATT GGTGTGTGG

2451 CGCCGCGCTT AATGCGCGC TACAGGCGCG GTGCTAGCCA TGTAGCAAA
 GCGCGCGGAA TTACGCGGCG ATGTCCCGCG CACGATCGGT ACCTCGCTT

2501 AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT
 TCCGGTCTTT TTCCGCTCCT TGGCATTTTT CCGCGCAAC GACCCAAAA

2551 TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC ACAAAATCG ACGCTCAAGT
 AGGTATCGA GCGGGGGGA CTGCTCGTAG TGTTTTtagc TGGAGTTCA

2601 CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC
 GTCTCCACC CTTTGGGCTG TCCTGATATT TCTATGGTCC GCAAAGGGGG

2651 TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTC CACCCTGCCG CTTACCGGAT
 ACCTTCGAGG GAGCACCGCA GAGGACAAGG CTGGGACGGC GAATGGCCTA

2701 ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA
 TGGACAGCG GAAAGAGGGA AGCCCTTCGC ACCCGAABAG AGTATCGAGT

2751 CGCTGTAGGT ATCTCACTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG
 GCGCATCCA TAGAGTCAAG CCACTCCAG CAAGCGAGST TCGGCCGAC

ApaLI

~~~~~

WO 01/87338

44/52

PCT/US01/15626

2801 TGTGCACGAA CCCCCCGTTC AGTCCGACCG CTGGCCCTTA TCCGGTAACT  
 ACACGTGCTT GGGGGGCAAG TCAGGCTGGC GACGCGGAA T AGGCCATTGA  
 2851 ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA  
 TAGCAGAACT CAGGTGGGGC CATTCGTGTC TGAATAGCGG TGACCCGTGCT  
 2901 GCCACTGCGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA  
 CCGTGCACCT TGTCCATATC GTCTCGCTCC ATACATCCGC CAGCATGCTC  
 2951 GTTCTGSAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA ACAGTATTTG  
 CAAGAACTTC ACCACCGGAT TGATGCCGAT GTGATCTTCT TGTATAAAC  
 3001 GTAATCTGCC TCTGCTGTAG CCACTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC  
 CATAGACCGC AGACGACATC GGTCAAATGGA AGCCCTTTTC TCAACCATCG  
 3051 TCTTGATCCG GCAACAACAC CACCGCTGGT AGCCGTGGTT TTTTGTGTTG  
 AGAACTAGGC CGTTTGTGTC GTGGCGACCA TCGCCACCAA AAAAACAACAC  
 3101 CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA  
 GTTCGTGCTC TAATGCGCGT CTTTTTTTCC TAGAGTTCTT CTAGGAAACT  
 3151 TCTTTTCTAC GGGTCTGAC GCTCAGTGGG ACGAAAACCT ACGTTAAGGG  
 AGAAAAGATG CCCACAGATG CGAGTCACCT TGCTTTTGGG TGCATTTCC  
 3201 ATTTTGGTCA GATCTAGCAC CAGGCGTTTA AGGGCACCAA TACGTGCCTT  
 TAAACACAGT CTAGATCGTG GTCCGCAAA TCCCGTGGTT ATTGACGGAA  
 3251 AAAAAAATA CCCCCCGCCC TGCCACTCAT CGCAGTACTG TGTAAATCA  
 TTTTTTAAT GCGGGCGGGG ACGGTGAGTA GCGTCATGAC AACATTAAGT  
 3301 TTAAGCATTG TCGCGACATG GAAGCCATCA CAAACGGCAT GATGAACCTG  
 AATTCGTAAG ACGGCTGTAC CTTCCGTAAT GTTTGCCGTA CTACTTGGAC  
 3351 AATCGCCAGC GGCATCAGCA CCTTGTCCGC TTGCGTATAA TATTTGCCCA  
 TTAGCGGTGC CCGTAGTCGT GGAACAGCGG AACGCATATT ATAAACGGGT  
 3401 TAGTGAANAAC GGGGGCGAAG AAGTTGTCCA TATTGGCTAC GTTTAAATCA  
 ATCACTTTTG CCCCCTTTC TTCAACAGGT ATAACGATG CAATTTAGT  
 3451 AACTGGTGA AACTCACCCA GGGATTGCTT GAGACGAAA ACATATTCTC  
 TTTGACCACT TTGAGTGGGT CCTAACCGA CTCGCTTTT TGTATAAGAG  
 3501 AATAAACCTT TTAGGGAAAT AGCCAGGTT TTCCCTCAA CACGCCACT  
 TTATTTGGGA AATCCCTTTA TCCGCTCAA AAGTGGCATT GTGCGGTGA  
 3551 CTTCGAATA TATGTGTAGA AACTGCCCGA AATCGTCTG GTATTCACTC  
 GAACGCTTAT ATACACATCT TTGACGGCCT TTAGCAGCAC CATAAGTGAG  
 +1  
 3601 CAGAGCGATG AAAACGTTTC AGTTTGTCTA TGGAAAACCG TGTAAACAAG  
 GTCTCGCTAC TTTTGCAAAAG TCAAACGAGT ACCTTTGGCC ACATTTGTCC  
 3651 GTGAACACTA TCCCATATCA CCAGCTCACC GTCTTTCATT GCCATACGGA  
 CACTTGTGAT ACGGTATAGT GGTCCAGTGG CAGAAAGTAA CCGTATGCTC  
 3701 ACTCCGGGTG AGCATTATC AGCCGGGCAA GAATGTGAAT AAAGGCCGGA  
 TGAGGCCAC TCGTAAGTAG TCCGCCCTT CTTACACTA TTTCCGGCT

WO 01/87338

45/52

PCT/US01/15626

```
3751 TAAAACTTGT GCTTATTTT CTTTACGGTC TTTAAAAAGG CCGTAATAATC
      ATTTTGAACA CGAATAAAAA GAAATGCCAG AAATTTTCC GGCATTATAG
3801 CAGCTGAACG GTCCTGGTAT AGGTACATFG AGCAACTGAC TGAATGCOCT
      GTCGACTTGC CAGACCAATA TCCATGTAAC TCGTTGACTG ACTTTACGGA
3851 CAAAAATGTC TTTACGATGC CATTGGGATA TATCAACGGT GGTATATCCA
      GTTTTACAG AATGCTACG GTAACCTAT ATAGTTGCCA CCRATAGGT
3901 GTGATTTTTT TCTCCATTT AGCTCCCTTA GCTCCTGAAA ATCTCGATAA
      CACTAARAAA AGAGGTAAA TCGAAGGAAT CGAGGACTTT TAGAGTATT
3951 CTCAAAAAAT ACGCCCGGTA GTGATCTTAT TTCATTATGG TGAAGTTGG
      GAGTTTTTTA TCGGGCCAT CACTAGAATA AAGTAATACC ACTTCAACC
4001 AACCTCACCC GACGTCTAAT GTGAGTTAGC TCACTCATTA GGCACCCAG
      TTGGAGTGGG CTGCAGATA CACTCAATCG AGTGAGTAT CCGTGGGTC
4051 GCTTTACACT TTATGCTTCC GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG
      CGAAATGTGA AATACCAAGG CCGAGCATAC AACACACCTT AACACTCGCC

      M13 Reverse primer 100.0%
      =====
4101 ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GAATT
      TATTGTTAAA GTGTGTCCTT TCTCGATACT GGTACTAATG CTTAA
```

---

WO 01/87338

46/52

PCT/US01/15626

**Figure 15**

MS-GPC-1:

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARQYGHRGGFDHWGQGLVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCQSYDFNE  
SVFGGGTKLTVLG

MS-GPC2:

VH

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPGRGL  
EWLGRYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA  
VYYCARSHNKKWRFYNLYSLYDFDFWGQGLVTVSS

VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLI  
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQESGFPY  
TFGQGTKVEIKRT

MS-GPC3:

VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGGGLE  
WMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDYAV  
YYCARLSTRMDPWGQGLVTVSS

VL

WO 01/87338

47/52

PCT/US01/15626

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQDDNFPIT  
FGQGTKVEIKRT

MS-GPC4:

VH

QVQLKESGPAIVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGIRPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARYYYVYVGVYGVTHYDDVWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQDYSYPS  
TFGQGTKVEIKRT

MS-GPC5:

VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE  
WMGGIIPFGTANYAQKFGQGRVITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVY  
CARHSFFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKPGQAPVLIY  
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDNVDIS  
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC-6

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE  
WVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  
YCARGYGRYSPDLWGQGLTVTVSS

---

WO 01/87338

48/52

PCT/US01/15626

VL

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI  
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQYSNLPF  
TFGQGTKVEIKRT

MS-GPC7:

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSQNGFYGCNLDIWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSRDPSN  
VVFGGGKLTVLG

MS-GPC-8

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDMPQ  
AVFGGGKLTVLG

MS-GPC-10

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARQLHYRGGFDLWGQGLTVTVSS

---

WO 01/87338

49/52

PCT/US01/15626

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDLTM  
GVFGGGKLTVLG

MS-GPC11:

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARsqgyrggldvWGQGLVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDYGIV  
VFGGGKLTVLG

MS-GPC14:

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE  
WVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  
YCARSSMPMYGEGFDLWGQGLVTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQKPKQAPVLVIY  
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSYDFGVSH  
SVFGGGKLTVLG

MS-GPC15:

VH

WO 01/87338

50/52

PCT/US01/15626

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE  
WVSAISGSGGGLVQADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  
YCARFYYSHVLAMDNDWGQGLTVTVSS

VL

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDALGDKYASWYQQKPGQAPVLIY  
DDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSRDIHHNE  
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC16:

VH

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPGRGL  
EWLGRYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA  
VYYCARTQLYYFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQS  
PQLLIYLGSRASGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQY  
NSYPRTFGGQTKVEIKRT

MS-GPC-8-6

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNI GS NYVSWYQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCQSYDYDH  
YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-10

WO 01/87338

51/52

PC/T/US01/15626

VH

QVQLKESG PALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCQSYDLIRH  
VFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-17

VH

QVQLKESG PALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCQSYDFSV  
YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-27

VH

QVQLKESG PALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVSWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCQSYDMNV  
HVFGGGTKLTVLG

WO 01/87338

52/52

PC/T/US01/15626

MS-GPC-8-6-13

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSESNIGANYVTWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCQSYDYDH  
YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-10-57

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSESNIGNNYVQWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCQSYDLIRH  
YVFGGGTKLTVLG

MS-GPC-8-27-41

VH

QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE  
WLALIDWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYY  
CARSPRYRGAFDYWGQGLTVTVSS

VL

DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSESNIGNNYVQWYQQLPGTAPKLLI  
YDNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCQSYDMNV  
HVFGGGTKLTVLG

【 國際調查報告 】

|                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                    | International application No.<br>PCT/US01/15626                                                                                                                                                                  |
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| IPC(7) : A61K 39/395, 48/00; G01N 33/53;<br>US CL : 424/133.1; 435/7.1; 514/44<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 424/133.1; 435/7.1; 514/44                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EAST, medline, biosis, caplus, embase               |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| Category *                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No.                                                                                                                                                                                            |
| X                                                                                                                                                                                   | Qucen, C. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor Proc. Natl. Acad. Sci. USA December 1989, Vol. 86, pages 10029-10033. See abstract.                                                                                        | 1                                                                                                                                                                                                                |
| Y                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                    | 3-7                                                                                                                                                                                                              |
| Y                                                                                                                                                                                   | PISTILLO et al. A novel approach to human anti-HLA mAbs production: Use of phage display libraries. Hum. Immunol. September 1997, Vol. 57, pages 19-26.                                                                                            | 3-7                                                                                                                                                                                                              |
| X,P                                                                                                                                                                                 | US 6,190,377 B1 (Morgan et al) 30 January 2001, see entire document                                                                                                                                                                                | 1, 3-7, 66-68                                                                                                                                                                                                    |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                               |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| * Special categories of used documents:                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                            | "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or obvious because it involves an inventive step when the document is taken alone                                                                           | "Y" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application has not been considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "B" earlier application or patent published on or after the international filing date                                                                                               | "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | "X" document member of the same patent family                                                                                                                                                                    |
| "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)               | "P" document published prior to the international filing date but later than the publication date                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| "W" document published prior to the international filing date but later than the publication date                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                  |
| Date of the actual completion of the international search                                                                                                                           | Date of mailing of the international search report<br><b>30 OCT 2001</b>                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                  |
| 06 September 2001 (06.09.2001)                                                                                                                                                      | Name and mailing address of the ISA/IIS<br>Commissioner of Patents and Trademarks<br>Box PCT<br>Washington, D.C. 20531<br>Facsimile No. (703)305-3230                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                  |
|                                                                                                                                                                                     | Authorized officer<br>Q. Janice Li <i>Janice Li</i><br>Telephone No. 703-308-0196                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                      |                                     | Internat <sup>n</sup> application No.<br>PCT/US81/15626                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>                                   |                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:                |                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 1.                                                                                                                                               | <input type="checkbox"/>            | Claim Nos. :<br>because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:                                                                                                                                                            |
| 2.                                                                                                                                               | <input checked="" type="checkbox"/> | Claim Nos. : 2 and 69<br>because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:<br>Please See Continuation Sheet |
| 3.                                                                                                                                               | <input checked="" type="checkbox"/> | Claim Nos. : 8-65<br>because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).                                                                                                                            |
| <b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>                                           |                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:<br>Please See Continuation Sheet |                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 1.                                                                                                                                               | <input checked="" type="checkbox"/> | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.                                                                                                                                |
| 2.                                                                                                                                               | <input type="checkbox"/>            | As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.                                                                                                                    |
| 3.                                                                                                                                               | <input type="checkbox"/>            | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos. :                                                                   |
| 4.                                                                                                                                               | <input type="checkbox"/>            | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. :                                                       |
| Remarks on Protest                                                                                                                               | <input type="checkbox"/>            | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.                                                                                                                                                                                                 |
|                                                                                                                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees.                                                                                                                                                                                                           |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/15626

**Continuation of Box I. Reason 2:**

Claims 2 and 69 are unsearchable because they contain numerous sequences, which are identified by arbitrary designations, and do not clearly relate to the specification.

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

I. Claims 1, 3-7, drawn to a composition including a polypeptide comprising at least one antibody-based antigen-binding domain.

II. Claims 66-68, drawn to a business method.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of Group I is considered to be a composition comprising at least one antibody-based antigen-binding domain of human composition with a binding specificity for an antigen expressed on the surface of a cell, wherein treating cells with said composition leads to suppression of an immune response.

The special technical feature of Group II is considered to be a method comprising isolating an antibody, generating a composition, conducting therapeutic profiling, preparing a package insert and marketing said composition.

The technical feature linking groups I and II appears to be that they are products and method for conducting a pharmaceutical business associated with the said products.

However, Queen et al (Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1989) teach a composition drawn to a humanized antibody, which binds to cell surface receptor IL-2 (an antigen expressed on the surface of a cell), and inhibits proliferation of T cells and suppresses an immune response. In addition, this composition could be used in a materially different process, such as suppression of an immune response in an animal.

Therefore, the technical feature linking the inventions of groups I and II does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

Accordingly, Groups II and I are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single general inventive concept.

Claims 8-65 are unsearchable because they are in improper multiple dependent form.

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | F I           | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 1/18              | A 6 1 P 1/16  | 4 C 0 8 5  |
| A 6 1 P 3/10              | A 6 1 P 1/18  | 4 H 0 4 5  |
| A 6 1 P 13/12             | A 6 1 P 3/10  |            |
| A 6 1 P 17/06             | A 6 1 P 13/12 |            |
| A 6 1 P 19/02             | A 6 1 P 17/06 |            |
| A 6 1 P 21/04             | A 6 1 P 19/02 |            |
| A 6 1 P 25/02             | A 6 1 P 21/04 |            |
| A 6 1 P 29/00             | A 6 1 P 25/02 |            |
| A 6 1 P 37/02             | A 6 1 P 29/00 | 1 0 1      |
| A 6 1 P 37/06             | A 6 1 P 37/02 |            |
| A 6 1 P 43/00             | A 6 1 P 37/06 |            |
| C 0 7 K 16/28             | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5      |
| C 1 2 N 1/15              | C 0 7 K 16/28 |            |
| C 1 2 N 1/19              | C 1 2 N 1/15  |            |
| C 1 2 N 5/06              | C 1 2 N 1/19  |            |
| C 1 2 N 5/10              | C 1 2 P 21/02 | C          |
| C 1 2 P 21/02             | C 1 2 Q 1/02  |            |
| C 1 2 Q 1/02              | G 0 1 N 33/50 | T          |
| G 0 1 N 33/50             | C 1 2 N 5/00  | A          |
|                           | C 1 2 N 5/00  | E          |

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

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(72) 発明者 ナギー, ゴルタン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ, ビルディング 6 0 0, ワン  
ケンダル スクエア

(72) 発明者 テサル, ミヒャエル

ドイツ連邦共和国 8 2 3 6 2 ヴァイルハイム カロリンガーシュトラッセ 2 6

(72) 発明者 トマセン - ウォルフ, エリサベス

ドイツ連邦共和国 8 1 3 6 9 ミュンヘン クリングシュトラッセ 1 2 / 3

F ターム(参考) 2G045 BA13 BB03 CA17 CB01 CB21 DA36 FA37 FB03 FB04 FB06

GC15

4B024 AA01 BA41 BA61 CA02 DA02 DA06 EA04 GA11 HA03

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QR48 QR51 QS12

4B064 AG26 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA26X AA91X AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C085 AA02 AA11 CC03 CC21

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 FA72 FA73 FA74

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |            |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 免疫调节性人MHC II类抗原结合多肽                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2004500847A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 公开(公告)日 | 2004-01-15 |
| 申请号            | JP2001583805                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 申请日     | 2001-05-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | GPC生物工艺AG公司<br>莫佛塞斯公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Gepetsue生物科技股份有限公司<br>Morufoshisu股份公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| [标]发明人         | ナギーゾルタン<br>テサルミヒャエル<br>トマセンウォルフエリサベス                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 发明人            | ナギー,ゾルタン<br>テサル,ミヒャエル<br>トマセン-ウォルフ,エリサベス                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/53                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| CPC分类号         | A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/28 C07K16/2833 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/76 Y02A50/416                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61P1/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/02 A61P29/00.101 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00.105 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/50.T C12N5/00.A C12N5/00.E                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/CA17 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB04 2G045/FB06 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS12 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA02 4C085/AA11 4C085/CC03 4C085/CC21 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 |         |            |
| 优先权            | 2000110063 2000-05-12 EP<br>60/238762 2000-10-06 US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及引起或指导免疫系统调节的人多肽。此外，本发明涉及编码所述多肽的核酸，所述多肽的制备方法，免疫抑制方法，药物组合物和诊断组合物，以及包含所述多肽的试剂盒和所述多肽的用途。

| 疾患       | 患者数(100万人単位) |          | 市場の大きさ(10億\$単位) |          |
|----------|--------------|----------|-----------------|----------|
|          | 1995         | 2010(推定) | 1994            | 2010(推定) |
| 慢性関節リウマチ | 6.6          | 7        | 2.4             | >3.7     |
| 多発性硬化症   | 0.62         | 0.65     | 0.3             | >1.5     |
| I型糖尿病    | 1.8          | 1.9      | 1.5             | >1.5     |
| 移植/GvHD  | 0.05         | 0.1      | 0.9             | >1.5     |