

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4578536号

(P4578536)

(45) 発行日 平成22年11月10日 (2010.11.10)

(24) 登録日 平成22年9月3日 (2010.9.3)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Z N A D
CO 7 K 16/18 (2006.01) CO 7 K 16/18
CO 7 K 16/46 (2006.01) CO 7 K 16/46
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 5 (全 122 頁)

(21) 出願番号	特願2008-120608 (P2008-120608)	(73) 特許権者	500287639
(22) 出願日	平成20年5月2日 (2008.5.2)		ミレニアム・ファーマシューティカルズ・
(62) 分割の表示	特願平10-509853の分割		インコーポレイテッド
原出願日	平成9年8月6日 (1997.8.6)		MILLENNIUM PHARMACE
(65) 公開番号	特開2008-281562 (P2008-281562A)		UTICALS, INC.
(43) 公開日	平成20年11月20日 (2008.11.20)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
審査請求日	平成20年5月7日 (2008.5.7)		1 3 9, ケンブリッジ, ランズタウン
(31) 優先権主張番号	08/700, 737		ストリート 40
(32) 優先日	平成8年8月15日 (1996.8.15)	(74) 代理人	100095832
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 細田 芳徳
		(72) 発明者	ボナス, ポール, ディー.
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
			1 1 8 ボストン, ナンバー 3, アプト
			ン 4 5

最終頁に続く

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト化免疫グロブリンが $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに特異的に結合するのに適した条件下で試料をヒト化免疫グロブリンと接触させる工程、および形成された抗体- $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン複合体を検出する工程を含んでなる、試料中の $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを検出するためのインビトロ方法であって、該ヒト化免疫グロブリンは、非ヒト起源の軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域 (CDR1、CDR2 および CDR3) の少なくとも1つおよびヒト起源の軽鎖可変領域に由来する枠組み領域ならびに非ヒト起源の重鎖可変領域の3つの相補性決定領域 (CDR1、CDR2 および CDR3) の少なくとも1つおよびヒト起源の重鎖可変領域に由来する枠組み領域を含む抗原結合領域を含んでなり、該相補性決定領域が以下：

軽鎖： CDR1 配列番号：12のアミノ酸44-59
 CDR2 配列番号：12のアミノ酸75-81
 CDR3 配列番号：12のアミノ酸114-122
 重鎖： CDR1 配列番号：15のアミノ酸50-54
 CDR2 配列番号：15のアミノ酸69-85
 CDR3 配列番号：15のアミノ酸118-129

に示されるアミノ酸配列を有し、

該軽鎖の枠組み領域は、GM607' CL抗体の軽鎖可変領域 (配列番号：8) に由来し、ここで、カバット2位のイソロイシンはバリンに交換されており、

該重鎖の枠組み領域は、ヒト 21 / 28' C L 抗体の重鎖可変領域（配列番号：10）に由来し、ここで、カバット 24 位のアラニンはグリシンに交換されており、カバット 48 位のメチオニンはイソロイシンに交換されており、カバット 69 位のイソロイシンはロイシンに交換されており、カバット 71 位のアルギニンはバリンに交換されており、カバット 73 位のスレオニンはイソロイシンに交換されている、方法。

【請求項 2】

前記試料が組織試料である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記試料が、炎症滲出物、血液、血清、および腸液からなる群より選ばれる体液を含む、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 4】

酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、化学発光アッセイ、ラジオイムノアッセイまたは免疫組織学の使用を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記ヒト化免疫グロブリンが軽鎖および重鎖を含んでなり、軽鎖が配列番号：21 の可変領域を含んでなり、重鎖が配列番号：19 の可変領域を含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンおよび試料中の $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを検出するためのインビトロ方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

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

30

【0003】

例えば、潰瘍性結腸炎やクローン病のような炎症性腸疾患（I B D）は、胃腸管の炎症を伴う衰弱性及び進行性の疾患でありうる。米国だけでも推定 200 万人の人々を冒している症状には、腹痛、痙攣、下痢および直腸出血などがある。I B D 治療には、抗炎症剤（コルチコステロイドおよびスルファサラジンなど）、免疫抑制剤（6-メルカプトプリン、シクロスポリンおよびアザチオプリンなど）および外科手術（結腸切除など）などが用いられている。ポドルスキー（Podolsky）、New Engl. J. Med., 325: 928-937 (1991) およびポドルスキー（Podolsky）、New Engl. J. Med., 325: 1008-1016 (1991)。

40

【0004】

ネズミモノクローナル抗体（m A b A c t - 1）のようなヒト $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する抗体は、粘膜リンパ節の高内皮性小静脈に存在する粘膜アドレシン細胞接着分子-1（M A d C A M - 1）への $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン結合を妨害する。A c t - 1 は、ラザロビッツ(Lazarovits, A. I.) ら、J. Immunol. 133: 1857-1862 (1984) により、ヒト破傷風毒素特異的 T リンパ球で免疫したマウスから最初に単離され、マウス I g G 1 / κ

50

抗体であると報告された。シュバイクホフナー(Schweighoffer, T.)ら、J. Immunol. 151: 717-729 (1993) による該抗体のさらに最近の分析により、該抗体は $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを選択的に発現するヒトCD4+記憶Tリンパ球のある種のサブセットに結合できることが示唆された。しかしながら、ヒトにおける治療上の適用にネズミ抗体を使用することに関する重大な問題は、それらはヒトにおいて高い免疫原性があり、患者におけるマウス抗体の効力を低下させ、持続投与を妨げうるヒト抗ネズミ抗体応答(HAMA)を迅速に誘導することである。HAMA応答は、マウス抗体の迅速なクリアランスを生じ、いかなる治療の恩恵をも厳密に制限してしまう。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0005】

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

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の要旨は、

〔1〕ヒト化免疫グロブリンが $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに特異的に結合するのに適した条件下で試料をヒト化免疫グロブリンと接触させる工程、および形成された抗体- $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン複合体を検出する工程を含んでなる試料中の $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを検出するためのインビトロ方法であって、該ヒト化免疫グロブリンは、非ヒト起源の軽鎖可変領域の3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)の少なくとも1つおよびヒト起源の軽鎖可変領域に由来する枠組み領域ならびに非ヒト起源の重鎖可変領域の3つの相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)の少なくとも1つおよびヒト起源の重鎖可変領域に由来する枠組み領域を含む抗原結合領域を含んでなり、該相補性決定領域が以下：

20

軽鎖： CDR1 配列番号：12のアミノ酸44-59

CDR2 配列番号：12のアミノ酸75-81

CDR3 配列番号：12のアミノ酸114-122

重鎖： CDR1 配列番号：15のアミノ酸50-54

CDR2 配列番号：15のアミノ酸69-85

CDR3 配列番号：15のアミノ酸118-129

30

に示されるアミノ酸配列を有する、方法、

〔2〕前記試料が組織試料である、〔1〕記載の方法、

〔3〕前記試料が、炎症滲出物、血液、血清、および腸液からなる群より選ばれる体液を含む、〔1〕記載の方法、

〔4〕酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、化学発光アッセイ、ラジオイムノアッセイまたは免疫組織学の使用を含む、〔1〕記載の方法、

〔5〕前記ヒト化免疫グロブリンが軽鎖および重鎖を含んでなり、軽鎖が配列番号：21の可変領域を含んでなり、重鎖が配列番号：19の可変領域を含んでなる、〔1〕記載の方法

に関する。

40

【0007】

発明の要約

本発明は、免疫グロブリンが非ヒト起源(例えば、齧歯類)の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部(例えば、ヒト枠組み領域、ガンマ型のヒト定常領域)を含有する、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関する。1つの態様において、本明細書に記載されるヒト化免疫グロブリンは、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンへの結合に関して、ネズミAct-1またはLDP-02(実施例4等を参照のこと)と競合することができる。好ましい態様において、ヒト化免疫グロブリンの抗原結合領域は、Act-1モノクローナル抗体に由来する(例えば、LDP-02、図11(配列番号：19)および図12(配列番号：21)それぞれに示された軽鎖お

50

よび重鎖の可変領域を含有する免疫グロブリン)。

【0008】

例えば、ヒト化免疫グロブリンは、非ヒト起源の相補性決定領域(CDR)およびヒト枠組み領域に由来する枠組み領域(FR)を含む抗原結合領域を含有することができる。1つの側面において、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンは、 $\alpha 4 \beta 7$ を結合する非ヒト起源の抗体に由来するCDRおよびヒト起源(例えば、GM607'CL)の軽鎖に由来するFRを含む軽鎖、ならびに $\alpha 4 \beta 7$ を結合する非ヒト起源の抗体に由来するCDRおよびヒト起源(例えば、21/28'CL)の重鎖に由来するFRを含む重鎖を含有する。別の側面において、軽鎖は、A c t - 1抗体の軽鎖に由来する3つのCDRを含有し、重鎖は、A c t - 1抗体の重鎖に由来する3つのC

10

【0009】

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

20

【0010】

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

30

【0011】

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

40

【0012】

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

【0013】

また、本発明は、本発明の宿主細胞をヒト化免疫グロブリンの発現に適した条件下で維

50

持し、それにより1または複数のヒト化免疫グロブリン鎖を発現させ、ヒト化免疫グロブリンを産生する工程を含むヒト化免疫グロブリンの調製方法を提供する。該方法は、ヒト化免疫グロブリンの単離工程をさらに含むことが可能である。

【0014】

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

【0015】

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

【0016】

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

【発明の効果】

【0017】

本発明は、炎症性腸疾患に対する改良された治療アプローチを提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

発明の詳細な説明

本発明は、非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部を含有する、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンに関する。ヒト化免疫グロブリンは、少なくとも約 10^7 M^{-1} のアフィニティーで $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合しうることが好ましく、好ましくは少なくとも約 10^8 M^{-1} 、さらに好ましくは少なくとも約 10^9 M^{-1} である。1つの態様において、ヒト化免疫グロブリンは、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合する非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト定常領域に由来する定常領域を含む。別の態様において、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合するヒト化免疫グロブリンは、非ヒト起源の相補性決定領域およびヒト起源の可変枠組み領域、ならびに任意にヒト起源の定常領域を含有する。例えば、ヒト化免疫グロブリンは、軽鎖が $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合する非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域およびヒト起源の軽鎖に由来する枠組み領域を含み、重鎖が $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合する非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域およびヒト起源の重鎖に由来する枠組み領域を含む、重鎖ならびに軽鎖を含有しうる。

【0019】

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

【0020】

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

10

【0021】

ヒト免疫グロブリンは、重鎖のアイソタイプによりクラスおよびサブクラスに分けることができる。クラスは、重鎖がそれぞれ、ガンマ（ γ ）、ミュー（ μ ）、アルファ（ α ）、デルタ（ δ ）またはイプシロン（ ϵ ）型のものであるIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを含む。サブクラスは、重鎖がそれぞれ、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 型のものであるIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2を含む。選択されたクラスまたはサブクラスのヒト免疫グロブリン分子は、カッパ（ κ ）またはラムダ（ λ ）軽鎖のいずれかを含んでもよい。例えば、Cellular and Molecular Immunology、ウォンジューヴィクス(Wonsiewicz, M. J.) 編、45章、41-50 頁、W. B. Saunders Co、フィラデルフィア、PA (1991)；ニソノフ(Nisonoff, A.)、Introduction to Molecular Immunology、第2版、4章、45-65 頁、Sinauer Associates, Inc.、サンダーランド、MA (1984)を参照のこと。

20

【0022】

本明細書で用いる「免疫グロブリン」という用語は、抗体全体およびその生物学的に機能しうる断片を含むものである。かかる生物学的に機能しうる断片は、対応する全長の抗体の少なくとも1つの抗原結合機能（例えば、Act-1抗体の $\alpha 4 \beta 7$ に対する特異性）を保持し、好ましくは $\alpha 4 \beta 7$ とその1以上のリガンド（例えば、MAdCAM-1、フィブロネクチン）との相互作用を阻害する能力を保持する。特に好ましい態様において、生物学的に機能しうる断片は、 $\alpha 4 \beta 7$ の粘膜アドレシン（MAdCAM-1）への結合を阻害することができる。使用されうる生物学的に機能しうる抗体断片の例は、単鎖抗体、Fv、Fab、Fab'およびF(ab')₂断片等の $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに結合可能な断片を含む。かかる断片は、酵素的切断または組換え技術により生成することができる。例えば、パインまたはペプシン切断を用い、それぞれ、FabまたはF(ab')₂断片を作製することができる。また、1以上の停止コドン天然の停止部位の上流に導入した抗体遺伝子を用いて、種々の切断型の抗体も生成することができる。例えば、F(ab')₂断片の重鎖をコードするキメラ遺伝子は、重鎖のCH₁ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計することができる。

30

40

【0023】

本明細書で用いる「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、少なくとも一部分がヒト起源のものである、異なる起源の免疫グロブリンの部分を含む免疫グロブリンをいう。例えば、ヒト化抗体は、必要な特異性を有するマウス等の非ヒト起源の免疫グロブリンおよびヒト起源の免疫グロブリン配列に由来し（例えば、キメラ免疫グロブリン）、通常の技術により化学的に共に連結されるか遺伝子工学技術を用いて連続的なポリペプチドとして調製された（例えば、キメラ抗体のタンパク質部分をコードするDNAを発現させて連続的なポリペプチド鎖を生成することができる）部分を含有することができる。本発明のヒト化免疫グロブリンの別の例は、非ヒト起源の抗体に由来するCDRとヒト起源の軽鎖

50

および／または重鎖に由来する枠組み領域とを含有する免疫グロブリン（例えば、枠組み変化を有するまたは有さないCDRを接ぎ合わせた抗体）である。また、キメラまたはCDRを接ぎ合わせた単鎖抗体は、ヒト化免疫グロブリンという用語に含まれるものである。例えば、キャビリー(Cabilly)ら、米国特許第4,816,567号明細書；キャビリーら、欧州特許第0,125,023 B1号明細書；ボス(Boss)ら、米国特許第4,816,397号明細書；ボスら、欧州特許第0,120,694 B1号明細書；ニューバーガー(Neuberger, M. S.)ら、国際公開第86/01533号パンフレット；ニューバーガーら、欧州特許第0,194,276 B1号明細書；ウインター(Winter)、米国特許第5,225,539号明細書；ウインター、欧州特許第0,239,400 B1号明細書；パドラン(Padlan, E. A.)ら、欧州特許出願第0,519,596 A1号明細書を参照のこと。また、単鎖抗体に関しては、ラドナー(Ladner)ら、米国特許第4,946,778号明細書；ハストン(Huston)ら、米国特許第5,476,786号明細書；およびバード(Bird, R. E.)ら、Science, 242: 423-426 (1988))を参照のこと。

10

【0024】

ヒト化免疫グロブリンの抗原結合領域（非ヒト部分）は、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有する非ヒト起源の免疫グロブリン（ドナー免疫グロブリンと称する）に由来することができる。例えば、適する抗原結合領域は、ネズミAct-1モノクローナル抗体に由来することができる（ラザロビッツ (Lazarovits, A. I.)ら、J. Immunol., 133(4): 1857-1862 (1984))；例えば、実施例1～3を参照のこと）。他の供給源は、齧歯類（マウス、ラット等）、ウサギ、ブタ、ヤギまたは非ヒト霊長類（サル等）のような非ヒト供給源から得られた $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン特異的抗体を含む。Act-1抗体と同一または類似のエピトープに結合する抗体のような他のポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作製することができる（例えば、コーラーら、Nature, 256: 495-497 (1975)；ハーローら、1988、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, NY)；およびCurrent Protocols in Molecular Biology, 第2巻、（補遺27、94年夏）、アウスベルら編、(John Wiley & Sons: New York, NY)、第11章 (1991))。

20

【0025】

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

30

【0026】

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

40

【0027】

50

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

【0028】

もし存在するならば、ヒト枠組み領域（例えば、軽鎖可変領域のもの）は、抗原結合領域ドナーの類似体または均等の領域（例えば、軽鎖可変領域）に配列類似性を有するヒト抗体可変領域に由来することが好ましい。ヒト化免疫グロブリンのヒト起源の部分に関する枠組み領域の他の供給源は、ヒト可変コンセンサス配列を含む（例えば、実施例 2 を参照のこと；ケトルボロー(Kettleborough, C. A.)ら、Protein Engineering 4: 773-783 (1991)；カーター(Carter)ら、国際公開第 94/04679 号パンフレット、1994 年 3 月 3 日発行も参照のこと）。例えば、非ヒト部分を得るために用いた抗体または可変領域の配列は、カバットら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第 5 版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991)に記載のヒト配列と比較することができる。特に好ましい態様において、ヒト化免疫グロブリン鎖の枠組み領域は、非ヒトドナー（例えば、マウス A c t - 1 抗体）の可変領域と少なくとも全体の約 65% の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも全体の約 70% の配列同一性を有するヒト可変領域に由来する。また、ヒト部分は、非ヒトドナーの均等な部分（例えば、F R）と比較したとき、用いた特定の部分（例えば、F R）内で、少なくとも約 65% の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも約 70% の配列同一性を有するヒト抗体に由来することもできる。例えば、実施例 2 に記載されるように、マウス A c t - 1 およびヒト G M 6 0 7 ' C L 軽鎖可変領域間の全体の配列同一性は、71.4% であり、マウス A c t - 1 およびヒト 2 1 / 2 8 ' C L 重鎖可変領域間の全体の配列同一性は、68.1% であった。

【0029】

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

【0030】

本発明に用いられる非ヒト起源およびヒト起源の免疫グロブリン部分は、それらが由来する免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン部分またはそれらの変異体と同一の配列を有する。かかる変異体は、1 以上の残基の付加、欠失または置換により異なる突然変異体を含む。前に示したように、非ヒト起源の C D R は、非ヒトドナーにおいて実質的に同じであり、好ましくは非ヒトドナーの C D R と同一である。実施例 2 に記載されるように、ヒト起源の枠組み領域の残基をドナーの対応する部分由来の残基と置換するもの等の枠組み領域における変化をなすことができる。1 以上のアミノ酸の欠失、挿入および置換を含む枠組み領域における 1 以上の突然変異をなすことができる。いくつかのかかる置換は、実施例 2 においてヒト化 A c t - 1 抗体の設計に記載されている。選択されたヒト化抗体または鎖に関して、枠組み突然変異を本明細書に記載のように設計することができる。好ましくは、ヒト化免疫グロブリンは、非ヒトドナーのものと類似かまたはよりよいアフィニ

ティーで、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合することができる。変異体は、非ヒトドナーまたはアクセプターのヒト鎖の突然変異導入を含む種々の適当な方法で生成することができる。

【0031】

本発明のヒト化免疫グロブリンは、ヒト $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有し、ヘテロダイマーの $\alpha 4$ および／または $\beta 7$ 鎖の決定基を結合可能な（断片を含む）ヒト化免疫グロブリンを含む。好ましい態様において、本発明のヒト化免疫グロブリンは、結合機能（例えば、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する特異性を有する、同一または類似のエピトープ特異性を有する）および／または阻害機能（例えば、イン・ビトロおよび／またはイン・ビボでMAdCAM-1に結合する $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを阻害する能力、または $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを産生する細胞のそのリガンド（例えば、MAdCAM-1を産生する細胞）への結合を阻害する能力のようなイン・ビトロおよび／またはイン・ビボで $\alpha 4 \beta 7$ 依存性接着を阻害する能力）のようなネズミAct-1抗体の少なくとも1つの機能特性を有する。したがって、好ましいヒト化免疫グロブリンは、ネズミAct-1抗体の結合特異性、ネズミAct-1抗体のエピトープ特異性（例えば、 $\alpha 4 \beta 7$ （例えば、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン産生細胞上）への結合に関して、ネズミAct-1、キメラAct-1抗体（例えば、実施例1を参照のこと）またはヒト化Act-1（例えば、LDP-02）と競合できる）および／または阻害機能を有することができる。

10

【0032】

$\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの結合機能は、例えば、ヒト化免疫グロブリンと $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン（例えば、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを含有する膜画分、ヒトリンパ球（例えば、CD4+ $\alpha 4^{\text{hi}}$, $\beta 1^{\text{lo}}$ サブセットのリンパ球）、ヒトリンパ球細胞株、または $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを発現する $\alpha 4$ および／または $\beta 7$ をコードする核酸を含有する組換え宿主細胞）のような $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを産生する細胞上で）との間の複合体の形成をモニターするアッセイを用いる標準的な免疫学的方法により検出することができる。

20

【0033】

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

30

【0034】

本発明に用いられる非ヒトおよびヒト起源の免疫グロブリン部分は、軽鎖、重鎖ならびに軽鎖および重鎖の一部を含む。これらの免疫グロブリン部分は、免疫グロブリンから（例えば、ある部分のドゥノボの合成により）得ることができるし、免疫グロブリンに由来することができる、または、免疫グロブリンまたは所望の性質（例えば、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合する、配列類似性）を有するその鎖をコードする核酸を生成して発現することができる。ヒトおよび非ヒト起源の所望の部分（例えば、抗原結合領域、CDR、FR、C領域）を含有するヒト化免疫グロブリンは、所望のヒト化鎖をコードする遺伝子（例えば、cDNA）を調製するための合成および／または組換え核酸を用いて生成することができる。鎖の一部を調製するためには、1以上の停止コドン在所望の位置に導入することができる。例えば、新規に設計したヒト化可変領域をコードする核酸（例えば、DNA）配列は、存在するDNA配列を変化させるためのPCR突然変異導入方法を用いて構築することができる（例えば、カマン(Kamman, M.)ら、Nucl. Acids Res. 17: 5404 (1989)を参照のこと）。新規CDRをコードするPCRプライマーは、同一または非常に類似したヒト可変領域に基づいて前もってヒト化した可変領域のDNA鋳型にハイブリダイズすることができる（サトー(Sato, K.)ら、Cancer Research 53: 851-856 (1993)）。類似のDNA配列が鋳型として利用できないならば、可変領域配列をコードする配列を含有する核酸を合成オリゴヌクレオチドから構築することができる（例えば、コルビンガー(Kolbing

40

50

er, F.)、Protein Engineering 8: 971-980 (1993))。また、シグナルペプチドをコードする配列を核酸に組み込む(例えば、合成で、ベクターへの挿入により)こともできる。天然のシグナルペプチド配列を利用できないならば、他の抗体由来のシグナルペプチド配列を用いることができる(例えば、ケトルボロー(Kettleborough, C. A.)ら、Protein Engineering 4: 773-783 (1991)を参照のこと)。これらの方法、本明細書に記載された方法または他の好適な方法を用いて、変異体を容易に生成することができる(例えば、実施例5を参照のこと)。1つの態様において、クローニングした可変領域(例えば、L D P-02のもの)は、突然変異を導入することができ、所望の特異性を有する変異体をコードする配列を(例えば、ファージライブラリーから;例えば、クレバー(Krebber)ら、米国特許第5,514,548号明細書;フーゲンブーム(Hoogenboom)ら、国際公開第93/06213号パンフレット、1993年4月1日公開)選択することができる。

10

【0035】

核酸および該核酸を含有する構築物

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

【0036】

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

20

【0037】

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

30

【0038】

また、本発明は、より具体的にはヒト化A c t-1免疫グロブリン(即ち、非ヒト部分がネズミA c t-1モノクローナル抗体に由来する本発明のヒト化免疫グロブリン)またはその鎖をコードするヌクレオチド配列を含有する単離されたおよび/または組換え核酸に関する。1つの態様において、軽鎖は、A c t-1抗体の軽鎖に由来する3つの相補性決定領域を含有し、重鎖は、A c t-1抗体の重鎖に由来する3つの相補性決定領域を含有する。かかる核酸は、例えば、(a)ヒト化A c t-1免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列(例えば、図11の重鎖可変領域(配列番号:19)、図9の重鎖可変領域(配列番号:15))を含むポリペプチドをコードする配列を含有する核酸、(b)ヒト化A c t-1免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列(例えば、図12の軽鎖可変領域(配列番号:21)、図7の軽鎖可変領域(配列番号:12))を含むポリペプチドをコードする配列を含有する核酸、(c)ヒト化A c t-1免疫グロブリンの軽鎖または重鎖可変領域の少なくとも機能性部分(例えば、前記鎖を含有するヒト化免疫グロブリンの抗原結合に十分な部分)をコードする配列を含有する核酸、を含む。遺伝コードの縮重性により、選択されたポリペプチドをコードする種々の核酸を作製することができる。1つの態様において、核酸は、二本鎖または一本鎖のポリヌクレオチドを含む、前記もしくはは実質的に前記図11(配列番号:18)、または前記もしくはは実質的に前記図12(配列番号:20)の可変領域のヌクレオチド配列を含有する。(種々の図面が可変領域よりも大きいポリペプチド(即ち、シグナルペプチドコーディング配列または定常領域コー

40

50

ディング配列の一部を含む)を図示してもよいが、特定の図面の可変領域への参照は、示された配列の可変領域の部分を含むことを意味する。)これらの基準に適合する単離されたおよび／または組換え核酸は、前記したヒト化A c t - 1抗体またはその変異体の配列と同一の配列をコードする核酸を含有することができる。

【0039】

本発明の核酸は、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの生成に使用することができる。例えば、本発明のヒト化免疫グロブリンをコードする核酸(例えば、DNA)を、さらなる配列の操作または適当な宿主細胞におけるコード化ポリペプチドの生成のために、適当な構築物(例えば、ベクター)に組み込むことができる。

【0040】

$\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する特異性を有するヒト化免疫グロブリンの製造方法

本発明の別の側面は、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの調製方法に関する。例えば、ヒト化免疫グロブリンは、例えば、適当な宿主細胞での $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンをコードする1以上の組換え核酸の発現により得ることができる。

【0041】

また、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの発現に適する構築物または発現ベクターも提供される。構築物は、適当な宿主細胞に導入することができる、本発明のヒト化免疫グロブリンを発現する細胞を製造して培養で維持することができる。好適な宿主細胞は、大腸菌、枯草菌(B. スプチリス)およびまたは他の適当な細菌等の細菌細胞を含む原核細胞、真核細胞、例えばカビ細胞や酵母細胞(例えば、ピチア パストリス、アスペルギルス スピーシーズ、サッカロミセス セレビジエ、シゾサッカロミセス ポンベ、ニューロスポラ クラッサ)または他の下等真核細胞、ならびに昆虫由来の細胞(例えば、S f 9昆虫細胞(国際公開第94/26087号パンフレット、オコンノー(O'Connor)、1994年11月24日公開)または哺乳動物由来の細胞(例えば、C O S細胞、N S O細胞、S P 2/0、チャイニーズハムスター卵巣細胞(C H O)、H u T 7 8細胞、293細胞)等の高等真核細胞を挙げることができる(例えば、アウスベル(Ausubel, F. M.)ら編、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., (1993)を参照のこと)。

【0042】

$\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンを産生する宿主細胞は、以下のように製造できる。例えば、所望のヒト化免疫グロブリンのコーディング配列の全部または一部をコードする核酸を、核酸ベクター、例えばプラスミド、ウイルスまたは他の適当な発現用レプリコン等のDNAベクターに挿入することができる。種々のベクターを利用することができ、それらには単一コピーもしくは多コピーで維持されるベクターまたは宿主細胞染色体に組込まれるベクターが含まれる。

【0043】

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

【0044】

プロモーターは、適当な宿主細胞での発現用に提供されうる。プロモーターは構成的であってもよいし、誘導性であってもよい。例えば、プロモーターがコードされているポリペプチドの発現を指示するように、ヒト化免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖をコードする核酸に操作可能に連結することができる。原核生物宿主に適した種々のプロモーター(例えば、大腸菌にはl a c、t a c、T 3、T 7プロモーター)および真核生物宿主

10

20

30

40

50

に適した種々のプロモーター（例えば、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH1）、SV40、CMV）を利用できる。

【0045】

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

【0046】

例えば、α4β7インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードする核酸（即ち、1以上の核酸）またはかかる1もしくは複数の核酸を含有する構築物（即ち、1以上の構築物）は、1もしくは複数の核酸が1以上の発現制御エレメントに操作可能に（例えば、ベクター中で、細胞中でプロセッシングにより生成された構築物中で、宿主細胞ゲノムに組み込まれて）結合されるように、選択した宿主細胞に適した方法（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）で適当な宿主細胞に導入することができる。宿主細胞は、発現に適した条件下で（例えば、誘導剤、適切な塩類、成長因子、抗生物質、栄養補給物等を補足した好適な培地の存在下で）維持され、それによりコードされている1もしくは複数のポリペプチドを生成することができる。所望ならば、コードされた蛋白質（例えば、ヒト化Act-1抗体）は、（例えば、宿主細胞、培地、ミルク）から単離できる。この過程は、トランスジェニック動物の宿主細胞での発現を包含する（例えば、国際公開第92/03918号パンフレット、ゲンファーム インターナショナル、1992年3月19日公開を参照のこと）。

【0047】

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

【0048】

治療法と組成物

本発明は、（1）α4β7インテグリンをイン・ビトロおよび／またはイン・ビボで結合でき；および／または、（2）α4β7インテグリンの活性または機能、例えば、（a）結合機能（例えば、α4β7インテグリンのMA-dCAM-1、フィブロネクチンおよび／またはVCAM-1に結合する能力）および／または（b）組織における白血球の補給および／または蓄積を含む白血球浸潤機能（例えば、腸粘膜組織へのリンパ球移動を阻

害する能力)を調節することができるヒト化免疫グロブリンを提供する。好ましくは、ヒト化免疫グロブリンは、イン・ビトロおよび／またはイン・ビボで選択的に $\alpha 4 \beta 7$ を結合し、 $\alpha 4 \beta 7$ 媒介相互作用を阻害することが可能である。1つの態様において、ヒト化免疫グロブリンは、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合し、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンの1以上のそのリガンド(例えば、MAdCAM-1、VCAM-1、フィブロネクチン)への結合を阻害することができ、それにより(組織における白血球の補給および／または蓄積を含む)組織の白血球浸潤を好ましくは選択的に阻害する。かかるヒト化免疫グロブリンは、腸関連組織、リンパ節器官または白血球(特にT細胞またはB細胞のようなリンパ球)を含む粘膜組織で、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを産生する細胞の血管内皮細胞への細胞接着をイン・ビトロおよび／またはイン・ビボで阻害することができる。特に好ましい態様において、ヒト化免疫グロブリン(例えば、Act-1)は、 $\alpha 4 \beta 7$ のMAdCAM-1および／またはフィブロネクチンとの相互作用を阻害することができる。

10

【0049】

本発明のヒト化免疫グロブリンは、研究、診断および治療法における適用を有する様々な過程で有用である。例えば、それらは、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンまたはその変異体を(例えば、アフィニティー精製または他の好適な方法により)検出、単離および／または精製するため、ならびに $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン構造(例えば、コンフォメーション)および機能を研究するために用いることができる。

【0050】

また、本発明のヒト化免疫グロブリンは、診断適用(例えば、イン・ビトロ、エクス・ビボ)または治療(予防を含む)適用における $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン機能の調節にも使用されうる。

20

【0051】

例えば、本発明のヒト化免疫グロブリンは、試料(例えば、炎症滲出物、血液、血清、腸液、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを産生する細胞上などの組織または体液)中の $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンのレベルを検出および／または測定するために使用することができる。例えば、試料(例えば、組織および／または体液)は、個体から得ることが可能であり、化学発光アッセイ、ラジオイムノアッセイおよび免疫組織学を含む酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)等の方法を含む適当な免疫学的方法を用いて、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン発現を検出および／または測定することができる。1つの態様において、ヒト化免疫グロブリンの $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンへの特異的結合に適した条件下で、試料を本発明のヒト化免疫グロブリンと接触させる工程および形成された抗体- $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン複合体を検出する工程を含む、試料中の選択された $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンの検出方法が提供される。当該方法の適用において、ヒト化免疫グロブリンは、正常組織と炎症組織(例えば、ヒト由来)との $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン反応性および／または発現について(例えば、免疫組織学的に)分析し、IBDまたは他の状態と $\alpha 4 \beta 7$ の発現増加(例えば、冒された組織において)との関連を検出するために用いることができる。本発明のヒト化免疫グロブリンは、正常組織と炎症組織とで $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンの存在の免疫学的評価方法を可能にし、それを通じて、疾患の存在、疾患の進行および／または抗 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン療法の炎症性疾患における効力を評価できる。

30

40

【0052】

また、本発明のヒト化免疫グロブリンは、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンの結合機能および／または白血球(例えば、リンパ球、単球)浸潤機能を調節するために用いられうる。例えば、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンのリガンド(即ち、1以上のリガンド)への結合を阻害するヒト化免疫グロブリンは、組織、特にMAdCAM分子を発現する組織の白血球(例えば、リンパ球、単球)浸潤(組織における白血球の補給および／または蓄積を含む)に関連した疾患の治療における方法に従って投与することができる。本発明のヒト化免疫グロブリン(即ち、1以上)の有効量を、かかる疾患を治療するために個体(例えば、ヒトまたは他の霊長類のような哺乳動物)に投与する。例えば、胃腸管(腸関連内皮を含む)、他の粘膜組織、またはMAdCAM分子を発現する組織(例えば、小腸および大腸の固有層の細

50

静脈のような腸関連組織；ならびに乳腺（例えば、泌乳性乳腺）の白血球浸潤に関連する疾患を含む炎症性疾患は、本発明の方法に従って治療することができる。同様に、MAdCAM分子を発現する細胞（例えば、内皮細胞）への白血球の結合の結果としての組織の白血球浸潤に関連した疾患を有する個体を、本発明の方法に従って治療することができる。

【0053】

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

10

【0054】

膵炎とインシュリン依存性真性糖尿病は、本発明の方法を用いて治療できるその他の病気である。MAdCAM-1は、NOD（非肥満糖尿病）マウスならびにBALB/cマウスおよびSJLマウスの外分泌膵臓のいくつかの血管によって発現されると報告されている。MAdCAM-1の発現は、NODマウスの膵臓の炎症を起こした島の内皮上で誘導されると報告されており、MAdCAM-1は、インスリン炎の初期段階にNOD島内皮によって発現される主要アドレシンであった（ハンニネン(Hanninen, A.)ら, J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993))。さらに、島内には $\alpha 4 \beta 7$ を発現するリンパ球の蓄積が観察され、MAdCAM-1は、炎症を起こした島由来の血管への $\alpha 4 \beta 7$ を介したリンパ腫細胞の結合に関与していた（ハンニネンら, J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993))。

20

【0055】

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

【0056】

ヒト化免疫グロブリンは、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンのそのリガンドへの結合を阻害する有効量で投与される。治療の場合、有効量とは、所望の治療（予防を含む）効果を達成するに足る量（例えば、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンが介在する結合および／またはシグナル伝達を軽減または妨げ、そうすることによって、白血球の接着および浸潤および／または関連する細胞応答を阻害するに足る量）になるだろう。ヒト化免疫グロブリンは、1回量または多数回量で投与することができる。用量は、当該技術分野で公知の方法によって決定でき、例えば患者の年齢、感受性、耐性および総合的健康状態などに依存することができる。抗体の好適な用量としては、1処置あたり約0.1～約10.0mg/kg体重であることができる。

30

【0057】

本発明の方法に従って、ヒト化免疫グロブリンは、単独でまたは別の薬剤と組み合わせて個体（例えばヒト）に投与できる。ヒト化免疫グロブリンは、その助剤投与の前、助剤投与と同時にまたは助剤投与後に投与できる。1つの態様において、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンのそのリガンドへの結合を阻害する1を越えるヒト化免疫グロブリンを投与する。別の態様において、内皮リガンドへの白血球の結合を阻害するモノクローナル抗体、例えば、抗MAdCAM-1、抗VCAM-1または抗ICAM-1抗体を、本発明のヒト化免疫グロブリンに追加して投与する。さらに別の態様において、追加の薬学的に活性な成分（例えば、スルファサラジン、他の非ステロイド系抗炎症性化合物またはステロイド系抗炎症性化合物のような抗炎症性化合物）を、本発明のヒト化免疫グロブリンと組み合わせて投与することができる。

40

【0058】

50

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

【0059】

処方は、選択した投与経路に応じて変化するだろう（例えば液剤、乳剤）。投与対象のヒト化免疫グロブリンを含有する適当な組成物を、生理学的に許容されうる賦形剤または担体中で調製することができる。液剤や乳剤の場合は、適当な担体には、例えば塩水や緩衝媒体を含む水溶液、アルコール／水溶液、乳液または懸濁液が含まれる。非経口用の賦形剤には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、乳酸化リンゲルまたは不揮発性油が含まれうる。静脈内用の賦形剤には、種々の添加物、保存剤、または液体、栄養または電解物質補充剤が含まれうる（一般的には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版、Mack Publishing Co., PA, 1985 を参照のこと）。吸入法の場合は、化合物を可溶化し、適当な投与用ディスペンサー（例えば、アトマイザー、ネブライザーまたは加圧エアロゾルディスペンサー）に充填することができる。

【実施例】

【0060】

実施例

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

【0061】

実施例1に記載されるように、ネズミA c t - 1 抗体を精製し、該抗体の配列分析を行った。マウスA c t - 1 抗体の軽鎖および重鎖可変領域をコードするc D N AをP C R クローニングし、シーケンスした。また、A c t - 1 カップ軽鎖可変領域（V_L）のアミノ酸配列は、蛋白質のシーケンスにより決定し、V_L 遺伝子のD N A配列に由来したアミノ酸配列と正確に適合することがわかった。重鎖可変領域（V_H）のアミノ酸配列の大部分は、蛋白質のシーケンスにより決定され、この配列もV_H 遺伝子のD N A配列から推定されるアミノ酸と適合する。これらの結果により、ハイブリドーマ細胞株から正しいマウスA c t - 1 可変領域がクローニングされたことが示される。正しい配列がクローニングされたことを確認した機能的なキメラA c t - 1 抗体が生成された。特に、マウスA c t - 1 軽鎖および重鎖可変領域をコードするD N Aを、ヒトカップ軽鎖およびヒトガンマー1もしくはガンマー4重鎖定常領域それぞれに結合させた。また、キメラ抗体を、ヒト化A c t - 1 m A b（再形成A c t - 1 m A b L D P - 0 2）との比較分析に用いた。

【0062】

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

【0063】

実施例3に記載されるように、これらの再形成ヒトA c t - 1 可変領域をコードするD N A配列を構築し、ヒト定常領域をコードするD N A配列に結合させ、得られた核酸を用いてヒト化A c t - 1 免疫グロブリンを生成させた。ヒト化A c t - 1 抗体を、哺乳動物細胞で発現させ（実施例3）、マウスA c t - 1 抗体と比較してヒト $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンへの結合を試験した（実施例4）。表5に示すように、ヒト化A c t - 1 抗体は、ネズ

ミ A c t - 1 により認識されるエピトープに対する特異性を保持し、天然のネズミ抗体と比較して予期しない改良された結合アフィニティーを示した。

【0064】

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

10

【0065】

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

A c t - 1 V_H および V_L 領域のクローニング

R N A は、製造業者の示したプロトコールに従って T R I z o l 試薬（Gibco/BRL）を用いて、A c t - 1 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞から得た（ラザロビッツら、J. Immunol. 133(4): 1857-1862 (1984); ラザロビッツとコルビン(R. B. Colvin)により供与された）。

【0066】

転写された重鎖および軽鎖可変領域は、製造業者の示したプロトコールに従って I g - P r i m e キット（Novagen）を用いるポリメラーゼ連鎖反応（P C R）により増幅した。要約すると、1. 5 μ g の全 R N A を、2. 0 μ l の 5 X M M L V 緩衝液（5 X = 2 5 0 m M T r i s - H C l、2 5 ° C で p H 8. 3、3 7 5 m M K C l、1 5 m M M g C l₂）、1. 0 μ l の 1 0 0 m M D T T（ジチオスレイトール）、0. 5 μ l の 1 0 m M d N T P 混合物（各 1 0 m M の d A T P、d C T P、d T T P、d G T P）、0. 5 μ l のオリゴ d T（1 μ g / μ l）、0. 2 5 μ l のアセチル化 B S A（4 m g / m l）、1. 0 μ l の適当な I g - 3' プライマー（1 0 p m o l / μ l）、0. 5 μ l の M M L V 逆転写酵素（2 0 0 ユニット / μ l）および 1 0 μ l の全容量まで添加した R N A ーゼ不含有水を含む反応で、c D N A に逆転写した。混合物を 3 7 ° C で 5 分間、4 2 ° C で 3 0 分間および 9 9 ° C で 5 分間インキュベートした。各 I g - 3' プライマーを別々の反

20

30

【0067】

可変領域は、製造業者のプロトコールに従って、逆転写した材料から増幅した。要約すると、8 μ l の逆転写した材料を、4 μ l の 2. 5 m M d N T P、5 μ l の 1 0 X 反応緩衝液（1 0 X = 1 0 0 m M T r i s - H C l、2 5 ° C で p H 8. 8、5 0 0 m M K C l、1 5 m M M g C l₂、1 % T r i t o n X - 1 0 0）、2. 5 μ l の I g - 5' リーダープライマー（1 0 p m o l / μ l）（各 I g - 5' プライマーを別々の P C R 反応に用いた）、0. 2 5 μ l（1. 2 5 ユニット）の A m p l i T a q ・ D N A ポリメラーゼ(Perkin-Elmer)および 5 0 μ l の全容量までの水と混合した。

【0068】

5' プライマー M u I g V_H 5' - A、M u I g V_H 5' - B、M u I g κ V_L 5' - A および M u I g κ V_L 5' - B との増幅に関して、サイクルパラメーターは、1 分、9 4 ° C；1 分、5 0 ° C；2 分、7 2 ° C の 3 5 サイクル後 7 2 ° C で最後の 6 分の伸長であった。アニーリング温度を 6 0 ° C に上げたことを除いて、他のすべての 5' プライマーについて同じ反応条件を用いた。

40

【0069】

重鎖可変領域は、3' プライマーとして M u I g G V_H 3' - 2 または M u I g M V_H 3' - 1 のいずれか、および 5' プライマーとして M u I g V_H 5' - B または M u I g V_H 5' - E のいずれかを用いて増幅が成功した。軽鎖可変領域は、3' プライマーとして M u I g κ V_L 3' - 1 および 5' プライマーとして M u I g κ V_L 5' - G を用いて

50

増幅が成功した。

【0070】

これらのプライマーの配列は、以下のようであった：

MuI g G V_H 3' - 2 (配列番号：56)：

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

MuI g M V_H 3' - 1 (配列番号：57)：

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

MuI g V_H 5' - B (配列番号：58)：

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

MuI g V_H 5' - E (配列番号：59)：

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

MuI g κ V_L 3' - 1 (配列番号：60)：

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

MuI g κ V_L 5' - G (配列番号：61)：

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

【0071】

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

【0072】

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

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

キメラ重鎖遺伝子の構築

キメラマウス-ヒト重鎖遺伝子をコードする遺伝子を作製した。ヒト重鎖定常領域の供給源は、野生型ヒトガンマ 1 (γ1) 定常領域を含むクローン (ヘルマン ウォルトマン (Herman Waldman) 博士 (オックスフォード大学) から得た) であり；構築物は、pEE6 発現ベクター (Celltech) 中にヒト化抗 CD18 重鎖遺伝子を含有する 3818 と称した。定常領域は、その教示がそのまま参照により本明細書に取り込まれる、シムズ (Sims, M. J.) ら、J. Immunol., 151(4): 2296-2308 (1993) および 1993 年 2 月 4 日に公開された国際公開第 93/02191 号パンフレットに記載のように pEE6-hCMV にクローニングされたヒト化 CD18 重鎖遺伝子の定常領域と一致する。ヒト化抗 CD18 抗体の重鎖可変領域および定常領域 (野生型ガンマ 1) をコードする配列は、HindIII

とEcoRIとの消化により発現ベクターから放出された。重鎖遺伝子を含む1,421bp断片を回収し、pCR-ScriptTM (Stratagene) のHindIII およびEcoRI部位にサブクロニングし、pCR-CD18Hと称するプラスミドを得た。SpeI制限部位は、抗CD18重鎖遺伝子の可変領域と定常領域との間のジャンクションに位置する。pCR-CD18HをHindIII とSpeIで消化して、重鎖可変領域を放出させた。この可変領域を、以下のように、縮重したマウスAct-1可変領域と置換した。

【0076】

新規な制限部位を取り込むために2つのプライマーを合成した。これらのプライマーは：

5'-プライマー（配列番号：41）：

【0077】

【化1】

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

【0078】

3'-プライマー（配列番号：42）：

【0079】

【化2】

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

【0080】

であった。太字の活字は、鋳型配列と異なるプライマー中のヌクレオチドを示す。図2に示したヌクレオチド配列（配列番号：3）およびアミノ酸配列（配列番号：4）を有するH2B#34と称する独立したマウスAct-1重鎖クローンを鋳型として、前記5'および3'プライマーとともに用いて、開始コドンの5'側HindIII部位とJ領域のちょうど3'側のSpeI部位を同時に導入するマウス可変領域を増幅させた。PCR断片をpCR-ScriptTMに直接サブクロニングしてプラスミドpCR-mACT1HVを生じさせ、正しい配列を確認した。次いで、HindIII とSpeIとの消化によりpCR-mACT1HVから断片を放出させて、抗CD18可変領域の代わりにpCR-CD18HのHindIII およびSpeI部位に挿入し、pCR-mhACT1Hchiを得た。次いで、HindIII とEcoRIでpCR-mhACT1Hchiからキメラ重鎖（マウスAct-1可変+ヒトガンマ1定常）遺伝子を放出させ、hCMVプロモーターを含有するpEE6hCMV-Bベクターに戻しクロニングし、pEE6mhACT1Hchiと称する構築物を得た。

【0081】

キメラ軽鎖遺伝子の構築

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

【0082】

可変領域に対するプライマーは：

5'-プライマー（配列番号：43）：

【0083】

【化3】

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

【0084】

3'-プライマー（配列番号：44）：

10

【0085】

【化4】

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

【0086】

であった。太字の活字は、鋳型中のヌクレオチドとは異なるプライマー中のヌクレオチドを示す。K a s I 部位を創出させるためのコーディング領域内の2個のヌクレオチドの変化、図3の423位でT→Gおよび426位でA→Gはサイレントであり、アミノ酸配列は変化しなかった。

20

【0087】

カップバ定常領域に対するプライマーは：

5'-プライマー（配列番号：45）：

【0088】

【化5】

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

【0089】

3'-プライマー（配列番号：46）：

30

【0090】

【化6】

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

【0091】

であった。

【0092】

軽鎖可変領域および定常領域を、それぞれの鋳型とプライマーを用いて別々に増幅し、PCR産物をpCR-ScriptTMに別々にサブクロニングして配列を確認した。次いで、各断片をHindIIIとKasIとの消化により該ベクターから放出させ、ゲルで精製して、HindIII消化によりヒト化抗CD18軽鎖遺伝子をすでに除去しておいた3819 pEE12発現ベクターのHindIII部位にトリプルライゲートした。得られた構築物をpEE12mhACT1Lchiと称する。

40

【0093】

キメラ免疫グロブリンの発現

キメラ重鎖および軽鎖遺伝子の両方を含む発現ベクターの構築のために、全重鎖遺伝子とCMVプロモーターを、BglIIとBamHIとの消化によりpEE6発現ベクター（pEE6mhACT1Hchi）から放出させた。次いで、この断片を、pEE12軽鎖遺伝子発現ベクター（pEE12mhACT1Lchi）のBamHI部位にライゲート

50

し、それぞれが別のCMVプロモーターの転写制御下にあるキメラ軽鎖遺伝子およびキメラ重鎖遺伝子を両方とも含むpEE12mHLHchiと称する1つのプラスミドが生成した。

【0094】

pEE6hCMV-BおよびpEE12発現ベクターならびにCelltech グルタミン シンセターゼ ジーン アンプリフィケーション システムは、以前に記載されている（例えば、その教示がそれぞれ、そのまま参照により本明細書に取り込まれる国際公開第86/05807号パンフレット（Celltech）、国際公開第87/04462号パンフレット（Celltech）、国際公開第89/01036号パンフレット（Celltech）、欧州特許第0 323 997 B1号明細書（Celltech）および国際公開第89/104 04号パンフレット（Celltech）を参照のこと）。

【0095】

キメラ抗体の一過性の発現のために、20 μ gのpEE12mHLHchiを、以下のようにエレクトロポレーションによりCOS-7細胞（アメリカンタイプカルチャーコレクション、パークローンドライブ12301、ロックビル、MD、20852）にトランスフェクトした。対数増殖期で生育しているCOS-7細胞を、トリプシン-EDTAでの処理により組織培養フラスコから採集した。該細胞をリン酸緩衝化塩水（PBS）で1回、ハンクのバランス塩溶液（HBSS）で1回洗浄し、1mlのHBSS当たり 1.5×10^7 個の細胞濃度で再懸濁させた。0.8mlのHBSS中 1.2×10^7 個の細胞を20 μ gのプラスミドDNAと混合し、室温で10分間インキュベートした。次いで、DNA/細胞混合物を0.4cmのエレクトロポレーションキュベットに移し、Bio-Rad Gene Pulserを用いて250V、960 μ Fで電流を適応した。エレクトロポレーション後室温で10分間のインキュベーション後、該細胞を20mlの培養培地（ダルベッコの改変イーグル培地（DMEM）+10% FCS）に移し、162cm²の組織培養フラスコ（Costar）で培養した。5日後、細胞培養上清を集め、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを発現するHuT78細胞を染色する能力を試験した。HuT78細胞（ヒトトリンプ腫細胞株）は、アメリカンタイプカルチャーコレクション、パークローンドライブ12301、ロックビル、MD、20852のアクセッション番号ATCC TIB 161から利用することができる。

【0096】

100 μ lの一過性にトランスフェクトしたCOS-7細胞培養上清、モックトランスフェクトしたCOS-7細胞上清、精製したネズミAct-1抗体（10 μ g/ml）またはそれぞれマウスに対する精製した無関係アイソタイプ適合対照抗体（マウスIgG1、カップ（MOPC21）、Sigma製の10 μ g/ml）およびヒトに対する精製した無関係アイソタイプ適合対照抗体（ヒトIgG1、カップ、Sigma製の10 μ g/ml）を、 1×10^5 個のHuT78細胞と氷上で30分間インキュベートした。該細胞を、2% ウシ胎仔血清（FCS）および0.01%アジ化ナトリウムを含むPBSからなる緩衝液（FACS緩衝液）を氷冷したもので2回洗浄した。次いで、該細胞を適切な蛍光二次抗体（フルオレッセイン（FITC）結合AffiniPure F(ab')₂断片ヤギ抗マウスIgG（H+L）（Jackson ImmunoResearch）またはフルオレッセイン（FITC）結合AffiniPure F(ab')₂断片ヤギ抗ヒトIgG（H+L）（Jackson ImmunoResearch）のいずれか）とともに氷上で30分間インキュベートした。氷上で30分後、該細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、300mlの同じ緩衝液に再懸濁し、Beckton Dickinson FACSscanでフローサイトメトリーにより分析した。図4Aは、マウスアイソタイプ適合無関係対照抗体、MOPC21（IgG1、カップ）と比較したネズミAct-1 mAbの染色を示す。図4Bは、ヒトアイソタイプ適合無関係対照抗体（IgG1、カップ）およびモックトランスフェクトしたCOS-7細胞上清と比較したHuT78細胞のキメラAct-1抗体の染色を示す。したがって、ネズミAct-1抗体により生じた染色と比較して、キメラ抗体は同様にHuT78細胞を染色した。まとめると、これらのデータは、マウスAct-1可変領域に関して適切な配列

をうまくクローン化し、かつ、発現したことを示す。

【0097】

アミノ酸配列分析

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

ネズミ A c t - 1 (5 m g / m l) を、窒素雰囲気下、0.3 M ホウ酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム中、37℃で2時間、2 m M D T T で還元した。次いで、該溶液をヨードアセトアミドで10 m M にし、室温で4時間インキュベートした。非変性条件下での S D S - P A G E 分析により、蛋白質が定量的に還元されていることを確認した。次いで、該蛋白質溶液を P B S で大量に透析し、アリコートを S u p e r d e x 75 カラム (16 / 60、Pharmacia) に適用した (操作1)。重鎖および軽鎖は、排除容量のそれに対応する溶出容量でこのカラムから共溶出し、このことは、2つの鎖がまだ共に保持されていることを示唆する。次いで、新たなアリコートを8 M 尿素処理し、変性条件下 (6 M 尿素) で s u p e r d e x 75 カラムにかけた (操作2)。両鎖は、おそらくフォールディングされないことにより、ボイドボリュームに再び共溶出した。S D S - P A G E 分析により、2つのゲル濾過操作から溶出された2つの試料に両鎖が存在することを確認した。これらの試料を、N末端配列分析 (Commonwealth Biotechnologies, Inc.) に供し、以下の結果を得た：

試料2：D V V V T Q T P L S L P V S F D G Q V (配列番号：47)

試料1：D V V V T Q T P L S L (配列番号：48)。

【0098】

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

【0099】

内部アミノ酸シーケンスを単純化するために、ペプシンでの切断により抗体から F (a b) ' ₂ 断片を生成させた。ネズミ A c t - 1 を、0.1 M クエン酸ナトリウム、p H 3.0 中、抗体：ペプシンが1：200の割合でペプシンにより37℃で2時間切断した。S D S - P A G E 分析で評価したように、反応は完全であった。次いで、蛋白質をプロテインGおよびプロテインAカラムを通して精製した。次いで、前記したように、試料を還元してアルキル化し、調製用 S D S - P A G E (15%) により重鎖断片を軽鎖断片から分離した。重鎖断片を切り出し、ランニング緩衝液を有する1 m l の0.1% S D S に2時間電気溶出させた。この試料を、2 n g の A s p - N エンドプロテイナーゼで30分間切断し、S D S - P A G E (17.5%) により断片を分離した。消化産物は、0.1 M

H e p e s p H 8.0、0.1% S D S に一晚受動溶出させ、N末端配列分析 (Commonwealth Biotechnologies, Inc.) に供した。

【0100】

17 K d a 断片から得られた配列は、D Y A I D Y W G (配列番号：49) であり、これは、重鎖のクローンに存在していた (図1；配列 A I D Y は J H 4 領域の開始部位に対応する)。

【0101】

実施例2 マウス A c t - 1 可変領域の分子モデル化

C D R を接ぎ合わせた可変領域の設計を補助するために、マウス A c t - 1 可変領域の分子モデルを作製した。よくキャラクタライズされた蛋白質ファミリーの構造を免疫グロブリンでモデル化することは、ホモロジーによるモデル化に関して確立された方法を用いて行なった。分子モデル化は、U N I X オペレーティングシステム、分子モデリングパッケージ Q U A N T A (Polygen Corp., Waltham, MA) および解明された蛋白質構造の B r o o k h a v e n 結晶学データベース下で稼働する S i l i c o n G r a p h i c s

I R I S 4 Dワークステーションを用いて行なった。第1工程として、新規可変領域の枠組み領域(FR)を、類似の構造的に解明された免疫グロブリン可変領域由来のFRでモデル化した。同一のアミノ酸側鎖は、それらの元の方向で保持されていたが、変異した側鎖は、元のマウスA c t - 1抗体と同様なカイ(c h i)アングルを維持するように最大重複法を用いて置換された。新規可変領域のCDRの大部分は、CDRに関する標準構造に基づいてモデル化された(ショチア(Chothia, C.)とレスク(A. M. Lesk)、J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987);ショチアら、Nature 342: 877-883 (1989);トラモンタノ(T ramontano, A.)ら、J. Mol. Biol. 215: 175-182 (1990);ショチアら、J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992))。公知の標準構造がない重鎖可変領域のCDR3のような場合、CDRループは、いかなる構造的に解明された蛋白質にも存在する類似のループ構造に基づいてモデル化した。最後に、好ましくない原子の接触を軽減し、ファンデルワールスおよび静電的相互作用を最適化させるために、該モデルをQ U A N T Aで実行したようなC H A R M mポテンシャル(ブルックス(Brooks, B. R.)、J. Comp. Chem. 4: 187-217 (1983))を用いるエネルギー極小化に供した。

【0102】

マウスA c t - 1可変領域に関して、軽鎖可変領域由来のFRは、マウスモノクローナル抗体4-4-20(ヘロン(Herron, J. N.)ら、Proteins. Structure, Function and Genetics 5: 271-280 (1989))のF a b断片由来のFRでモデル化した。重鎖可変領域由来のFRは、マウスモノクローナル抗体D 1 1 . 1 5(キターラ(Chitarra, V.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90: 7711-7715 (1993))のF a b断片由来のFRでモデル化した。マウスA c t - 1抗体とモデルの基礎となった可変領域との間で異なるこれらのアミノ酸側鎖を置換した。次いで、2つの異質可変領域(即ち、4-4-20に基づくカッパ軽鎖可変領域およびD 1 1 . 1 5に基づく重鎖可変領域)を互いの観点から正しい方向に置換するために、F a b 4-4-20抗体の軽鎖を、(カバット(Kabat, E. A.)ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991)により規定されたように)残基35~39、43~47、84~88および98~102の空間で整列させることによりD 1 1 . 1 5の軽鎖上に重ね合わせた。

【0103】

m A b A c t - 1の軽鎖可変領域のCDR1(L1)は、ショチアら、Nature 342: 877-883 (1989)により提唱されたように、L1標準サブグループ4に適合した。マウスF a b 4-4-20(前記参照のこと)のL1ループは、アミノ酸の長さが同一であり、アミノ酸配列が類似し、さらに標準サブグループ4にも適合した。その結果として、該L1ループは、F a b 4-4-20のL1ループでモデル化された。同様に、m A b A c t - 1の軽鎖可変領域のCDR2(L2)およびCDR3(L3)は、それぞれの標準サブグループ1ループ構造およびF a b 4-4-20の対応するCDRの両方に適合した。したがって、A c t - 1カッパ軽鎖可変領域のL2およびL3ループは、F a b 4-4-20のCDR L2およびL3でモデル化された。

【0104】

m A b A c t - 1の重鎖可変領域のCDR1(H1)は、マウス m A b D 1 1 . 1 5(前記を参照のこと)の対応するH1ループと同様に、ショチアら、Nature 342: 877-883 (1989)により規定されたように、H1標準サブグループ1に適合した。さらに、m A b D 1 1 . 1 5 CDR1ループは、m A b A c t - 1のH1と長さが同一であり、アミノ酸配列が非常に類似していた。その結果として、軽鎖と同様に、このループは、該モデルの基礎となった重鎖可変領域のCDR1ループでモデル化された。重鎖可変領域のCDR2(H2)を規定するのはより困難であったが、H2標準サブグループ2に対応するように思われた。また、D 1 1 . 1 5抗体のH2ループも同一の標準サブグループに適合し、アミノ酸配列が非常に類似していたので、m A b A c t - 1のH2ループは、D 1 1 . 1 5のH2ループでモデル化された。

【0105】

前記考察したように、重鎖可変領域のCDR3は、高度に変化しており、同定可能な構造グループに分類することができない。H3ループをモデル化するためには、同一の長さで類似のアミノ酸配列のループ好ましくは別の抗体由来が同定され、ループのモデル化の基礎として用いられる。ループサイズに関してA c t - 1のCDR3に適合する、3種の抗体由来のすべてがH3ループである3つのループが存在した。立体的不一致についてすべての3つのループ構造をモデルで試験した後、ヒト抗体P o t (ファン(Fan, Z. C.)ら、J. Mol. Biol. 228: 188-207 (1992))由来のH3ループが選ばれ、m A b A c t - 1のH3ループをモデル化した。自明な立体的不一致についてモデルの全体を調整した後、該モデルをQ U A N T Aで実行したように、エネルギー極小化に供した。

【0106】

CDR接合可変領域の設計

CDRを接ぎ合わせた可変領域の設計における第1工程は、ヒト化可変領域の基礎として役立つヒト軽鎖および重鎖可変領域の選択である。ヒト可変領域の選択に関する2つのアプローチを試験して比較した。1つのアプローチでは、ヒト可変領域をヒト可変領域の異なるサブグループに対するコンセンサス配列から選択した(カバット(Kabat, E. A.)ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991))。齧歯類軽鎖および重鎖可変領域を、ヒトコンセンサス配列と比較し、最も類似したヒト軽鎖および重鎖コンセンサス配列を、ヒトラムダ軽鎖可変領域の6つのサブグループ、ヒトカップ軽鎖可変領域の4つのサブグループおよびヒト重鎖可変領域の3つのサブグループの中から選択した(ケトルボロー、Protein Engineering 4: 773-783 (1991)を参照のこと)。別のアプローチでは、ヒト可変領域をヒト可変領域に関するすべての公開された配列から選択した(カバット(Kabat, E. A.)ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991))。齧歯類軽鎖および重鎖可変領域のアミノ酸配列を、ヒト配列と比較し、齧歯類可変領域と高い程度の類似性を有するヒト可変領域を選択した。同一のヒト抗体に由来するヒト軽鎖および重鎖可変領域は、2つの可変領域が適切に集合するということを確認するために用いることができる(クィーン(Queen, C.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 10029-10033 (1989))。しかしながら、本明細書に記載されるように、鋳型として選択されたヒト軽鎖および重鎖可変領域は、2つの異なるヒト抗体に由来するものであった。このようにして、齧歯類可変領域に高い程度の類似性を有するヒト可変領域を選択することが可能であった。2つの異なるヒト抗体に由来する可変領域に基づくCDRを接ぎ合わせた抗体の多くの成功例がある。最もよく研究された例の1つは、再形成されたヒトC A M P A T H - 1抗体である(リーヒマン(Riechmann, L.)ら、Nature 322: 323-327 (1988))。

【0107】

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

【0108】

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

【0109】

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

CDR配列を有するおよび有しないマウスA c t - 1カップ軽鎖可変領域のアミノ酸配列

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

【0110】

【表1】

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

10

【0111】

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

20

【0112】

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

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

30

【0113】

【表2】

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

40

【0114】

また、マウスA c t - 1可変領域は、マウスおよびヒト可変領域の記録されたすべての例の個々の配列とも比較した(カバット(Kabat, E. A.)ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991); UW GCGパッケージ(ウイスコンシン大学))。ヒト抗体配列に関して、マウスA c t - 1軽鎖可変領域は、ヒト抗体GM607'CL(クロベック(Klobeck, H.-G.)ら、Nature 309: 73-76 (1984))由来のヒトカッパ軽鎖可変領域の配列と非常に類似していた。図5は、マウスA c t - 1軽鎖可変領域のアミノ酸配列(配列番号: 7)およびヒトGM607' C

50

L 軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：8）のアラインメントを示す。予想されたように、ヒト GM607' CL の軽鎖可変領域は、ヒト カッパ 軽鎖可変領域のサブグループ II のメンバーである。マウス A c t - 1 およびヒト GM607' CL 軽鎖可変領域間の全体の配列同一性は、71.4% であると計算された。マウス A c t - 1 重鎖可変領域は、ヒト抗体 21/28' CL (デルシモニアン(Dersimonian, H.) ら、J. Immunol. 139: 2496-2501 (1987)) 由来のヒト重鎖可変領域の配列と非常に類似していた。図 6 は、マウス A c t - 1 重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：9）およびヒト 21/28' CL 重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：10）のアラインメントを示す。予想されたように、ヒト 21/28' CL の重鎖可変領域は、ヒト重鎖可変領域のサブグループ I のメンバーである。マウス A c t - 1 およびヒト 21/28' CL 重鎖可変領域間の全体の配列同一性は、68.1% であると計算された。これらの比較に基づき、ヒト GM607' CL 軽鎖可変領域を、再形成ヒト A c t - 1 軽鎖可変領域の設計に関するヒト 鋳型として選択し、ヒト 21/28' CL の重鎖可変領域を、再形成ヒト A c t - 1 重鎖可変領域の設計に関するヒト 鋳型として選択した。

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

表 3 および 4 は、再形成ヒト A c t - 1 可変領域がどのように設計されたかを要約する。表 3 は、再形成ヒト mAb A c t - I VL 領域の設計に用いたアミノ酸配列のアラインメントであり、4 列にはヒト化対象のマウス A c t - 1 軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：7）、5 列（マウス κ-II）にはマウス A c t - 1 可変領域が属するマウス可変領域のサブグループに関するコンセンサス配列（配列番号：50）、6 列（ヒト κ-II）にはマウス A c t - 1 可変が最も類似するヒト可変領域のサブグループに対するコンセンサス配列（配列番号：51）、7 列には鋳型として供する（即ち、GM607' CL）ヒト可変領域のアミノ酸配列（配列番号：8）および 8 列（A c t - I RHVκ）には設計された再形成ヒト A c t - 1 可変領域のアミノ酸配列（配列番号：52）を掲載す

る。表4は、再形成ヒトmAb Act-I VH領域の設計に用いたアミノ酸配列のラインメントであり、4列にはヒト化対象のマウスAct-1重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：9）、5列（マウスIIB）にはマウスAct-1可変領域が属するマウス可変領域のサブグループに対するコンセンサス配列（配列番号：53）、6列（ヒトI）にはマウスAct-1が最も類似するヒト可変領域のサブグループに対するコンセンサス配列（配列番号：54）、7列には鋳型として供する（即ち、21/28'CL）ヒト可変領域のアミノ酸配列（配列番号：10）および8列（Act-I RHV_H）には設計された再形成Act-1可変領域のアミノ酸配列（配列番号：55）を掲載する。表3および4の終わりから2番目の列は、マウスAct-1と選択されたヒトFRとの間で異なる残基のFRにおける位置（表面または埋没）を示す。表3および4の最後の列は、可変領域中のその位置に関連したコメントを掲載する。

10

【0118】

表3において、以下の印を用いる：（*）カバット(Kabat) コンセンサス配列即ち、カバットサブグループ内の95%以上の出現（カバット(Kabat, E. A.)ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局(1991)）（5列および6列の場合）、またはショチアら、Nature 342: 877-883 (1989)により規定されたようなCDRループ（5列および6列の場合）に対する規定構造の一部としてもしくはCDRループ（8列の場合）に対する規定構造の一部としてのいずれかにより規定された非変異残基；（太字）ヒトアミノ酸残基が対応するマウス残基により置換されたFRおよびCDRでの位置；（下線）ヒト残基が類似のマウス残基番号と異なるFRでの位置；（△）ヒトFRでの変化の番号付け；（マウス Ab Act-1）マウスAct-1抗体由来のV_L領域のアミノ酸配列；（マウスκ-II）サブグループII由来のマウスカッパV_L領域のコンセンサス配列（カバットら、前述）（ヒトκ-II）サブグループII由来のヒトカッパV_L領域のコンセンサス配列（カバットら、前述）；（GM607'CL）ヒトGM607'CL抗体由来のアミノ酸配列（クロベックら、Nature 309: 73-76 (1984)）；（表面または埋没）抗体可変領域の両鎖における残基の残りに関連したアミノ酸の位置；（Act-I RHV_K）再形成ヒトmAb Act-I V_L領域のアミノ酸配列。

20

【0119】

【表 3 - 1】

表 3 再形成ヒトmAb Act-1 V_L領域の設計に使用したアミノ酸配列のアライメント

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス κ-II	ヒト κ-II	GM 607 CL	Act-1または RH V _K	表面または 埋 没	コメント
1	1	FR1	D	D*	D*	D	D		
2	2		V	V	I*	I	V	埋没	L1ループに対する 標準AA (Δ1)
3	3		V	V	V*	V	V		
4	4		V	M	M	M	<u>M</u>	埋没	L1とL2の 間で埋没。 マウスκ-IIでは V=9/245, M=202/245。 M=42/45, ヒト κ-IIではVはみられ ない。 結合が弱い場合第2 パージョンでこれを Valに変えること を考慮。
5	5		T	T*	T*	T	T		
6	6		Q	Q*	Q*	Q	Q		
7	7		T	T	S	S	<u>S</u>	表面	結合部位 (BS) に 遠位。 マウスκ-IIでは T=164/245。 ヒトκ-IIでは T=10/37, S=27/37。
8	8		P	P	P*	P	P		
9	9		L	L	L*	L	L		

【表 3 - 2】

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

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

【表 3 - 3】

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

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス κ -II	ヒト κ -II	GM 607 CL	Act-1または RH V _K	表面または 埋没	コメント
19	19	I	V	A	A*	A	A	埋没	コア内へ向くが 標準マウスから ヒトに変化。 マウス κ -IIでは V=66/253, A=187/253。 ヒト κ -IIでは Aのみ (30/30) みられる。
20	20	I	S	S*	S*	S	S		
21	21	I	I	I*	I*	I	I		
22	22	I	S	S*	S*	S	S		
23	23	FR1	C	C*	C*	C	C		
24	24	CDR1	R	R	R	R	R		
25	25	I	S	S*	S*	S	S		L1ループに 対する標準AA。
26	26	I	S	S*	S*	S	S		L1ループに 対する標準AA。
27	27	I	Q	Q	Q	Q	Q		L1ループに 対する標準AA。
27A	28	I	S	S	S	S	S		L1ループに 対する標準AA。
27B	29	I	L	L	L*	L	L		L1ループに 対する標準AA。

【表 3 - 4】

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

Kabat	#	FR または CDR	マウス Act-1	マウス κ -II	ヒト κ -II	GM 607 CL	Act-1または RH V _K	表面または 埋 没	コメント
27C	30		A	V	L	L	A		L1ループに 対する標準AA。
27D	31		K	H	H	H	K		L1ループに 対する標準AA。
27E	32		S	S	S	S	S		L1ループに 対する標準AA。
27F			-	-	X	-	-		
28	33		Y	N	D	N	Y		L1ループに 対する標準AA。
29	34		G	G*	G	G	G		L1ループに 対する標準AA。
30	35		N	N	N	Y	N		L1ループに 対する標準AA。
31	36		T	T*	N	N	T		L1ループに 対する標準AA。
32	37		Y	Y*	Y*	Y	Y		L1ループに 対する標準AA。
33	38		L	L*	L*	L	L		L1ループに 対する標準S。
34	39	CDRI	S	E	N	D	S		パッキングAA。 異常(117/1365)。 ここではA, H およびNが最も 一般にみられる。

【表 3 - 5】

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

Kabat	#	FR または CDR	マウス Act-1	マウス κ -II	ヒト κ -II	GM 607 CL	Act-1 または RH V _K	表面または 埋 没	コメント
35	40	FR2	W	W*	W*	W	W		
36	41		Y	Y	Y	Y	Y		パッキング AA。 最も一般的な AA。
37	42		L	L*	L	L	L		
38	43		H	Q*	Q	Q	Q	埋没	パッキング AA。 H は異常 (31/1312)。 Q は最も一般的な AA (1158/1312)。 マウス κ -II では H = 6 / 225, Q = 219 / 225。 Q = 15 / 17, H は ヒト κ -II ではみられ ない。
39	44		K	K	K	K	K		
40	45		P	P*	P	P	P		
41	46		G	G*	G*	G	G		
42	47		Q	Q*	Q	Q	Q		
43	48		S	S*	S	S	S		
44	49		P	P*	p*	P	P		パッキング AA。 最も一般的な AA。
45	50		Q	K	Q	Q	Q		

【表 3 - 6】

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

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

【表 3 - 7】

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

Kabat	#	FR または CDR	マウス Act-1	マウス κ-II	ヒト κ- II	GM 607 CL	Act-1 または RH V _K	表面または 埋 没	コメント
62	67	I	F	F*	F*	F	F		
63	68	I	S	S	S*	S	S		
64	69	I	G	G*	G	G	G		L2 ループに 対する標準 A A。
65	70	I	S	S*	S*	S	S		
66	71	I	G	G*	G*	G	G		
67	72	I	S	S*	S	S	S		
68	73	I	G	G*	G	G	G		
69	74	I	T	T*	T*	T	T		
70	75	I	D	D	D	D	D		
71	76	I	F	F*	F*	F	F		L1 ループに 対する標準 A A。
72	77	I	T	T*	T*	T	T		
73	78	I	L	L*	L*	L	L		
74	79	I	K	K	K	K	K		
75	80	I	I	I*	I*	I	I		
76	81	I	S	S	S	S	S		

【表 3 - 8】

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

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

【表 3 - 9】

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

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

【表 3 - 1 0】

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

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

【表 3 - 1 1】

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

Kabat	#	FR または CDR	マウス Act-1	マウス κ -II	ヒト κ -II	GM 607 CL	Act-1 または RH V _K	表面または 埋 没	コメント
98	103	FR4	F	F*	F*	F	F		バックグランド 最も一般的な AA。
99	104	-	G	G*	G*	G	G		
100	105	-	G	G	Q	Q	Q	半分埋没	BS に遠位。 ヒト κ -II では Q = 12 / 13, G = 1 / 12。
101	106	-	G	G*	G*	G	G		
102	107	-	T	T*	T*	T	T		
103	108	-	K	K*	K*	K	K		
104	109	-	L	L*	V	V	V	半分埋没	BS に遠位。 ヒト κ -II では L = 5 / 14, V = 9 / 14。
105	110	-	E	E*	E	E	E		
106	111	-	I	I	I*	I	I		
106A	-	-	-	-	-	-	-		
107	112	FR4	K	K*	K	K	K		

【0130】

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

10

20

30

40

50

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

10

【0131】

【表 4 - 1】

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

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス IIB	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RH V _H	表面または 埋 没	コメント
1	1	FR1	Q	Q	Q	Q	Q		
2	2	I	V	V*	V	V	V		
3	3	I	Q	Q*	Q*	Q	Q		
4	4	I	L	L*	L*	L	L		
5	5	I	Q	Q	V	V	V	表面	結合部位 (BS) に 速位。 マウス IIBでは Q=135/143。 ヒト Iでは V=49/53, Q=1/53。
6	6	I	Q	Q	Q	Q	Q		
7	7	I	P	P	S*	S	S	半分埋没	BSに速位。 マウス IIBでは P=102/150。 ヒト IではPは みられない。
8	8	I	G	G*	G*	G	G		
9	9	I	A	A	A	A	A		
10	10	I	E	E	E	E	E		
11	11	I	L	L*	V	V	V	表面	BSに速位。 ヒト Iでは V=50/54, L=4/54。

【表 4 - 2】

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

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス IIB	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RH V _H	表面または 埋没	コメント
12	12	I	V	V*	K	K	K	埋没	コア内へ向くが 標準マウスから ヒトに変化。 ヒトIでは K=41/55, V=3/55。
13	13	I	K	K	K*	K	K		
14	14	I	P	p*	p*	P	P		
15	15	I	G	G*	G*	G	G		
16	16	I	T	A	A	A	A	表面	BSに遠位。 マウスIIBでは T=12/139, A=117/139。 ヒトIでは T=1/52 A=23/52。
17	17	I	S	S*	S*	S	S		
18	18	I	V	V*	V	V	V		
19	19	I	K	K	K	K	K		

【表 4 - 3】

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

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス IIB	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RH V _H	表面または 埋没	コメント
20	20	I	L	L	V	V	<u>V</u>	埋没	コア内へ向くが 標準マウスから ヒトに変化。 マウスII Bでは L=138/179。 ヒトIでは V=36/52, L=1/52。
21	21	I	S	S*	S	S	S		
22	22	I	C	C*	C*	C	C		
23	23	I	K	K*	K	K	K		
24	24	I	G	A*	A	A	G	埋没	H1ループに対する 標準AA (Δ1)。 GはマウスII Bでは みられない。 ヒトIでは G=12/51, A=34/51。
25	25	I	Y	S*	S*	S	<u>S</u>	表面	BSから離れた方へ 向き、抗原 (Ag) 結合しないと思われ る。 マウスII Bでは Y=1/185。 S=48/50, YはヒトIでは みられない。

【表 4 - 4】

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

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

【表 4 - 5】

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

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス IIB	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RH V _H	表面または 埋没	コメント
37	37	I	V	V	V	V	V		パッキング AA。 最も一般的な AA。
38	38	I	K	K	R*	R	<u>R</u>	埋没	コア内へ向くが 標準マウスから ヒトに変化。 マウス IIB では K=177/188。 R=48/49。 Kはヒト I では みられない。 しかし、Lys は H2 ループをパッキング するであろうから、 結合が弱い場合 A40R とともに 第 2 パージョンで 変えることを考慮。
39	39	I	Q	Q	Q*	Q	Q		パッキング AA。 最も一般的な AA。

【表 4 - 6】

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

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

【表 4 - 7】

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

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

【表 4 - 8】

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

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

【表 4 - 9】

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

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス IIB	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RH V _H	表面または 埋没	コメント
69	70		L	L*	I	I	L	埋没	Leuは隠れて H2ループを支える (Δ3)。 ヒトIでは Ile=26/49, Leu=1/49。
70	71		T	T*	T	T	T		
71	72		V	V	A	R	V	埋没	H2ループに対する 標準AA (Δ4)。
72	73		D	D*	D	D	D		
73	74		I	K	T	T	I	表面	H2ループの背後 でA8結合に直接 役割を果たすであ ろう (Δ5)。 IleはマウスII BまたはヒトIで みられない。 ヒトIでは T=21/49。
74	75		S	S	S*	S	S		
75	76		S	S*	T	A	A	表面	BSに選位。 T=26/50, A=4/50, SはヒトIでは みられない。
76	77		S	S	S	S	S		
77	78		T	T*	T	T	T		

【表 4 - 1 0】

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

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス IIR	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RH V _H	表面または 埋没	コメント
78	79	I	A	A	A	A	A		
79	80	I	Y	Y*	Y	Y	Y		
80	81	I	M	M	M	M	M		
81	82	I	Q	Q	E	E	E	半分埋没	BSに遠位。 マウスII Bでは Q=163/194。 ヒトIでは E=35/50。 Q=11/50。
82	83	I	L	L*	L	L	L		
82A	84	I	S	S	S	S	S		
82B	85	I	S	S	S	S	S		
82C	86	I	L	L*	L*	L	L		
83	87	I	T	T*	R	R	R	表面	BSに遠位。 ヒトIでは R=33/51。 T=4/51。
84	88	I	S	S*	S	S	S		
85	89	I	E	E	E	E	E		
86	90	I	D	D*	D*	D	D		

【0141】

10

20

30

40

【表 4 - 1 1】

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

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

【表 4 - 1 2】

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

Kabat	#	FR または CDR	マウス Act-1	マウス IIB	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RII V _H	表面または 埋 没	コメント
99	103	I	G	G	G	G	G		
100	104	I	W	S	S	-	W		
100A	105	I	D	S	G		D		
100B	106	I	Y	X	G	-	Y		
100C	107	I	A	X	G	-	A		
100D	108	I	I	V	C	-	I		バックキング AA。 I = 26/1211。 F および M が最も 一般的にみられる。
100E		I	-	Y	Y	-			
100F		I	-	X	R	Y			
100G		I	-	-	G	Y			
100H		I	-	Y*	D	G			
100I		I	-	W	Y	S			
100J		I	-	Y	X	G			
100K		I	-	F	F	S			
101	109	I	D	D	D	N	D		
102	110	CDR3	Y	Y	Y	Y	Y		
103	111	FR4	W	W*	W*	W	W		バックキング AA。 最も一般的な AA。

【表 4 - 1 3】

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

Kabat	#	FRまたは CDR	マウス Act-1	マウス IIB	ヒト I	ヒトドナー 21/28CL	Act-1 RH V _H	表面または 埋没	コメント
104	112	I	G	G*	G	G	G		
105	113	I	Q	Q	Q	Q	Q		
106	114	I	G	G*	G*	G	G		
107	115	I	T	T*	T	T	T		
108	116	I	S	T	L	L	L	表面	BSに選位。 マウスII Bでは T=88/149。 ヒトIでは L=25/39, T=7/39。
109	117	I	V	V	V*	V	V		
110	118	I	T	T*	T	T	T		
111	119	I	V	V*	V	V	V		
112	120	I	S	S*	S*	S	S		
113	121	FR4	S	S	S*	S	S		

【0144】

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

10

20

30

40

50

化は、FR 1 の 2 位であった（カバット (Kabat, E. A.) ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局 (1991) により規定されたように）。特に、ヒト GM 6 0 7 ' C L 軽鎖可変領域で見られるイソロイシンがマウス A c t - 1 軽鎖可変領域で見られるようなバリンに変化した。カップ軽鎖可変領域でのこの位置は、L 1 ループの正しい方向と構造に厳密な位置の 1 つとして、ショチアら、Nature 342: 877-883 (1989) により同定され、それ自体、「標準アミノ酸」の 1 つとして知られている。ループコンフォメーションにおける重要な役割のため、かかるマウス枠組み残基は、再形成可変領域で一般にいつも保存されている。

【0145】

FR 1 の 4 位では、マウス配列においてバリンおよびヒト配列においてメチオニンが存在する。バリンからメチオニンへの変化は、両アミノ酸が非極性で、疎水性残基であるので、それ自体ドラスティックな変化ではなく、したがって、ヒト配列に存在するメチオニンを再形成ヒト A c t - 1 可変領域に使用した。しかしながら、該モデルは、バリンが L 1 ループと L 2 ループとの間に埋もれており、蛋白質に埋もれた場合のバリンの平均体積は $142 \text{ \AA}^3$ であることを示唆するが、一方、メチオニンは約 $171 \text{ \AA}^3$ の空間を占める。より大きなメチオニン残基は、L 1 ループと L 2 ループのいずれかまたは両方のコンフォメーション変化を生じさせうるであろう。再形成ヒト A c t - 1 の抗原結合は、再形成ヒト A c t - 1 軽鎖可変領域において 4 位のメチオニンからバリンへの追加の変化により改良されてもよい。

【0146】

再形成ヒト A c t - 1 重鎖可変領域の設計（表 4）に関して、ヒト FR に存在するアミノ酸から元のマウス FR に存在するアミノ酸に変化したヒト FR の 5 つの残基が存在した。FR 1 の 2 4 位および FR 3 の 7 1 位では（カバット (Kabat, E. A.) ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第 5 版、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局 (1991) により規定されたように）、これらの位置はそれぞれ H 1 ループと H 2 ループの標準構造の一部であるので（ショチアら、Nature 342: 877-883 (1989)）、マウス配列に存在するようなアミノ酸残基が再形成ヒト A c t - 1 重鎖可変領域に保持されていた。これらの位置でのいかなるアミノ酸変化も H 1 ループと H 2 ループのパッキングと最終的な構造を破壊しうるので、これらの厳密な位置でのマウス残基は、ヒト化重鎖可変領域で定型的に保存されている。

【0147】

FR 2 の 4 8 位では、ヒト配列のメチオニンがマウス A c t - 1 配列に存在するようなイソロイシンに変化した。イソロイシンをメチオニンに置換することは異常である。より重要なことには、該モデルは、イソロイシン残基が H 2 ループの下に隠れて埋もれていることを示す。結論として、この埋もれた位置での変化は、H 2 ループの構造に影響を及ぼし、故に抗原結合を妨害したかもしれない。

【0148】

FR 3 の 6 9 位では、ヒト配列のイソロイシンがマウス A c t - 1 配列に存在するようなロイシンに変化した。イソロイシンをロイシンに置換することは異常ではないけれども、該モデルは、ロイシンが H 2 ループの下に埋もれていることを示す。結論として、4 8 位の残基のように、この位置での変化は、H 2 ループのコンフォメーションに影響を及ぼし、それにより抗原結合を破壊しうるだろう。

【0149】

最後に、FR 3 の 7 3 位では、ヒト配列のスレオニンがマウス配列に存在するようなイソロイシンに変化した。FR 3 のこの位置でのイソロイシンは、マウスサブグループ IIB またはヒトサブグループ I でこれまで見られたことがなく（カバット (Kabat, E. A.) ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国保健およびヒトサービス省、米国政府印刷局 (1991) により規定されたように）、このことは、この位置のイソロイシンが抗原結合に重要な役割を有するかもしれないことを示唆する。

【0150】

該モデルにおいて、73位のロイシンが結合部位の縁近辺の表面上に存在するようであり、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンのエピトープの大きさと方向に応じて抗原結合に直接の役割を果たす可能性があるだろう。しかしながら、表面残基の位置として、抗体全体は、もしマウスアミノ酸が再形成ヒト抗体に存在しないならば、より低い免疫原性ポテンシャルを有するだろう。イソロイシンは、再形成抗体誘導体においてヒトスレオニン残基に置換でき、新規な構築物を再試験して、2番目のバージョンが類似のレベルの抗原結合を維持するかどうかを決定した。

【0151】

再形成ヒトA c t - 1重鎖可変領域の元の設計でなされたヒトF Rでの5つの変化に加え、抗原結合を改良するかもしれない2つの別の変化が存在した。該モデルは、マウスm A b A c t - 1の重鎖可変領域の38L y sおよび40A r g残基がH2ループの下に隠れて位置し、C D R 2の63P h eに近接してパッキングすることを示唆する（表4と同じ番号付け）。しかしながら、これらの残基も重鎖可変領域の核に位置し、それらがそれらの対応するヒトアミノ酸（各38A r gおよび40A l a）を置換するために用いられるならば、他の有害な効果を有するかもしれないであろう。したがって、F R 2の38位と40位に対する変化は、m A b A c t - 1の再形成ヒト重鎖可変領域に取り込まれなかった。しかしながら、再形成重鎖の修飾のいずれかまたは両方を誘導体を用いて抗原結合を改良してもよい。

【0152】

結論

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

【0153】

再形成ヒトA c t - 1軽鎖可変領域および再形成ヒトA c t - 1重鎖可変領域を設計した（表3および4）。再形成ヒトA c t - 1軽鎖可変領域は、マウスA c t - 1軽鎖可変領域のC D RおよびヒトG M 6 0 7 ' C L抗体の軽鎖可変領域由来のF Rを基礎とした。1つのアミノ酸変化がヒトF Rの2位でなされた。再形成ヒトA c t - 1重鎖可変領域は、マウスA c t - 1重鎖可変領域のC D Rおよびヒト21 / 28 ' C L抗体の重鎖可変領域由来のF Rを基礎とした。5つのアミノ酸変化がヒトF Rの24、48、69、71および73位でなされた。

【0154】

さらに、再形成ヒトA c t - 1可変領域のさらなるバージョンの設計に考慮されるであろうカップ軽鎖のF R 1の4位の1つの部位ならびに重鎖のF R 2の38および40位の2つの部位が注目された。また、抗体の表面上の位置という観点から、重鎖のF R 3の73位の1つの残基もマウスからヒトアミノ酸への復帰突然変異の候補として同定された。

【0155】

実施例3 再形成可変領域をコードする核酸の構築

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

【0156】

ヒト化A C T - 1の設計、構築および発現

実施例2に記載のようにヒト化抗体の一次アミノ酸配列を決定した後、該配列を縮重核酸配列に逆翻訳し、M a c V e c t o r (Kodak, Scientific Imaging Systems) 4. 5. 3版を用いて可能性のある制限酵素部位を分析した。次いで、制限酵素切断部位を取り込むが一次アミノ酸配列を保存する核酸配列を選択した。サブクローニングに使用される注目の制限酵素部位を有する重鎖核酸配列（配列番号：18）およびアミノ酸配列（配列番号：19）を図11に示し、ならびに軽鎖核酸配列（配列番号：20）およびアミノ酸配

列（配列番号：21）を図12に示す。

【0157】

以下のようにして、ヒト化Act-1重鎖および軽鎖可変領域遺伝子を構築した。軽鎖に対してL1～L6（それぞれ配列番号：22～27）、重鎖に対してH1～H10（それぞれ配列番号：28～37）と称する重複した相補的なオリゴヌクレオチドを、Applied Biosystems DNA Synthesizer Model 392を用いて合成した（図13）。55℃で一晩脱保護した後、オリゴをSpeed-Vacで乾燥させ、100mlの水に再懸濁させ、Bio-Spin6カラム（Bio-Rad）で脱塩した。該オリゴの濃度は、260nmで吸光度を測定することにより決定し、オリゴを変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。

10

【0158】

各オリゴの100μgを2倍容量の負荷色素（95%ホルムアミド、20mM EDTA、0.05%プロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノールFF）と混合し、65℃で2分間加熱し、1X TBE中で約3時間、250Vで泳動した。該ゲルを臭化エチジウムで染色し、紫外線下で観察した。次いで、正しい長さのオリゴをゲルから切り出し、水とともに透析チューブに入れ、電気溶出させた。該オリゴを、等容量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール（25：24：1 v/v）（Gibco/BRL）で2回抽出し、0.1倍容量の3.0M 酢酸カリウム（pH6）と2倍容量の冷エタノールの添加により沈澱させた。遠心分離後、ペレットを70%エタノールで1回洗浄し、真空乾燥させ、50μlの水に再懸濁させた。

20

【0159】

相補性オリゴを、等モル量（50μlの水に約100μg）の精製オリゴを等容量（100μl）の2X アニーリング緩衝液（2X=1M NaCl、pH7.5の40mM Tris-HCl、2mM EDTA）と混合することによりアニーリングした。オリゴは、95℃まで10分間加熱することにより変性させた後、65℃で8時間インキュベーションした。次いで、アニーリングしたオリゴを、以前に記載のようにエタノール沈澱させ、40μlの水に再懸濁した。

【0160】

アニーリングしたオリゴの伸長は、2μlのラージフラグメントDNAポリメラーゼI（Klenow）、5μlの2.5mM dNTPおよび5μlの10X 緩衝液（10X=10mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、1mM DTT、25℃でpH7.9）を添加し、最終容量を52μlまで上げることにより達成した。該混合物を室温で1時間インキュベートした。37℃で0.5時間のインキュベーションで1μlのdNTPと1μlのKlenowをさらに添加した。重鎖断片Aを伸長させる必要がなかったことに注目すること。

30

【0161】

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

40

【0162】

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

50

サートのそれぞれ反対側にアニーリングするT3およびT7プライマーをシーケンスに用いた。

【0163】

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

【0164】

pCR-HAおよびpCR-HB由来のミニプレップDNAを制限酵素SpeIとAgeIで消化した。DNAは、1%アガロースゲルで電気泳動した。141bp断片HBを該ゲルから回収し、SpeIおよびAgeI部位でpCR-HAにライゲートし、pCR-HABが生じた。次に、112bp断片HCを、XbaIとAgeIを用いてpCR-HCから放出させ、pCR-HABのXbaIおよびAgeI部位にライゲートし、プラスミドpCR-ACを得た。断片HD(141bp)およびHC(130bp)は、断片HDに対しては制限部位NheIおよびAgeIを、ならびに断片Eに対しては制限部位BstEIIおよびAgeIを用いて、同じ一連の様式でライゲートした。pCR-scriptにすべての5つの重鎖可変領域断片を含む最終プラスミドを、pCR-HAEと称した。すべての消化は、65℃の最適インキュベーション温度を有するBstEIIを用いる場合を除いて、37℃で少なくとも2時間のインキュベーションでミニプレップDNAを用いて行なった。ライゲーションは、1:10のベクター対インサート比でT4DNAリガーゼを用いて16℃で一晩行ない、次の日に、製造業者の推奨したプロトコールに従ってDH5αサブクロニング効率コンピテント細胞(Gibco/BRL)に形質転換した。

【0165】

pCR-ScriptTM中のAct-1ヒト化重鎖可変領域を、pCR-HAEのHindIIIとAgeIでの消化により放出させた。この411bp断片を用いて、HindIIIとAgeIで消化しておいたpEE6mhACT1Hchi(実施例1)のマウス可変領域配列を置換し、pEE6hCMV-Bにヒト化ACT-1重鎖遺伝子を生成させた。得られたプラスミドをpEE6hACT1Hと称する。正しいDNA配列は、シーケンスにより決定した。

【0166】

pCR-ScriptTM中の軽鎖断片Aを、BspEIとMscIで消化した。次いで、この153bp断片を用いて、pCR-scriptTM中のマウス可変軽鎖のBspEIからMscIのマウス部分を置換した。このプラスミドをpCR-LhAmBCと称する。MscIとNruIで消化した軽鎖断片BおよびNruIとKasIで消化した軽鎖断片Cを、pCR-LhAmBCのMscIおよびKasI部位にトリププライゲートし、残りのマウス配列を置換した。消化、ライゲーションおよび形質転換には、DM1コンピテント細胞を最後の形質転換を除くすべてに使用することを除いて、前述したのと同じ手法を用いた。

【0167】

pCR-ScriptTM中のヒト化軽鎖可変領域およびプラスミドpEE12mhACT1Lchi(実施例1)をHindIIIとKasIで消化した。360bp軽鎖可変領域断片および315bp軽鎖定常領域をゲルで精製し、pEE12のHindIII制限部位にトリププライゲートし、pEE12hACT1Lを得た。シーケンスを行ない、正しい方向および核酸配列を確認した。

【0168】

ヒト化重鎖および軽鎖遺伝子の両方を含む発現ベクターは、以下の例外を除いて、キメラ抗体に関して記載されたのと同じ方法(実施例1、キメラ免疫グロブリンの発現を参照のこと)を用いて構築した。ヒト化可変重鎖領域の追加のBg1II制限部位により、Bg1IIでの切断の際には部分消化を用いて正しい断片を得た。ヒト化重鎖および軽鎖遺伝子の両方を含むベクターを、pEE12hACT1LHと称する。

【0169】

すべてのヒト化抗体構築物の一過性の発現および細胞染色は、キメラ抗体に用いられたものと同じプロトコルを用いて行なった（実施例1、キメラ免疫グロブリンの発現を参照のこと）。図14は、無関係のアイソタイプ適合対照抗体（IgG1、カッパ）と比較して、マウスーヒトキメラAct-1抗体またはヒト化Act-1抗体を用いるHuT78染色の結果を示す。

【0170】

骨髓腫細胞株であるNSO細胞（Methods in Enzymol. 73 (B): 3-46 (1981); ヨーロピアンコレクション・オブ・アニマルセルカルチャーズ、PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, U. K., ECACC No. 85110503)の安定なトランスフェクタントは、NSO細胞のpEE12hACT1LHとのエレクトロポレーションにより得た。

10

【0171】

NSO細胞の安定な発現

安定なトランスフェクション用の40 μ gのpEE12hACT1LHを、構築物の細菌のプラスミド部分内を切断するSalI制限酵素での消化により線状にした。線状DNAを、2倍容量のエタノールと1/10倍容量の酢酸ナトリウムを用いて溶液から沈澱させ、70%エタノールで洗浄し、乾燥させて滅菌水に再懸濁した。

【0172】

対数増殖中のNSO細胞は、非選択培地（ダルベッコの改変イーグル培地（高グルコース）、2mM L-グルタミン含有、ピルビン酸ナトリウム不含、4500mg/L グルコースおよび25mM HEPES緩衝液（GIBCO/BRL、カタログ番号12430-021）含有、10%ウシ胎仔血清（Gibco/BRL、カタログ番号16000-044）を補足）で維持した。NSO細胞を遠心分離し、洗浄して、DNAの添加後に該細胞が 10^7 細胞/mlの濃度で存在するように、冷PBSに再懸濁した。線状プラスミドDNA（40 μ g）を、氷上のエレクトロポレーションキュベット中の 10^7 個の細胞に加えた。該細胞とDNAを泡を生じさせないようにゆっくり混合させ、該混合物を氷上で10分間放置した。該キュベットの外側を拭いて乾燥させ、Gene Pulser（Bio-Rad）を用いて1500V、3 μ Fの2回の連続パルスを加えた。該キュベットを10分間氷上に戻した。

20

【0173】

トランスフェクトした細胞を、50 μ lの非選択培地中 3×10^5 、 7.5×10^4 および 1.5×10^4 細胞/mlの密度で96ウェルプレートに移し、37℃で24時間インキュベートした。その後、150 μ lの選択培地（グルタミン不含ダルベッコの改変イーグル培地、4500mg/Lのグルコース含有、4mg/LのピリドキシンHCl含有、110mg/Lのピルビン酸ナトリウム含有、硝酸鉄不含、L-グルタミン不含（JRH BioSciences、カタログ番号51435-78P）、1X GSサプリメント（JRH Biosciences、カタログ番号58672-77P）から入手した50X GSサプリメント）と10%透析ウシ胎仔血清（Gibco/BRL、カタログ番号26300-061）を補足）をすべてのウェルに添加した。該プレートを、実質的な細胞死が起こり、不連続な生存コロニーが出現するまでインキュベーターに戻した。一旦グルタミン非依存性トランスフェクタントのコロニーが見られれば、シングルコロニーを有するウェルを選択し、消費した組織培養上清を回収し、以下に記載のようにELISAによりヒトIgG分泌をアッセイした。このようにして、その後の研究に用いた3A9と称する抗体産生クローンを得た。第2のトランスフェクションは、選択をL-メチオニンスルホキシミン（MSX、グルタミンシンテターゼインヒビター）の存在下で行なうことを除いて、前記したように行なった。

30

40

【0174】

陽性のコロニーは、以下のようにしてヒトIgG分泌に対するELISAによりスクリーニングした。ELISAプレート（NUNC Maxisorp）を、炭酸塩緩衝液pH9.5中2.5 μ g/mlで100 μ lのAffiniPure F(ab')₂断片ロバ抗ヒトIgG（H+L）（Jackson ImmunoResearch Laboratories）を用いて、4℃で一晩被覆した。プレートをPBS Tween 20で4回洗浄し、200 μ l PBS、1% BSAで

50

、37℃で2時間ブロックした。プレートを洗浄し、100μlの安定なトランスフェクトNSOの上清で37℃で15分間インキュベートした。PBS 1% BSA中1mg/mlのヒトIgG1カップを標準として用いた。新鮮なNSO培地(DME+GSサプリメント)を陰性対照として用いた。プレートを洗浄し、PBS(Ca²⁺/Mg²⁺なし)中0.05μg/mlで100μlのペルオキシダーゼ結合AffiniPure F(ab')₂断片ロバ抗ヒトIgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories)を用いて、37℃で15分間インキュベートした。5mg オーフエニレンジアミンジヒドロクロリド(OPD)の1錠(Sigma)を12mlのクエン酸緩衝液(0.1M、pH 5.0)に溶解し、該錠剤が溶解した後、12μlの30%過酸化水素を加えた。洗浄して二次抗体を除去した後、100μlの溶解したOPD基質を加えた。反応は12.5%の硫酸で停止させ、Dynatech Plate Readerで490nmでプレートを読んだ。陽性のウェルを、ウェル当たり2、1および0.5個の細胞の限界希釈によりクローニングした。シングルクローニング由来のすべてのウェルをELISAによる抗体産生に関して陽性と評価した場合、該株はクローニングされたと見なした。

【0175】

一過性または安定細胞トランスフェクタント培養物の細胞培養上清由来のヒト化ACT-1抗体の精製は、Bio-Cadワークステーション(Perseptive Biosystems, Inc.)を用いるプロテインAアフィニティークロマトグラフィー(Poros A/M 4.6/100mm, 5mL/min)により行なった。該カラムは、PBSで平衡化させた後、前もって0.2ミクロンフィルターで濾過しておいた細胞培養上清を適用した。1回の操作当たり適用した細胞培養上清の体積は、抗体の濃度により変えた。通常、1回の所定の操作で、15mg以下の抗体をカラムに適用した。流速は、精製手法を通して5ml/minであった。結合後、まず、該カラムをOD280nm=0になるまでPBSで大量に洗浄した。次いで、該カラムを最小限50カラム体積でさらに洗浄した。次いで、該カラムを引き続き0.1M 酢酸ナトリウム、pH 5.0で洗浄した。溶出は、0.1M クエン酸Na、pH 3.5での洗浄により達成された。溶出液は、5mlの画分で回収し、200μlの1.5M Na₂CO₃ pH 12の添加によりpHを中性にした。次いで、抗体含有画分をプールし、限外濾過(セントリコン、30,000KDaカットオフ、Amicon)により所望の濃度に濃縮した。

【0176】

Fc変異改変体の構築

また、ヒト化Act-1抗体の非Fc結合(Fc変異)版も構築した。この抗体は、ヒト化Act-1抗体と同じ可変領域(図11および図12)ならびに、FcR認識を排除し、Fc結合を除去するように設計されたIgG1重鎖定常領域に2個のアミノ酸の置換(即ち、Leu²³⁵→Ala²³⁵置換およびGly²³⁷→Ala²³⁷置換)を除いて同一のヒトIgG1定常領域を有する。Fc変異誘導体の重鎖をコードする核酸を以下のように構築した。pEE12発現ベクター中でヒト化抗CD18抗体(国際公開第93/02191号パンフレット(1993年2月4日公開);シムズら、J. Immunol. 151(4): 2296-2308 (1993))の軽鎖および重鎖をコードするが、部位特異的変異導入(Leu²³⁵→Ala²³⁵およびGly²³⁷→Ala²³⁷)により2個のアミノ酸置換をIgG1重鎖定常領域内に導入した3678と称する構築物(ヘルマン・ウォルトマン博士、オックスフォード大学から供与)を、Age IとEcoRIで消化してガンマ定常領域変異を含む900bpの断片を放出させた。次いで、この断片を用いて、pEE6hACT1HのAge I/EcoRI部位で重鎖野生型ガンマ1定常領域を置換し、pEE6hACT1H/Fcmutを生じさせた。両鎖を含有する他の構築物に対しては、前記したのと同様な方法で、再形成軽鎖遺伝子およびFc変異再形成重鎖遺伝子を含む1つの構築物(pEE12hACT1LH/Fcmut)を調製した。

【0177】

実施例4 ヒト化ACT-1抗体LDP-02のキャラクタライゼーション

最初のキャラクタライゼーション研究は、pEE12hACT1LH/Fcmutで一

過性にトランスフェクトしたCOS-7細胞から産生された抗体を用いて行なった。この抗体標品は、前記したように産生および精製され、以下、適当なロット番号が後に続く「1°HUM ACT-1」と称する。

【0178】

前記ネズミ細胞株NSOの安定なトランスフェクタント（線状pEE12hACT1LH/FCmutでトランスフェクト）から産生された抗体を用いて、追加のアッセイを行なった。この抗体標品を以下、「LDP-02/3A9/Lot1」と称する。

【0179】

「LDP-02/3A9/Lot#1」抗体を以下に記載の次の研究に用いた：SDS-PAGE、ウエスタンブロット分析、等電点電気泳動、アミノ酸組成分析、種交差反応性、滴定、補体介在溶解アッセイ、ADCCアッセイおよび結合阻害アッセイ。「1°HUM ACT-1 Lot#7をアフィニティーアッセイ#1~2に使用し、1°HUM ACT-1 Lot#8/9をアフィニティーアッセイ#3~5に使用し、そして1°HUM ACT-1 Lot#8/9をC1q結合アッセイに使用した。

【0180】

A. 物理化学的特性

1. SDS-PAGE

同一性の立証を補助し、最初の標品をキャラクタライズして純度を評価するために、LDP-02/3A9/Lot#1を、非還元および還元条件下でドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）に供し、コロイドクーマシーブルーで染色した。

【0181】

0.82mg/mlの公称濃度のLDP-02/3A9/Lot#1を80μl、微量濃縮器に加えた。抗体を溶解したクエン酸緩衝液を、160μlのTris緩衝液（0.5mM、pH8.8）で3回交換した。緩衝液交換後の試料の最終容量は、135μlであり、0.486mg/mlの蛋白質濃度を得た。この溶液を非還元および還元緩衝液で2倍に希釈し、0.243mg/mlの濃度を得た。3.16μgの蛋白質を含む0.243mg/ml溶液の13μlアリコート、SDSゲルの指定された試料のレーンに負荷した。SDS-PAGEを行ない、対照アーティクルは、マーク（Mark）12分子量標準（Novex, #LC5677）を含んでいた。

【0182】

非還元条件下では、LDP-02/3A9/Lot#1に、200,000ダルトンよりわずかに小さい見かけ上の分子量を有する主要なバンドが存在した。116,300~200,000ダルトンの間に、いくつかのマイナーな成分が観察された。約97,400ダルトンの分子量、55,400ダルトンよりわずかに大きな分子量および31,000ダルトンより小さい分子量を有する3つの追加のマイナーな成分も観察された。レーザーデンシトメトリーを用いてゲルをスキャンすることにより、染色されたポリペプチドバンドの定量分析、次いで、各可視化バンドに関連したエリアのパーセントの計算を可能にした（表5）。定量分析から得られたデータは、約200,000ダルトンで観察された主要な成分が試験した試料のレーンで全染色バンドの84.4%に相当することを示唆する。この主要なバンドは、インタクトな抗体に相当したが、55,000および31,000ダルトンの他のバンドはそれぞれ、1本の重鎖および軽鎖に相当した。

【0183】

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

、300ダルトンよりわずかに小さい1つのマイナーな成分が観察された。

【0184】

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

【0185】

【表5】

表5

純度データの一覧

コロイドクーマシーブルー、非還元条件

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

純度データの一覧

コロイドクーマシーブルー、還元条件

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

【0186】

2. ウェスタンブロット分析

前記したように、SDS-PAGEにより試料および標準を分析した。要約すると、還元しないおよび還元した試料を4~20% Tris-グリシンゲルで分析した。また、ノベックス(Novex)マーク(Mark)12分子量標準もゲルで泳動した。それぞれ0.51および1.09μgの蛋白質を生ずる、0.2143mg/ml溶液の2.1μlおよび4.5μlアリコートの容量をSDSゲルの指定された試料レーンに負荷した。

【0187】

SDS-PAGE後、ノベックス(Novex)ウェスタン・トランスファー・アパレイタス(Western Transfer Apparatus)の使用説明書に従って、試料蛋白質をゲルからニトロセルロースに移した。用いたトランスファー緩衝液は、20%メタノール中1X Tris-グリシン緩衝液であった。約2時間後、該ニトロセルロースブロットをトランスファー装置から除去し、DDI水でリンスした。次いで、該ニトロセルロースブロットを、3%ゼラチンおよび0.1%Tween20を含むTris緩衝液(20mM)中、37℃で35分間ブロックした。該ブロットをブロッキング溶液から除去し、Tris緩衝液で2回洗浄した。抗マウスIgG抗体ストック溶液を20mM Tris-3% BSA溶液で1000倍に希釈することにより調製したヤギ抗マウスIgG溶液を、該ブロットに添加し、2~8℃で一晩インキュベートした。インキュベーション後、該ブロットを5分毎にTris緩衝液を4回交換することで洗浄した。抗ヤギIgGアルカリホスファターゼコンジュゲートを20mM Tris-3% BSA

溶液で5000倍に希釈することにより調製した抗ヤギIgGアルカリホスファターゼコンジュゲート溶液を、該ブロットに添加し、室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、該ブロットを5分毎にTris緩衝液を4回交換することで洗浄した。BCIP/NBT（5-ブromo-4-クロロ-3'-インドリルホスフェートp-トリジン塩/ニトロブルーテトラゾリウムクロリド）基質を、10ml同時に該ブロットに添加した。ブロットを揺動させながら室温で現像した。Tris緩衝液でブロットをリンスすることにより反応を停止させた。次いで、ヤギ抗マウスIgGの代わりにヤギ抗ヒトIgGを用いて前記手法を繰り返した。

【0188】

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

【0189】

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

【0190】

3. 等電点電気泳動

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

【0191】

0.82mg/mlの公称濃度のLDP-02/3A9/Lot#1を80μl、微量濃縮器に加えた。抗体が入っているクエン酸緩衝液を、160μlのTris緩衝液(0.5mM、pH8.8)で3回交換した。試料の最終容量は、135μlであった。最終濃度は、0.486mg/mlであると計算された。この溶液を、2X IEF試料緩衝液で2倍に希釈して、0.243mg/mlの濃度を得た。3.16μgの蛋白質を生ずる0.243mg/ml溶液に対して13μlのアリコートをし、IEFゲルの指定された試料の上に負荷した。対照のアーティクルは、IEF標準pI3.6~9.3を含んでいた(Sigma、Cat #I-3018)。

【0192】

標準ブロットは、8つのIEF標準の相対的な移動距離の平均をこれらの標準蛋白質のそれぞれに関して公知のpIに対してグラフ化することにより作成した。これらのデータの回帰直線に適合させることにより、0.03459の負の傾斜と8.91857の切片を得た。該適合のR²は、0.99206に等しかった。

【0193】

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

【0194】

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

【0195】

10

【表6-1】

表6

標準	移動距離*	pI ¹
レクチン	3.3 mm	8.8
レクチン	9.5 mm	8.6
レクチン	17.88 mm	8.2
ミオグロビン	59.3 mm	6.8
カルボニックアンヒドラーゼI	74.0 mm	6.6
カルボニックアンヒドラーゼII	92.5 mm	5.9
β-ラクトグロブリンA	105.8 mm	5.1
トリプシンインヒビター	122.0 mm	4.6

20

【0196】

【表 6-2】

試料	移動距離	p I ¹	
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド1)	14.0 mm	8.43	
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド2)	19.0 mm	8.26	
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド3)	24.0 mm	8.09	10
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド4)	28.0 mm	7.95	
LDP-02/3A9/Lot #1 (バンド5)	30.0 mm	7.88	

* 平均 20

¹ 標準曲線に基づく (p I 対移動距離)

ここで:

試料 p I = 切片 - 傾斜 (試料移動距離)。

【0197】

4. アミノ酸組成分析

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

【0198】

まず、三連の 45 μ l アリコートを加水分解用に取り除いた。加水分解は、6N HCl 蒸気を用いて 165℃で 60 分間行なった。対照として、加水分解容器は、LDP-02/3A9/Lot #1 と同時に加水分解される標準蛋白質を含んでいた。また、アミノ酸標準は、LDP-02/3A9/Lot #1 分析の前後にクロマトグラフィーに付した。対照のアーティクルは、標準蛋白質としてウシ血清アルブミン (Tektagen Solution Control:310:197A)、およびアミノ酸標準としてアミノ酸加水分解混合物 (Tektagen Solution Control:310:199A) を含んでいた。

【0199】

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

【0200】

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

【0201】

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

、蛋白質含有量の決定に適用した（表8）。

【0202】

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

【0203】

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

【0204】

【表 7】

表 7

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

¹ - 相関係数は0. 9 5 8であり、これは、それぞれ1. 8 %および2. 4 %
のWおよびCの含有量に基づいている。

【0 2 0 5】

【表 8 - 1】

表 8							
蛋白質含有量の測定							
AA	平均	² 補正係数	補正後	残基	見出された量		
	nmol		nmol	MW	(ng)		
N/D	5.954	0.991	5.900	115.1	679	10	
T	4.243	1.156	4.905	101.1	496		
S	6.054	1.448	8.766	87.1	764		
Q/E	7.436	0.991	7.369	128.1	944		
P	5.365	0.830	4.453	97.1	432		
G	5.080	0.951	4.831	57.1	276		
A	3.884	0.983	3.818	71.1	271		
V	6.681	0.930	6.213	99.1	616		20
M	0.221	2.433	0.538	131.2	71		
I	1.606	1.036	1.664	113.2	188		
L	5.379	0.961	5.169	113.2	585		
Y	3.374	0.954	3.219	163.2	525		
F	2.229	0.992	2.211	147.2	325	30	
H	1.442	0.981	1.415	137.2	194		
K	4.616	0.984	5.542	125.2	582		
R	1.922	1.005	1.392	156.2	302		
カラムに注入した総量 (ng) :					7250		
再構成容量 (μl) :					220		
³ 加水分解した総量 (ng) :					31900		
加水分解した総量 (μg) :					31.9		
元の試料容量 (μl) :					45		

【表 8 - 2】

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

¹ 蛋白質含有量はシステインおよびトリプトファンに対して補正しない。

² BSA由来の補正係数を、検出した各アミノ酸に適用した。

³ 加水分解した全 ng = (注入した全 ng x 再構成容量) / 注入容量 (50 μ l)

【0207】

【表 9】

表 9
アミノ酸組成

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

【0208】

5. MALDI-TOF MS分析

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

【0209】

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

【0210】

B. アフィニティー

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

【0211】

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

【0212】

アフィニティー (および特異性)の相対的評価は、フローサイトメトリーならびにLDP-02およびネズミAct-1抗体の交差競合結合を用いて、逆にヒト由来のHUT-78細胞で行なった。要約すると、 1.0×10^6 個のHUT-78細胞を、種々の濃度の非コンジュゲート化1°HUM ACT-1または非コンジュゲート化ネズミAct-1のいずれかと0.1 μ g/mlのビオチニル化ネズミAct-1 (Lot #2)の100 μ lに、4℃で20分間懸濁した後、抗体を除去した。別々の実験において、100 μ lの0.02 μ g/mlのビオチニル化LDP-02/3A9/Lot #1を、種々の濃度の非コンジュゲート化ネズミACT-1 (Lot #2)および非コンジュゲート化LDP-02/3A9/Lot #1とともに用いた。一定に保たれたビオチニル化抗体の濃度は、前記したように、同一の条件下で染色したHUT-78細胞での最大平均チャンネルフルオレッセンス (MCF)の半値で得られた濃度であった。特に示さない限り、すべて

の試薬は、 $0.15\text{ M PBS} / 1.0\% \text{ FCS} / 0.1\% \text{ アジ化ナトリウム}$ で希釈した。両抗体に対する濃度変化は、 $2.0 \times 10^{-6}\text{ M} \sim 5.0 \times 10^{-11}\text{ M}$ の対数増加の半値にわたっていた。一次抗体の除去後、次に、該細胞を、 $1:200$ に希釈した $100\text{ }\mu\text{l}$ のストレプトアビジンフィコエリスリン (Dako Corp., Carpinteria, CA)に懸濁した。 $200\text{ }\mu\text{l}$ のPBSで洗浄した後、細胞を 0.5 ml のPBS/ 1% ホルマリンに再懸濁し、分析するまで冷凍した。試料は、フィコエリスリンを励起させるために 488 nm のレーザーを用いて、FACSscan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA)で分析した。各試料に対して、最小限 $10,000$ 個の細胞を分析し、MCFを計算した。すべての試料は、二連で行なった。 IC_{50} は、ビオチニル化ホモログ抗体からMCFで 50% の低下を生ずる非コンジュゲート化抗体の濃度として決定された。

10

【0213】

アフィニティーの見積もりは、LDP-02 (1°HUM ACT-1)とネズミACT-1との間の5つの独立した交差競合実験で行なった。ビオチニル化ネズミAct-1を該アッセイで一定に保つ抗体として用いた場合、LDP-02に対する平均 IC_{50} 値 ($\pm 1\text{ SEM}$) ($5.43 \pm 0.86\text{ nM}$)は、ネズミACT-1に対するもの ($7.94 \pm 1.17\text{ nM}$; $p = .02$ 、両側t-検定：平均に対して対の2個の試料)よりも統計学的に低く、一方、無関係なヒトIgG1またはネズミIgG1は、競合的効果を有していなかった(すべての実験を表10に要約する；1つの実験を図16に示す)。同様に、ビオチニル化LDP-02/3A9/Lot #1が該アッセイで一定に保たれた抗体である場合、HuT-78細胞膜からLDP-02を競合除去するのにLDP-02/3A9/Lot #1よりも高い濃度の非コンジュゲート化ネズミAct-1を要した(それぞれ、 $\text{IC}_{50} = 6.3\text{ nM}$ 対 4.3 nM)。各実験において、LDP-02は、ネズミAct-1よりも低い IC_{50} を有した。これらの結果は、LDP-02がネズミAct-1により認識されるエピトープに対して特異的であり、その結合アフィニティーがネズミ抗体のものよりも良好であったことを示唆する。

20

【0214】

【表 10】

表 10

ネズミ ACT-1 およびヒト化 ACT-1 (LDP-02)

アフィニティー評価

実験 #	抗体	Lot #	IC ₅₀ (nM)
1	ACT-1 (ネズミ)	2	7.57
2		2	10.95
3		2	6.02
4		2	4.91
5		2	10.24
		平均±SEM	7.94±1.17
1	LDP-02 (ヒト化)	7	4.34
2		7	6.13
3		8/9	4.71
4		8/9	3.53
5		8/9	8.44
		平均±SEM	5.43±0.86

p = 0.02

両側 t-検定：平均に対して対の2個の試料

【0215】

C. 種の交差反応性

フローサイトメトリーを用いて、種の交差反応性を評価した。ヒト、イヌ、ネコ、モルモットまたはラットから採取した100 μlのEDTA抗凝固血を、FACSチューブに加えた。血漿を除去し、次いで、血液ペレットを、15 μg/mlの濃度でビオチニル化LDP-02/3A9/LOT#1、無関係なビオチニル化ヒトIgG (Jackson Immuno Research, Avondale, PA)、ビオチニル化ネズミAct-1 Lot#2または無関係なビオチニル化ネズミIgG1 (Dako Corp., Carpinteria, CA) のいずれか100 μl中に再懸濁した。特に示さない限り、すべての試薬は、0.15 M PBS/1.0% FCS/0.1%アジ化ナトリウムで希釈した。試料を4℃で20分間抗体とともにインキュベートした後、該抗体を洗浄により除去した。次いで、細胞を4℃で20分間、1:200に希釈したストレプトアビジンフィコエリスリン (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) 100 μlとともにインキュベートした。次いで、赤血球を、製造業者のプロトコールに従って、市販の溶解試薬 (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて溶解した。PBSで洗浄した後、細胞を0.5 mlのPBS/1%ホルマリンに再懸濁し、分析するまで冷凍した。試料は、フィコエリスリンを励起させるために488 nmのレーザーを用いて、FACSscan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) で分析した。リンパ球捕捉ゲートを前方に90度の光散乱パラメー

ターでセットした。各試料に対して、10,000個の細胞を分析した。

【0216】

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

【0217】

D. C1q結合

以前に記載された技術（シムズら、J. Immunol. 151: 2296-2308 (1993))を用いて、フローサイトメトリーを使用してLDP-02のヒト補体成分C1qを結合する能力を評価した。ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を標準フィコール（Ficoll）密度分離により単離した。まず、375,000個の細胞を4℃で10分間、10%正常ウサギ血清/PBSでブロックした。洗浄による除去の後、該細胞を、10μg/mlの（a）CAMPATH-1H（Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U. K.）、（b）ヒトIgG1（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）、（c）LDP-01（2個のアミノ酸置換をIgG1重鎖定常領域に含み（Leu²³⁵→Ala²³⁵およびGly²³⁷→Ala²³⁷）、また、「FcRmut CD18」とも称する、国際公開第93/02191号パンフレット（1993年2月4日公開）およびシムズら、J. Immunol. 151(4): 2296-2308 (1993)に記載された抗CD18抗体の誘導体、Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U. K.）、または（d）LDP-02（1°C hum ACT-1 Lot#8/9）のいずれか100μlとともに、4℃で20分間インキュベートした。CAMPATH-1Hを陽性対照抗体として供し、一方、LDP-01およびヒトIgG1を陰性対照抗体として用いた。すべての試薬を2%BSA/PBSで希釈した。追加の陰性対照として、2%BSA/PBSも単独で加えた。次いで、抗体を洗浄により除去し、細胞を4℃で30分間、10μg/mlのヒト補体成分C1q（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）50μlに再懸濁した。次いで、細胞を洗浄して、20μg/mlのFITC結合ウサギ抗ヒトC1q抗体（Dako Corp., Carpinteria, CA）100μlに4℃で20分間再懸濁した。200μlのPBSで洗浄した後、細胞を0.5mlのPBS/1%ホルマリンに再懸濁し、分析するまで冷凍した。試料は、FITCを励起させるために488nmのレーザーを用いて、FACSscan（Becton Dickinson Corp., San Jose, CA）で分析した。各試料について、最小限10,000個の細胞を分析し、平均チャンネルフルオレッセンス（MCF）を計算した。

【0218】

ヒトPBMCを、CAMPATH-1H結合ヒトC1qとともにインキュベートし、MCFで有意なシフトが生じたが、PBMCのLDP-01、BSAまたはヒトIgG1とのインキュベーションにより誘発された染色パターンはすべて類似しており、相対的に低いバックグランド染色を特徴とした。LDP-02とのPBMCのプレインキュベーションにより生じた染色のパターンは、これらの陰性対照試料で生じたものと同一であり、LDP-02はこれらの条件下ではC1qを結合しないことを示唆した。

【0219】

E. 補体介在溶解

LDP-02/3A9/Lot#1の補体介在細胞溶解に関与する能力を、ビンドン（Bindon, C. I.）ら（Transplantation, 40: 538-544 (1985)）により以前に記載されたプロトコルを用いて調べた。ヘパリン処理したヒト血液を無菌的に吸引し、血漿を回収してすぐに氷上に置いた。末梢血単核細胞（PBMC）は、フィコールハイパーク（Ficoll-Hypaque）、密度1.077g/mlの層に重層して15分間遠心分離することにより単離し、RPMI1640/10%FCS/100U/mlペニシリン/1

10

20

30

40

50

0.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン / 2.0 mM L-グルタミンからなる完全培地で2回洗浄した。次いで、2500万個の細胞を37℃で1時間、150 μCi の⁵¹クロム酸ナトリウム (E. I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE) の滅菌塩水中でインキュベートした。細胞を培地で2回洗浄し、10⁶ / ml に再懸濁した。次いで、培地中に50、25、5、2.5および0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の (a) CAMPATH-1H (Therapeutic Center, Cambridge, U. K.)、(b) CAMPATH-1G (Therapeutic Center, Cambridge, U. K.)、(c) ヒトIgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、(d) LDP-02 / 3A9 / Lot #1、または (e) LDP-01 (FcRmut CD18, Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U. K. (前記参照のこと)) のいずれか100 μl を含むU底マイクロタイタープレートのウェルに、50 μl の懸濁物 (5.0 $\times 10^4$ 個の細胞) を添加した。CAMPATH-1抗体を陽性対照抗体としてアッセイに用い、一方、ヒトIgG1およびLDP-01を陰性対照として用いた。追加のウェルは、完全培地中の0.1% Triton-X-100 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) の100 μl に懸濁した細胞を含んでいた。Triton-X-100とインキュベートした細胞を用いて全放出を測定し、一方、抗体を含まない対照ウェルを用いて自発放出を測定した。室温で15分間のインキュベーション後、補体供給源として50 μl の自己血漿を各ウェルに添加して20%の最終濃度とした。該細胞を37℃で45分間インキュベートし、次いで、100gで2分間遠心分離し、100 μl の上清を回収した。放出された⁵¹Crは、CobraIIガンマカウンター (Packard Instruments, Downers Grove, IL) で測定した。すべての試料は、二連で行なった。特異的⁵¹Cr放出パーセントは、式：

【0220】

【数1】

(試験-自発) $\times 100\%$

特異的放出 = $\frac{\text{試験-自発}}{\text{全体-自発}}$

全体-自発

【0221】

を用いて計算した。

【0222】

ビンドン (Bindon) ら (Transplantation, 40: 538-544 (1985)) により以前に報告されたように、CAMPATH-1HおよびCAMPATH-1Gは両方とも、用量に依存した様式でヒトPBMCの補体介在溶解を35%まで誘発した。さらに、予想されたように、ヒトIgG1およびLDP-01 (Fc-mut CD18) 対照は、いかなる検出可能な細胞溶解をも誘発しなかった。LDP-02は、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までを含む調べたいかなる濃度でも細胞溶解を仲介しなかった (図17)。

【0223】

F. 抗体依存性細胞傷害 (ADCC)

ヒトCD3+芽球を標的細胞として用い、LDP-02の抗体依存性細胞傷害 (ADCC) に関与する能力を評価した。CD3+芽球は、PBSで5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈した抗CD3抗体RT66で被覆した24ウェルプレートで生成した。ヒト末梢血単核細胞 (PBMCs) は、フィコールハイパーク (Ficoll-Hypaque)、密度1.077 g/ml の層に重層して15分間遠心分離することにより単離し、前章で記載したように、完全培地で洗浄および再懸濁した。次いで、200万個の細胞を24ウェルプレートの各ウェルに加え、37℃、5%CO₂で4日間インキュベートした。次いで、細胞をカルチャーフラスコに移し、10ユニット/ ml の濃度のヒト組換えIL-2 (Genzyme Corp., Cambridge, MA) を含む培地で、37℃、5%CO₂でインキュベートした。培養3日後、次に、10.0 $\times 10^6$ 個のCD3芽球を37℃で45分間、150 μCi の⁵¹クロム酸ナトリウム (E. I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE; Lot

10

20

30

40

50

10

【数 2】

20

全体一自発

を用いて計算した。

30

G. MAdCAM-1への接着阻害

【 0 2 2 8 】

40

50

を合成した：

【0229】

【化7】

HindIII
5'-GGAAGCTTCCACCATGGATTTCGGACTGGCCC-3'

【0230】

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

【0231】

【化8】

SpeI
5'-GGACTAGTGGTTTGGACGAGCCTGTTG-3'

【0232】

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

【0233】

CH1、H（ヒンジ）、CH2およびCH3領域を包含する約1kbの断片を、Fc変異ヒト定常領域を有するヒト免疫グロブリンγ1重鎖をコードする構築物からSpeIとEcoRIとの消化により切り出した。その教示がそれぞれ参照によりそのまま本明細書に取り込まれる、シムズら（J. Immunol., 151: 2296-2308 (1993)）およびウォルトマンら（国際公開第93/02191号パンフレット 1993年2月4日（第23頁））により記載されたように、この構築物中のヒト定常領域は、CAMPATH-1H重鎖（ライヒマンら、Nature, 322: 323-327 (1988)）のPCR増幅により得られたものに相当する。この構築物の定常領域中の変異（Leu²³⁵→Ala²³⁵およびGly²³⁷→Ala²³⁷）は、ヒトFcγレセプターへの結合を低下させるように設計され、オリゴヌクレオチド特異的変異導入により生成された。したがって、生成したMAdCAM-Ig融合体は、Leu²³⁵→Ala²³⁵およびGly²³⁷→Ala²³⁷変異の導入を除いて、シムズら（J. Immunol., 151: 2296-2308 (1993)）およびウォルトマンら（国際公開第93/02191号パンフレット）により記載されたSpeI-EcoRI定常領域断片を含む。

【0234】

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

10

20

30

40

50

びPCRで誘導した変異がないことを確認した。キメラをNSO細胞で生成させ、標準的なプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

【0235】

2. 接着アッセイ

高結合型平底96ウェルプレート (Costar) を、炭酸塩緩衝液、pH 9.5で2.5 μg/mlに希釈した50 μlのMAdCAM-1キメラを用いて、37℃で1時間被覆した。次いで、マイクロプレート自動洗浄機 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT)を用いて、洗浄緩衝液 (50 mM Tris HCl、0.14 M NaCl、1 mM MnCl₂、pH 7.2) で1回ウェルを洗浄し、PBSに希釈した10% FBS 100 μlで、37℃で1.5時間ブロックした。

10

【0236】

まず、RPMI 8866細胞 (α4β7を発現する (そしてα4β1を発現しない) ヒトBリンパ腫細胞株 (アール(Erle, D. J.) ら、J. Immunol., 153: 517 (1994); アール博士から供与)) を20 mlのPBS (4℃) で洗浄し、PBS中4.0 × 10⁶ 細胞/mlに再懸濁した。BCECF (2', 7'-ビス-(2-カルボキシエチル)-5-(アンド6)-カルボキシフルオレッセイン, アセトキシメチルエステル; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) を、DMSO中50 μg/mlに再構成し、1:500の最終希釈になるように細胞懸濁物に加えた。37℃で30分間インキュベートした後、次に、細胞をアッセイ緩衝液 (2% ウシ胎仔血清を含むHBSS、25 mM HEPES、ペニシリン/ストレプトマイシン、pH 7.2) で洗浄し、V底96ウェルプレートの各ウェルに50,000個の細胞を加えた。次いで、細胞を、アッセイ緩衝液中に15.0~0.00075 μg/mlの濃度の (a) ネズミAct-1、(b) ネズミIgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、(c) LDP-02/3A9/Lot #1、または (d) ヒトIgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) のいずれか100 μlに室温で10分間再懸濁した。MAdCAM-1キメラで被覆したプレートを洗浄してブロッキング緩衝液を除去し、次いで、これらの蛍光標識されたRPMI 8866細胞を各ウェルに移した。該プレートをアルミホイルで覆って、室温で30分間、40 RPMのプラットホーム振盪機 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) 上に置いた。未結合の細胞を1回の洗浄工程で除去し、続いて洗浄前後に、フルオレッセンス コンセントレーター

20

アナライザー (Fluorescence Concentrator Analyzer) (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME) で蛍光を測定した (485 nmで励起、535 nmで読む)。各ウェルについての結合した細胞のパーセントは、式：

30

【0237】

【数3】

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

【0238】

を用いる相対蛍光単位 (RFU) から計算された。

【0239】

40

LDP-02およびネズミAct-1の両方は、用量に依存した様式で、ヒトMAdCAMへのRPMI 8866細胞の接着を阻害した (図18A~18B)。50%接着を阻害する濃度 (IC₅₀) は、ネズミAct-1 (0.0018 μg/ml) およびLDP-02 (0.0014 μg/ml) に関して相対的に類似していた。したがって、LDP-02は、少なくともネズミAct-1と同じ程度に有効にMAdCAM-1へのα4β7介在接着を機能的に阻害した。

【0240】

実施例5 追加のヒト化抗体

前記したように、実施例2で設計された再形成抗体のいくつかの変異を作製してアフィニティを改良することおよび/または再形成抗体の抗原性を減少させることができる。

50

かかる構築物は、1以上の下記変異：軽鎖のM4V変異、重鎖のR38K変異、重鎖のA40R変異および重鎖のI73T復帰突然変異を有するものを含むがこれに限定されるものではない。変異体は、独立して（例えば、1つの鎖に1つの変異）または種々の組合せで生成させることができる。

【0241】

例えば、図19は、再形成抗体（実施例2で設計された）または軽鎖に1つの追加の変異（MV4）および重鎖に2つの追加の変異（R38K、A40R）を有する誘導体を用いたHuT78染色の結果を示す。これらの2つの抗体は、HuT78細胞で類似の染色パターンを示す（図19）。該変異は、製造業者の提案するプロトコールに従って、トランスフォーマー サイトーディレクテッド ミュータゼネシス キット（Clontech）を用いて核酸配列を変化させることにより作製した。重鎖および軽鎖可変領域の両方の変異は、pCR-ScriptTMにクローニングされた可変領域で作製された。トランスオリゴScal/StuI（Clontech）をトランスオリゴ用に用いた。変異誘発オリゴの配列（配列番号：38～40）は、下記のものであった：

H/R38K（配列番号：38）：

5' - C TGG CCA ACG

H/I73T（配列番号：39）：

5' - CAC ATT GAC TGT AGA CAC TTC CGC TAG C
AC AGC C

L/M4V（配列番号：40）：

5' - CCG GAG GTG ATG TTG TGG TGA CTC

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

【0242】

均等物

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

【0243】

本発明の態様として以下のものが挙げられる。

[1] 免疫グロブリンが非ヒト起源の抗原結合領域およびヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部を含有してなる、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン。

[2] ヒト起源の免疫グロブリンの一部がヒト定常領域に由来するものである [1] 記載のヒト化免疫グロブリン。

[3] ヒト定常領域がガンマ型のものである [2] 記載のヒト化免疫グロブリン。

[4] 抗原結合領域が齧歯類起源のものである [2] 記載のヒト化免疫グロブリン。

[5] 抗原結合領域がAct-1モノクローナル抗体に由来するものである [2] 記載のヒト化免疫グロブリン。

[6] 抗原結合領域が齧歯類起源の相補性決定領域を含有し、ヒト起源の免疫グロブリンの一部がヒト枠組み領域に由来するものである [1] 記載のヒト化免疫グロブリン。

[7] 相補性決定領域がAct-1モノクローナル抗体に由来するものである [6] 記載のヒト化免疫グロブリン。

[8] $\alpha 4 \beta 7$ を結合する非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域およびヒト起源の軽鎖に由来する枠組み領域を含む軽鎖；ならびに

$\alpha 4 \beta 7$ を結合する非ヒト起源の抗体に由来する相補性決定領域およびヒト起源の重鎖に由来する枠組み領域を含む重鎖

を含有してなる、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有するヒト化免疫グロブリン

ン。

〔9〕前記免疫グロブリンが $\alpha 4 \beta 7$ への結合に関してネズミA c t - 1と競合することができるものである〔8〕記載のヒト化免疫グロブリン。

〔10〕軽鎖がA c t - 1抗体の軽鎖に由来する3つの相補性決定領域を含有し、重鎖がA c t - 1抗体の重鎖に由来する3つの相補性決定領域を含有してなる〔8〕記載のヒト化免疫グロブリン。

〔11〕ヒト起源の軽鎖がG M 6 0 7 ' C L抗体の軽鎖である〔8〕記載のヒト化免疫グロブリン。

〔12〕ヒト起源の重鎖がヒト21/28' C L抗体である〔8〕記載のヒト化免疫グロブリン。

10

〔13〕ネズミA c t - 1抗体の軽鎖のC D R 1、C D R 2およびC D R 3ならびにヒト軽鎖枠組み領域を含有してなるヒト化免疫グロブリン軽鎖。

〔14〕ヒト枠組み領域がG M 6 0 7 ' C L抗体の軽鎖に由来するものである〔13〕記載のヒト化免疫グロブリン軽鎖。

〔15〕配列番号：21の可変領域を含有してなる〔14〕記載のヒト化免疫グロブリン軽鎖。

〔16〕〔15〕記載のヒト化免疫グロブリン軽鎖をコードする単離された核酸。

〔17〕配列番号：20の可変領域コーディング配列を含有してなる〔16〕記載の単離された核酸。

〔18〕A c t - 1抗体の重鎖のC D R 1、C D R 2およびC D R 3ならびにヒト重鎖枠組み領域を含有してなるヒト化免疫グロブリン重鎖。

20

〔19〕ヒト枠組み領域がヒト21/28' C L抗体の重鎖に由来するものである〔18〕記載のヒト化免疫グロブリン重鎖。

〔20〕配列番号：19の可変領域を含有してなる〔19〕記載のヒト化免疫グロブリン重鎖。

〔21〕〔20〕記載のヒト化免疫グロブリン重鎖をコードする単離された核酸。

〔22〕配列番号：18の可変領域コーディング配列を含有してなる〔21〕記載の単離された核酸。

〔23〕軽鎖が図7（配列番号：12）に示された軽鎖可変領域アミノ酸配列の少なくとも機能しうる部分を含有するアミノ酸配列を有する、ヒト化免疫グロブリン軽鎖。

30

〔24〕軽鎖が図7（配列番号：12）に示されたシグナルペプチド配列および図7（配列番号：12）に示された軽鎖可変領域アミノ酸配列の少なくとも機能しうる部分を含有するアミノ酸配列を有する、〔23〕記載のヒト化免疫グロブリン軽鎖。

〔25〕〔23〕記載のヒト化免疫グロブリン軽鎖をコードする配列を含有してなる単離された核酸。

〔26〕配列番号：11の可変領域コーディング配列を含有してなる〔25〕記載の単離された核酸。

〔27〕重鎖が図9（配列番号：15）に示された重鎖可変領域アミノ酸配列の少なくとも機能しうる部分を含有するアミノ酸配列を有する、ヒト化免疫グロブリン重鎖。

〔28〕重鎖が図9（配列番号：15）に示されたシグナルペプチド配列および図9（配列番号：15）に示された重鎖可変領域アミノ酸配列の少なくとも機能しうる部分を含有するアミノ酸配列を有する、〔27〕記載のヒト化免疫グロブリン重鎖。

40

〔29〕〔27〕記載のヒト化免疫グロブリン重鎖をコードする単離された核酸。

〔30〕配列番号：14の可変領域コーディング配列を含有してなる〔29〕記載の単離された核酸。

〔31〕遺伝子が $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有する非ヒト抗体の軽鎖に由来するC D Rおよびヒト起源の軽鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含む、ヒト化免疫グロブリン軽鎖をコードする融合遺伝子を含有してなる発現ベクター。

〔32〕非ヒト抗体がネズミA c t - 1抗体である〔31〕記載の発現ベクター。

50

〔33〕〔31〕記載の発現ベクターを含有してなる宿主細胞。

〔34〕遺伝子が $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する結合特異性を有する非ヒト抗体の重鎖に由来するCDRおよびヒト起源の重鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含む、ヒト化免疫グロブリン重鎖をコードする融合遺伝子を含有してなる発現ベクター。

〔35〕非ヒト抗体がネズミA c t - 1抗体である〔34〕記載の発現ベクター。

〔36〕〔34〕記載の発現ベクターを含有してなる宿主細胞。

〔37〕ヒト化免疫グロブリン軽鎖をコードする第1の組換え核酸およびヒト化免疫グロブリン重鎖をコードする第2の組換え核酸を含有してなる宿主細胞であって、

前記第1の核酸はネズミA c t - 1抗体の軽鎖に由来するCDRおよびヒト起源の軽鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含み；ならびに、

前記第2の核酸はネズミA c t - 1抗体の重鎖に由来するCDRおよびヒト起源の重鎖に由来する枠組み領域をコードするヌクレオチド配列を含む、宿主細胞。

〔38〕〔37〕記載の宿主細胞をヒト化免疫グロブリンの発現に適した条件下で維持し、それによりヒト化免疫グロブリン鎖を発現させ、ヒト化免疫グロブリンを産生する工程を含む、ヒト化免疫グロブリンの調製方法。

〔39〕ヒト化免疫グロブリンの単離工程をさらに含む〔38〕記載の方法。

〔40〕a) ネズミA c t - 1モノクローナル抗体に由来する抗原結合領域をコードする第1の核酸配列；および

b) ヒト起源の免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部をコードする第2の核酸配列

を含有してなるヒト化免疫グロブリン軽鎖または重鎖をコードする融合遺伝子。

〔41〕 $\alpha 4 \beta 7$ を産生する第1細胞を〔1〕記載のヒト化免疫グロブリンの有効量と接触させる工程を含む、前記第1細胞とそのリガンドを産生する第2細胞との相互作用を阻害する方法。

〔42〕〔1〕記載のヒト化免疫グロブリンの有効量を患者に投与する工程を含む、粘膜組織の白血球浸潤を阻害する方法。

〔43〕〔1〕記載のヒト化免疫グロブリンの有効量を患者に投与する工程を含む、M A d C A M - 1分子を発現する組織の白血球浸潤に関連する疾患の治療方法。

〔44〕該疾患がM A d C A M分子を発現する腸に関連した内皮への白血球の結合の結果としての組織の白血球浸潤に関連する疾患である、〔43〕記載の方法。

〔45〕〔1〕記載のヒト化免疫グロブリンの有効量を患者に投与する工程を含む、炎症性腸疾患の患者における治療方法。

〔46〕治療または診断における使用のための〔1〕記載のヒト化免疫グロブリン。

〔47〕組織の白血球浸潤に関連する疾患（例えば、炎症疾患）の治療における使用のための〔1〕記載のヒト化免疫グロブリン。

〔48〕炎症性腸疾患の治療における使用のための〔1〕記載のヒト化免疫グロブリン。

〔49〕組織の白血球浸潤に関連する疾患（例えば、炎症疾患）の治療用の医薬の製造のための〔1〕記載のヒト化免疫グロブリンの使用。

〔50〕炎症性腸疾患の治療用の医薬の製造のための〔1〕記載のヒト化免疫グロブリンの使用。

〔51〕〔1〕記載のヒト化免疫グロブリンおよび適当な担体を含有してなる医薬組成物。

【0244】

配列表

SEQUENCE LISTING

(i) APPLICANT: Millennium Pharmaceuticals, Inc.

(A) NAME:

(B) STREET: 75 Sidney Street

(C) CITY: Cambridge

(D) STATE/PROVINCE: Massachusetts

(E) COUNTRY: USA

(F) POSTAL CODE/ZIP: 02139

(G) TELEPHONE: (781) 621-9350

(I) TELEFAX: (781) 621-9349

10

(ii) TITLE OF INVENTION: HUMANIZED IMMUNOGLOBULIN REACTIVE WITH a4b7
INTEGRIN

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 63

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Hamilton, Brook, Smith & Reynolds, P.C.

(B) STREET: Two Militia Drive

(C) CITY: Lexington

(D) STATE: Massachusetts

(E) COUNTRY: USA

(F) ZIP: 02173

20

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: PCT/US97/13884

(B) FILING DATE: 06-AUG-1997

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Brook, David E.

(B) REGISTRATION NUMBER: 22,592

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: LKS95-10

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

40

(A) TELEPHONE: (781) 861-6240

(B) TELEFAX: (781) 861-9540

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 494 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

50

- (C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 13..444

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

```

TTACKRGWMK WCATGRRATG SASCTRKRTC ATYYTCTTCT TGGTATCAAC AGCTACAAGT    60
GTCCACTCCC AGGTCCAACCT GCAGCAGCCT GGGGCTGAGC TTGTGAAGCC TGGGACTTCA    120
GTGAAGCTGT CCTGCAAGGG TTATGGCTAC ACCTTCACCA GCTACTGGAT GCACTGGGTG    180
AAGCAGAGGC CTGGACAAGG CCTTGAGTGG ATCGGAGAGA TTGATCCTTC TGAGAGTAAT    240
ACTAACTACA ATCAAAAATT CAAGGGCAAG GCCACATTGA CTGTAGACAT TTCCTCCAGC    300
ACAGCCTACA TGCAGCTCAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCGGTCTA CTATTGTGCA    360
AGAGGGGGTT ACGACGGATG GGA CTATGCT ATTGACTACT GGGGTCAAGG CACCTCAGTC    420
ACCGTCTCCT CAGCCAAAAC GACACCRYCN CSYKTM MYC YYSBDNNCCC YKGRWSCYTG    480
GNNGAAGCTT GGA                                     494

```

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 144 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS:
(D) TOPOLOGY: linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```

Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Phe Leu Val Ser Thr Ala Thr Ser
1           5           10           15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
          20           25           30

```

50

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

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ser Ser
85 90 95 10

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
130 135 140 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 428 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

30

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 18..428

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

TTACTTGACG ACTCGGG ATG GGA TGG AGC TAT ATC ATC TTC TTC TTG GTA 50
Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Phe Phe Leu Val
1 5 10

TCA ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG 98
Ser Thr Ala Thr Ser Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly
15 20 25

50

GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGG ACT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GGT	146	
Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly		
30 35 40		
TAT GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG	194	
Tyr Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg		
45 50 55		
CCT GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT	242	
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser		10
60 65 70 75		
AAT ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA	290	
Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val		
80 85 90		
GAC ATT TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT	338	
Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser		
95 100 105		20
GAG GAC TCT GCG GTC TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG	386	
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp		
110 115 120		
GAC TAT GCT ATT GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACA TCA GTC ACC	428	
Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr		
125 130 135		

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 137 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Phe Phe Leu Val Ser Thr Ala Thr Ser	
1 5 10 15	
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys	
20 25 30	
Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Tyr Gly Tyr Thr Phe	50

35	40	45	
Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn			
65	70	75	80
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ser Ser			
85	90	95	10
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp			
115	120	125	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr			
130	135		20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 535 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 16..435

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

CGATTACTAG TCGAC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG	51	40
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Leu Leu		
140	145	
TTC TGG ATT CCT GTT TCC GGA GGT GAT GTT GTG GTG ACT CAA ACT CCA	99	
Phe Trp Ile Pro Val Ser Gly Gly Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro		
150	155	160
CTC TCC CTG CCT GTC AGC TTT GGA GAT CAA GTT TCT ATC TCT TGC AGG	147	
Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg		
170	175	180
		50

TCT AGT CAG AGT CTT GCA AAG AGT TAT GGG AAC ACC TAT TTG TCT TGG	195	
Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp		
185 190 195		
TAC CTG CAC AAG CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT	243	
Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile		
200 205 210		
TCC AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TCA	291	10
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser		
215 220 225		
GGG ACA GAT TTC ACA CTC AAG ATC AGC ACA ATA AAG CCT GAG GAC TTG	339	
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu		
230 235 240 245		
GGA ATG TAT TAC TGC TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA	387	
Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly		
250 255 260		20
GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA	435	
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val		
265 270 275		
TCCATCTTCC CACCATCCAG TAAGCTTGGG AATCCATATG ACTAGTAGAT CCTCTAGAGT	495	
CGACCTGCAG GCATGCAAGC TTCCCTATAG TGAGTCGTAT	535	

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 140 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Leu Leu Phe Trp Ile Pro	
1 5 10 15	
Val Ser Gly Gly Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro	
20 25 30	
Val Ser Phe Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	

50

Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
 130 135 140

10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 112 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser
 20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

40

50

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 112 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

20

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

30

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 121 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

50

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Tyr Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

20

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 119 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

50

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 396 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..396

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT CCT 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Leu Leu Phe Trp Ile Pro
 145 150 155

GTT TCC GGA GGT GAT GTT GTG GTG ACT CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT 96
 Val Ser Gly Gly Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 160 165 170

40

GTC AGC TTT GGA GAT CAA GTT TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT 144
 Val Ser Phe Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 175 180 185

CTT GCA AAG AGT TAT GGG AAC ACC TAT TTG TCT TGG TAC CTG CAC AAG 192
 Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys
 190 195 200

50

CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT	240	
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe		
205 210 215 220		
TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC	288	
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
225 230 235		
ACA CTC AAG ATC AGC ACA ATA AAG CCT GAG GAC TTG GGA ATG TAT TAC	336	10
Thr Leu Lys Ile Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr		
240 245 250		
TGC TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG	384	
Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys		
255 260 265		
CTG GAA ATA AAA	396	
Leu Glu Ile Lys		
270		20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 132 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

30

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Leu Leu Phe Trp Ile Pro		
1 5 10 15		
Val Ser Gly Gly Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro	40	
20 25 30		
Val Ser Phe Gly Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser		
35 40 45		
Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys		
50 55 60		
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe		
65 70 75 80		50

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr
100 105 110

Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys
130

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 336 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

30

GATATTGTGA TGA CT CAGTC TCC ACTCTCC CTG CCGGTCA CCCCTGGAGA GCCGGCCTCC 60

ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA GAGCCTCCTC CATAGTAATG GATCAA ACTA TTTGGATTGG 120

TACCTGCAGA AGCCAGGGCA GTCTCCACAG CTCCTGATCT ATTTGGGTTC TAATCGGGCC 180

TCCGGGGTCC CTGACAGGTT CAGTGGCAGT GGATCAGGCA CAGATTTTAC ACTGAAAATC 240

AGCAGAGTGG AGGCTGAGGA TGT TGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGCTCT ACCAACTCCT 300

CAGACGTTTCG GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAA 336

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 420 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid

50

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..420

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ser Thr Ala Thr Ser	
135 140 145	
GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTT GTG AAG	96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys	
150 155 160	
CCT GGG ACT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GGT TAT GGC TAC ACC TTC	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Tyr Gly Tyr Thr Phe	
165 170 175 180	
ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT	192
Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
185 190 195	
GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT	240
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn	
200 205 210	
CAA AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC ATT TCC TCC AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ser Ser	
215 220 225	
ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
230 235 240	
TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC TAT GCT ATT GAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp	
245 250 255 260	
TAC TGG GGT CAA GGC ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA	420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
265 270	

40

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 140 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ser Thr Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

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

20

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ser Ser
 85 90 95

30

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 414 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

50

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..414

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

																10	
ATG	GAG	TTT	GGG	CTG	AGC	TGG	CTT	TTT	CTT	GTG	GCT	ATT	TTA	AAA	GGT	48	
Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly		
145				150				155									
GTC	CAG	TGT	CAG	GTG	CAG	CTT	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTG	AAG	AAG	96	
Val	Gln	Cys	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys		
160				165				170									
CCT	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	GTT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	ACC	TTC	144	
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe		
175				180				185									
ACT	AGC	TAT	GCT	ATG	CAT	TGG	GTG	CGC	CAG	GCC	CCC	GGA	CAA	AGG	CTT	192	
Thr	Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu		
190				195				200									
GAG	TGG	ATG	GGA	TGG	ATC	AAC	GCT	GGC	AAT	GGT	AAC	ACA	AAA	TAT	TCA	240	
Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Ser		
205				210				215				220					
CAG	AAG	TTC	CAG	GGC	AGA	GTC	ACC	ATT	ACC	AGG	GAC	ACA	TCC	GCG	AGC	288	
Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser		
225				230				235									
ACA	GCC	TAC	ATG	GAG	CTG	AGC	AGC	CTG	AGA	TCT	GAA	GAC	ACG	GCT	GTG	336	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
240				245				250									
TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GGA	GGT	TAC	TAT	GGT	TCG	GGG	AGC	AAC	TAC	TGG	384	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Ser	Asn	Tyr	Trp		
255				260				265									
GGC	CAG	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA								414
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
270				275													

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

50

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 138 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

10

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

20

Thr Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp
 115 120 125

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

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 540 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

50

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..540

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

ATG AAA TGC ACC TGG GTC ATT CTC TTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT	48	
Met Lys Cys Thr Trp Val Ile Leu Phe Leu Val Ser Thr Ala Thr Ser		10
140 145 150		
GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTA GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTT AAG AAG	96	
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
155 160 165 170		
CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTC	144	
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe		
175 180 185		20
ACC AGC TAC TGG ATG CAT TGG GTG AGG CAG GCG CCT GGC CAA CGT CTA	192	
Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu		
190 195 200		
GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT	240	
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn		
205 210 215		
CAA AAA TTC AAG GGA CGC GTC ACA TTG ACT GTA GAC ATT TCC GCT AGC	288	
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser		30
220 225 230		
ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACT GCG GTC	336	
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val		
235 240 245 250		
TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC TAT GCT ATT GAC	384	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp		
255 260 265		40
TAC TGG GGT CAA GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG	432	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
270 275 280		
GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG	480	
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
285 290 295		
GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG	528	
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		50

300 305 310 540

GTG ACG GTG TCG
 Val Thr Val Ser
 315

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 180 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

20

Met Lys Cys Thr Trp Val Ile Leu Phe Leu Val Ser Thr Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 50 55 60

30

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

40

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

50

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser
 180

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 413 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1..413

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT CCT 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Leu Leu Phe Trp Ile Pro
 185 190 195

GTT TCC GGA GGT GAT GTT GTG ATG ACT CAA AGT CCA CTC TCC CTG CCT 96
 Val Ser Gly Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 200 205 210

30

GTC ACC CCT GGA GAA CCA GCT TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT 144
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 215 220 225

CTT GCA AAG AGT TAT GGG AAC ACC TAT TTG TCT TGG TAC CTG CAG AAG 192
 Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys
 230 235 240

40

CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT 240
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe
 245 250 255 260

TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC 288
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 265 270 275

ACA CTC AAG ATC TCG CGA GTA GAG GCT GAG GAC GTG GGA GTG TAT TAC 336
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

50

280	285	290	
TGC TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAG			384
Cys Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys			
295	300	305	
GTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCG GCG CC			413
Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro			
310	315		

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 138 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

Met	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Phe	Trp	Ile	Pro
1				5				10					15	

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

30

Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser
		35					40				45				

Leu	Ala	Lys	Ser	Tyr	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys
50						55					60				

Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe
65					70				75					80	

Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
				85					90					95	

40

Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr
		100						105				110			

Cys	Leu	Gln	Gly	Thr	His	Gln	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
		115					120					125			

Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro
130						135			

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

TTTCCGGAGG TGATGTTGTG ATGACTCAAA GTCCACTCTC CCTGCCTGTC ACCCCTGGAG 60

AACCAGCTTC TATCTCTTGC AGGTCTAGTC AGAG 94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 94 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

30

ACTGGCCAGG CTTCTGCAGG TACCAAGACA AATAGGTGTT CCCATAACTC TTTGCAAGAC 60

TCTGACTAGA CCTGCAAGAG ATAGAAGCTG GTTC 94

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

40

- (A) LENGTH: 83 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

CCTGGCCAGT CTCCACAGCT CCTCATCTAT GGGATTTCCT ACAGATTTTC TGGGGTGCCA 60

50

GACAGGTTCA GTGGCAGTGG TTC

83

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 84 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

ACTCGCGAGA TCTTGAGTGT GAAATCTGTC CCTGAACCAC TGCCACTGAA CCTGTCTGGC 60

ACCCAGAAAA ATCTGTTGGA AATC 84 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 67 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

TCTCGCGAGT AGAGGCTGAG GACGTGGGAG TGTATTACTG CTTACAAGGT ACACATCAGC 60

CGTACAC 67

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 86 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

50

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

ATGGCGCCGC ATCAGCCCGT TTTATTTCCA CCTTGGTCCC CTGTCCGAAC GTGTACGGCT 60
GATGTGTACC TTGTAAGCAG TAATAC 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

10

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 93 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

20

ATAAGCTTCG CCATGAAATG CACCTGGGTC ATTCTCTTCT TGGTATCAAC AGCTACAAGT 60
GTCCACTCCC AGGTCCAAC AGTGCACCGG TTA 93

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 93 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

TAACCGGTGC ACTAGTTGGA CCTGGGAGTG GACACTTGTA GCTGTTGATA CCAAGAAGAG 60
AATGACCCAG GTGCATTTCA TGGCGAAGCT TAT 93

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 87 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

50

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

CAACTAGTGC AGTCTGGGGC TGAGGTTAAG AAGCCTGGGG CTCAGTGAA GGTGTCCTGC 60
AAGGGTTCTG GCTACACCTT CACCAGC 87

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 88 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

TAACCGGTAC TCTAGACGTT GGCCAGGCGC CTGCCTCACC CAATGCATCC AGTAGCTGGT 60
GAAGGTGTAG CCAGAACCCT TGCAGGAC 88

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 76 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

CGTCTAGAGT GGATCGGAGA GATTGATCCT TCTGAGAGTA ATACTAACTA CAATCAAAAA 60
TTCAAGGGAC GCGTCA 76

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

50

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 76 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

TAACCGGTGT GCTAGCGGAA ATGTCTACAG TCAATGTGAC GCGTCCCTTG AATTTTTTGAT	60	10
TGTAGTTAGT ATTACT	76	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 88 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:

CCGCTAGCAC AGCCTACATG GAGCTCAGCA GCCTGAGATC TGAGGACACT GCGGTCTACT	60	20
ATTGTGCAAG AGGGGGTTAC GACGGATG	88	30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 88 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:

TCACCGGTGC GGTGACCAGG GTGCCTTGAC CCCAGTAGTC AATAGCATAG TCCCATCCGT	60	40
CGTAACCCCC TCTTGACAAA TAGTAGAC	88	50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 85 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:

CTGGTCACCG TCTCCTCAGC CTCCACCAAG GGCCCATCGG TCTTCCCCCT GGCACCCTCC 60

TCCAAGAGCA CCTCTGGGGG CACAG 85

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 85 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:

TCACCGGTTT GGGGAAGTAG TCCTTGACCA GGCAGCCCAG GGCCGCTGTG CCCCCAGAGG 60

TGCTCTTGGA GGAGGGTGCC AGGGG 85

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

50

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:

CTGGCCAACG

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

(A) LENGTH: 34 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:

20

CACATTGACT GTAGACTT CCGCTAGCAC AGCC

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

CCGGAGGTGA TGTTGTGGTG ACTC

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:41:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:41:

50

TAAGCTTCCG CCATGGGATG GAGC

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:

GGTGACACTA GTGCCTTGAC CCCAG

25

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:

TAAGCTTCCG CCATGAAGTT GCCT

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:

GGCGCCGCAT CAGCCCGTTT T

21

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 20 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:

CGGCGCCATC TGTCTTCATC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

20

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 18 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:

AAGCTTCTAA CACTCTCC

18

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:47:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 19 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS:
 - (D) TOPOLOGY: linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:47:

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Asp
 1 5 10 15

Gly Gln Val

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:48:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 11 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:48:

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
1 5 10

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:49:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:49:

Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:50:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 113 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:50:

50

Lys

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys
65					70					75					80
Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln
				85					90					95	
Ala	Leu	Gln	Xaa	Pro	Arg	Xaa	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				100				105					110		
Ile	Lys														

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:52:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 112 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:52:

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Ala	Lys	Ser
			20					25					30		
Tyr	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ile	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
		50				55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Gly
			85					90					95		
Thr	His	Gln	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100				105					110			

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:53:

50

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 127 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:53:

10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

20

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Xaa Xaa Val Tyr Xaa Tyr Trp
 100 105 110

30

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:54:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 129 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54:

50

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

10

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Gly Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys
 50 55 60

Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala
 65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

20

Cys Ala Arg Ala Pro Gly Tyr Gly Ser Gly Gly Gly Cys Tyr Arg Gly
 100 105 110

Asp Tyr Xaa Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 121 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS:
- (D) TOPOLOGY: linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:55:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

50

	35		40		45										
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Glu	Ser	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
50						55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Ile	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly	Trp	Asp	Tyr	Ala	Ile	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115				120								

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:56:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 35 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

30

- (A) NAME/KEY: modified_base
- (B) LOCATION: 30
- (D) OTHER INFORMATION: /mod_base= i

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:56:

CCCAAGCTTC CAGGGRCCAR KGGATARACN GRTGG

35

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:57:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

50

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:57:

CCCAAGCTTA CGAGGGGAA GACATTTGGG AA

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

(A) LENGTH: 34 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:

20

GGGAATTCAT GRAATGSASC TGGGTYWTYC TCTT

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:59:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 33 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:59:

ACTAGTCGAC ATGAAGWTGT GGBTRAACTG GRT

33

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:60:

40

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 30 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:

50

CCCAAGCTTA CTGGATGGTG GGAAGATGGA

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 39 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:

ACTAGTCGAC ATGGATTTWC ARGTCAGAT TWTCAGCTT

39

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 32 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:

GGAAGCTTCC ACCATGGATT TCGGACTGGC CC

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:63:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 27 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:63:

GGACTAGTGG TTTGGACGAG CCTGTTG

27

【図面の簡単な説明】

【0245】

図面の簡単な説明

50

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

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

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

10

【図4】図4Aは、ネズミA c t - 1 m A bおよびマウスアイソタイプ適合無関係対照抗体（M O P C 2 1 ; I g G 1、カップ）の、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを発現するH u T 7 8細胞を染色する能力を示す蛍光プロットである。図4Bは、(i)キメラA c t - 1抗体、(ii)ヒトアイソタイプ適合無関係対照抗体（I g G 1、カップ）および(iii)C O S - 7細胞上清の、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを発現するH u T 7 8細胞を染色する能力を示す蛍光プロットである。

【図5】図5は、マウスA c t - 1軽鎖可変領域（「A c t - 1 . v l」）のアミノ酸配列（配列番号：7）およびヒトG M 6 0 7 ' C L軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：8）のアラインメントである。同一のアミノ酸を垂直線で示し、類似のアミノ酸を類似性の程度により4個または2個の点で示す。C D Rを括弧で標示し、残基に連続番号を付す。

20

【図6】図6は、マウスA c t - 1重鎖可変領域（「A c t - 1 . v h」）のアミノ酸配列（配列番号：9）およびヒト2 1 / 2 8 ' C L重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：10）のアラインメントである。同一のアミノ酸を垂直線で示し、類似のアミノ酸を類似性の程度により4個または2個の点で示す。C D Rを括弧で標示し、残基に連続番号を付す。

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

【図8】図8は、成熟ヒトG M 6 0 7 ' C L抗体カップ軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号：13）およびアミノ酸配列（配列番号：8）の図である。

30

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

【図10】図10は、ヒト2 1 / 2 8 ' C L抗体重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の図である。可変領域をコードするヌクレオチド配列は、ヒト抗体H G 3 ' C L（レシャビ(Rechavi, G.)ら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80: 855-859 (1983))のV_Hに由来するシグナルペプチド配列をコードするヌクレオチド配列に結合させ、混成配列（配列番号：16および17）を得る。

40

【図11】図11は、重鎖シグナルペプチドを有するヒト化A c t - 1抗体（L D P - 0 2）の重鎖の一部のヌクレオチド配列（配列番号：18）およびアミノ酸配列（配列番号：19）の図である。

【図12】図12は、軽鎖シグナルペプチドを有するヒト化A c t - 1抗体（L D P - 0 2）の軽鎖の一部のヌクレオチド配列（配列番号：20）およびアミノ酸配列（配列番号：21）の図である。

【図13】図13は、ヒト化A c t - 1免疫グロブリン（L D P - 0 2）の軽鎖を作製す

50

るために使用したL 1～L 6と称する重複相補的オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列（配列番号：2 2～2 7）、およびヒト化A c t－1免疫グロブリンの重鎖を作製するために使用したH 1～H 1 0と称する重複相補的オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列（配列番号：2 8～3 7）の図である。

【図1 4】図1 4は、マウスーヒトA c t－1キメラ免疫グロブリン、ヒト化A c t－1免疫グロブリンまたは無関係なヒトアイソタイプ適合対照抗体（I g G 1、カップ）を用いるH u T 7 8細胞の染色を示す蛍光プロットである。

【図1 5】図1 5は、H u T－7 8細胞におけるフローサイトメトリーにより行なったビオチニル化ネズミA c t－1およびヒト化A c t－1（L D P－0 2／3 A 9／L O T # 1、実施例4）の滴定の結果を示すグラフである。

10

【図1 6】図1 6は、対照ネズミI g G 1またはヒトI g G 1と比較した、ネズミA c t－1またはヒト化A c t－1免疫グロブリン（L D P－0 2／3 A 9／L O T # 1、実施例4）によるビオチニル化ネズミA c t－1の結合の競合阻害を示すグラフである。

【図1 7】図1 7は、（a）C A M P A T H－1 H、（b）C A M P A T H－1 G、（c）ヒトI g G 1、（d）L D P－0 2／3 A 9／L O T # 1（実施例4）、または（e）L D P－0 1（ヒト化抗C D 1 8、F c変異）の、5 0、2 5、5、2．5および0．5 μ g／m lの濃度での存在下で、ヒト末梢血単核細胞の補体介在細胞溶解に関する^{5 1}クロム放出アッセイの結果を示すグラフである。

【図1 8 A】図1 8 A～1 8 Bは、 α 4 β 7産生細胞（R P M I 8 8 6 6）のネズミA c t－1（図1 8 A）、ネズミI g G 1（図1 8 A）、L D P－0 2／3 A 9／L o t # 1（図1 8 B）またはヒトI g G 1（図1 8 B）およびヒトM A d C A M－1－I gキメラ（免疫接着）による接着阻害をモニターする接着アッセイの結果を示すグラフである。

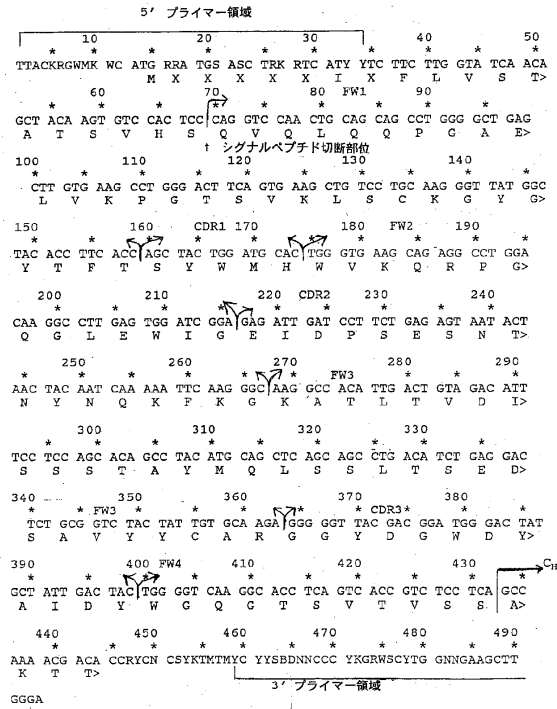
20

【図1 8 B】図1 8 A～1 8 Bは、 α 4 β 7産生細胞（R P M I 8 8 6 6）のネズミA c t－1（図1 8 A）、ネズミI g G 1（図1 8 A）、L D P－0 2／3 A 9／L o t # 1（図1 8 B）またはヒトI g G 1（図1 8 B）およびヒトM A d C A M－1－I gキメラ（免疫接着）による接着阻害をモニターする接着アッセイの結果を示すグラフである。

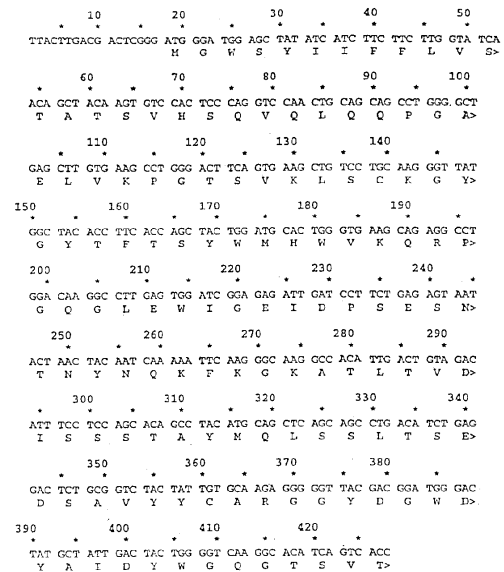
【図1 9】図1 9は、（a）L D P－0 2（F c変異した）、（b）軽鎖に1つの変異（M V 4）と重鎖に二重変異（R 3 8 K、A 4 0 R）を有するL D P－0 2（F c変異した）の誘導体、または（c）無関係なヒトアイソタイプ適合対照抗体（I g G 1、カップ）を用いるH u T 7 8細胞の染色を比較したグラフである。

30

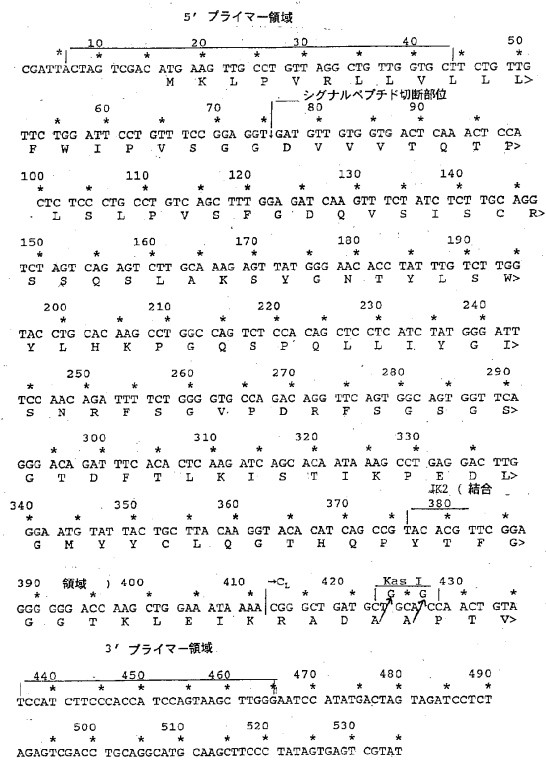
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

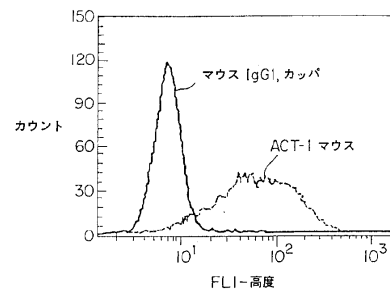


FIG. 4A

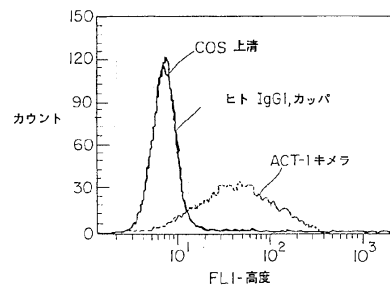


FIG. 4B

【図 5】

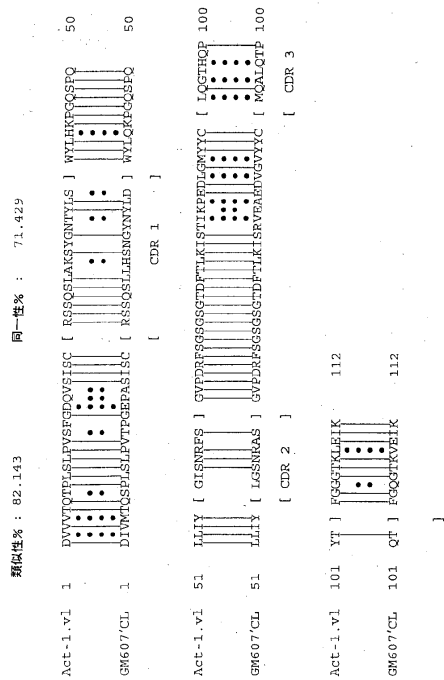


FIGURE 5

【図 6】

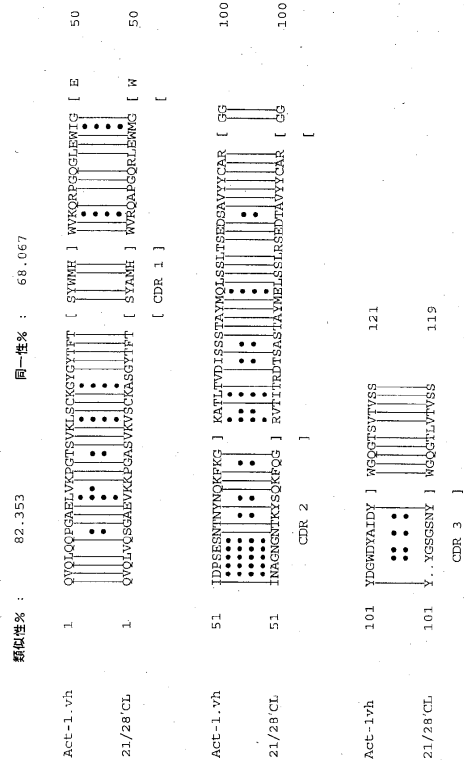


FIGURE 6

【図 7】

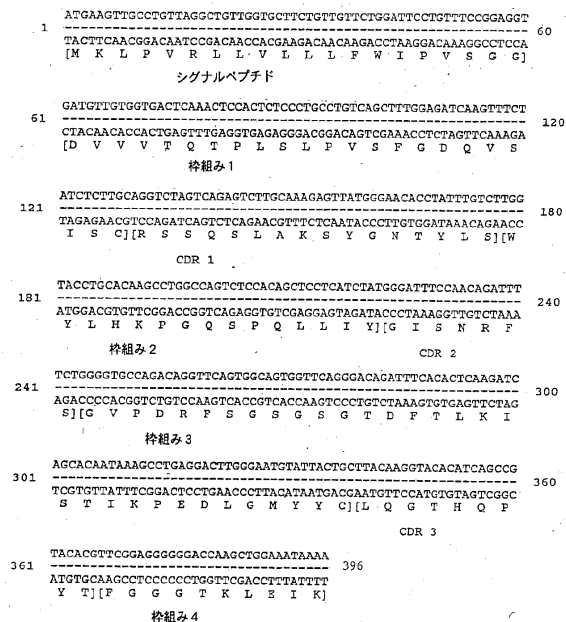


FIG. 7

【図 8】

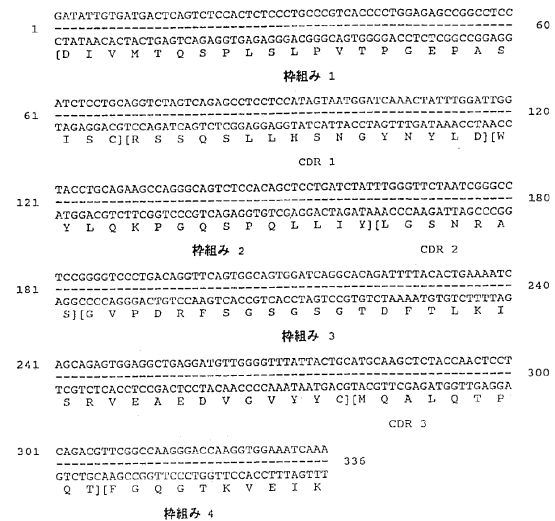


FIGURE 8

【図 9】

1	ATCGGATGACGCTGATATCATCTCTTCTTGGTATCAACAGCTACAAGTGTCCACITCCAG	60
	TACCCTACCTGCAGATATGAGGAGAGAACATAGTGTCCGATGTTACAGGTTGAGGGTTC	
	M G W S C S C I I L F L V S T A T A T [V W H S] Q	
	シグナルペプチド	
61	GTCCACCTCGAGAGCCTCGGGCTGTGTCGAAGCCTGGAGCTTCAGTCAAGCTCTCC	120
	CAGGTTGACGCTCGCGGACCCGACCTCGAACAACCTCGGACCTGAAGTCACTTCGACAGG	
	V Q L Q Q Q P G A E L V K P G T S V K L S	
	組 1	
121	TGCAAGGGTTATGGCTACACCTTCACCAAGCTACTGGATGCACCTGGGTGAACGAGAGCCT	180
	ACGTTCCCAATCGCATGTGGAGTGTGGTGCATGACACTCTGACCCACTTGGCTCTCCGGA	
	C K Y G Y G Y T F T [S Y W M H] [W V K G R P	
	CDR 1	
181	GGACAAGGCCCTTGATGGATCGGAGAGATTGATCTCTTCGAGAGTATATCTAACTACAAT	240
	CTGTCTCCGACACTGAGTGGCTCTCTCATAGGAGACTCTCATATGATGATGATGTTA	
	C G G L E W I G [E I D P S E S N T Y N Y	
	組 2	CDR 2
241	CAAAAATTCGAGGCGAGGCCCACTTGACTGTAGACATTTCCCTCCAGCAGCACTACATG	300
	CTTTTAAAGTTCCCGTCCCGGTGAATGACATCTGTAAAGAGAGCTCGTGTGAGATGAC	
	Q K F K G [K A T L T V D I S S S T A Y M	
	組 3	
301	CAGCTCAGCAGCCTGACMTCTGAGGACTCTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGSGGTTAC	360
	GTCCAGTCTGCTCGGACTGTAGCACTCTGAGAGCCGACATGATAACACTTTCTCCCAACT	
	G L S L S T E S D S A V Y Y C A R [G G A Y	
361	GACGGATGCGACTATGCTATGTACTACTTGGGCTCAAGGCACTCTAGTCAACGTTCTCTCA	420
	CTGCTACCTCGTAGAGATATCACTGATCCCGAGTTCCGTGAGATCGTGCAGAGAGAT	
	D G W D Y A I D Y [W G G T F S V T V S S]	
	CDR 3	組 4

FIGURE 9

【図 10】

1	ATCGAGCTTGGGGAGAGCTGGCTTTCTTCTGGGCTATTTTAAAGGAGTCTCCAGCTGTAC	50
	TACCTCAACCCGGAGCTGCAGCCGAAGAAGACACCGTAAATTTTCCACAGGCTCAGAGT	
	[M E F A S L S W L F L V A I L K G G V Q C] [Q	
	シグナルペプチド	
61	GTGCAAGCTTCTGCAGGTCTGGGGCTGAGTGGAAGAGCTGGGGCTCTCAGTGAAGGTTTCC	120
	CACGTGCAGACAGGTGAGACCCGAGCTCCACTCTTCGGACCCCGAGTACTCTCAAAGG	
	V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S	
	枠組み 1	
121	TGCAAGGCTTCGGATACACCTTCACTAGCTATGCTATGATCGTTGGGTGCGCCAGGCCCCC	180
	AGGTTCCGAGACACTCTTCGGAAGTGGTACAGTACATGTCAGACCCGGGTCCGGGG	
	C K A S C Y T F T] (S Y A M H] [W V R Q A P	
	CDR 1	
181	GGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGATGATCAGCCTGGCAATGGTAACACAAATATTCA	240
	CCCTGTTCCGAATCACTACCTCCACTAGTTCAGGACCGTACACTCTGTCTTTATAAGT	
	G Q R L E W M G] [W I N A G N G N T K Y S	
	枠組み 2	
241	CAGAACTTCCAGGCGAGAGTCACATTACCGAGGACACATCCGGAGCAGCAGGCTCATG	300
	GTCTTCAGAGTCCCGCTCTCAGTGGTATGTGCTCCTGTAGCGCTCTGTGTCGATGTAC	
	Q K F Q G] [R V T I T R D T S A S T A Y	
	CDR 2	
301	GAGCTGAGCAGGCTTGAGATCTGAAGACAGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGCTTAC	360
	CTCGACTGCTCGGACTCTTAGACTTCTGTGCGGACAGATATGACAGCCTCTCTCCGAATG	
	E L L S S L R S E D T A V Y A C A R] [G G Y	
	枠組み 3	
361	TATGGTTCGGGGAGCAACTCTGSGGCGGAGACCGTGTCAACCTCTCTCTCA	414
	ATACCAAGCCCTCGTGTGATACCCCGTCCCTTGGGACAGTGGCAGAGGGT	
	Y G S S S N Y] [W G Q G T L V T V G S S]	
	CDR 3	
	枠組み 4	

FIGURE 10

【図 1 1】

[illegible]

FIG. 11

【図 1 2】

```

10      20      30      40
ATG  AAG  TTG  CCT  GTT  AGR  CTG  TTG  GTG  CTT  CTG  TTG  TTC  TGG  AIT  CCT
M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  L  L  T  G  W  I  I  P>

50      60      70      80      90
BspEI
GTT  TCC  GGA  GGT  GAT  GTT  GTG  ATC  ACT  CAA  AGT  CCA  CTC  TCC  CTG  C>
   S  G  G  D  V  V  M  T  Q  P  L  S  P  L  S  CT>

100      110      120      130      140
GTC  ACC  CCT  GGA  GAA  CCA  GCT  TCT  ATC  TCT  TGC  AGC  TCT  AGT  CAG  ACT
V  T  P  P  G  E  P  A  S  I  S  C  R  S  C  Q  S  >

150      160      170      180 Asp 718      190
CTT  GCA  AAG  AGT  TAT  GGC  AAC  ACC  TAT  TTG  TCT  TGG  TAC  CTG  CAG  AAG
A  A  K  S  Y  G  N  T  Y  L  S  W  Y  L  Q  K  >

200      210      220      230      240
*MscI
CCT  GGC  CGC  TCT  CCA  CAC  CTC  ATC  ATC  TAT  GGG  ATT  TCC  AAC  AGA  TTT
P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  G  G  I  S  N  R  F  >

250      260      270      280
TCT  GGG  GTG  CCA  GAC  AGG  TTC  AGT  GGC  AGT  GGT  TCA  GGG  ACA  GAT  TTC
T  L  V  P  D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  >

290      300 NruI      310      320      330
ACA  CTC  AAG  ATC  TCG  CGA  GTA  GAG  GGT  GAG  GAC  GTG  GGA  GTC  TAT  TAC
T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y  >

340      350      360      370      380
TGC  TTA  CAA  GGT  ACA  CAT  CAC  CCG  TAC  ACT  TFC  GCA  CAG  GCG  AAC  AAG
C  L  Q  T  H  Q  R  Y  T  F  G  Q  I  Q  S  G  T  K  >

390      400      410 Kas I
GTG  GAA  ATA  AAA  CGG  GCT  GAT  GCG  GCG  CC
V  E  I  K  R  A  D  A  A  A  P>

```

FIG. 12

【図 13】

軽鎖オリゴ		二本鎖断片	
L1	5'- TTT CCG GAG GTG ATG TTG TGA TGA CTC AAA GTC CAC TCT CCC TGC CIG TCA CCC CTG GAG AAC CAG CTT CTA TCT CTT GCA GGT CTA GTC AGA G	LA	
L2	5'- ACT GGC CAG GCT TCT GCA GGT ACC AAG ACA AAT AGG TGT TCC CAT AAC TCT TTG CAA GAC TCT GAC TAG ACC TGC AAG AGA TAG AAG CTG GTT C	LB	
L3	5'- CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAG AGG TTC AGT GGC AGT GGT TC	LC	
L4	5'- ACT CCG GAG ATC TTG AGT GTG AAA TCT GTC CCT GAA CCA CTG CCA CTG AAC CTG TCT GGC ACC CCA GAA AAT CTG TTG GAA ATC		
L5	5'- TCT CCG GAG TAG AGG CTG AGG ACG TGG GAG TGT ATT ACT GCT TAC AAG GTA CAC ATC AGC CGT ACA C		
L6	5'- ATG GCG CCG CAT CAG CCC GGT TTA TTT CCA CTT TGG TCC CCT GTG CGA ACG TGT ACG GCT GAT GTG TAC CTT GTA AGC AGT AAT AC		
重鎖オリゴ		二本鎖断片	
H1	5'- ATA AGC TTC GCC ATG AAA TGC ACC TGG GTC ATT CTC TTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTA GTG CAC CGG TTA	HA	
H2	5'- TAA CCG GTG CAC TAG TTG GAC CTG GGA GTG GAC ACT TGT AGC TGT TGA TAC CAA GAA GAG AAT GAC CCA GGT GCA TTT CAT GGC GAA GCT TAT		
H3	5'- CAA CTA GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTT AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC	HB	
H4	5'- TAA CCG GTA CTC TAG AGC TTG GCC AGG CCG CTG CCT CAC CCA ATG CAT CCA GTA GCT GGT GAA GGT GTA GCC AGA ACC CTT GCA GGA C		
H5	5'- CGT CTA GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGA CGC GTC A	HC	
H6	5'- TAA CCG GTG TGC TAG CGG AAA TGT CTA CAG TCA ATG TGA CCG GTC CCT TGA ATT TTT GAT TGT AGT TAG TAT TACT		
H7	5'- CCG CTA GCA CAG CCT ACA TGG AGC TCA GCA GCC TGA GAT CTG AGG ACA CTG CCG TCT ACT ATT GTG CAA GAG GGG GTT ACG ACG GAT G	HD	
H8	5'- TCA CCG GTG CCG TGA CCA GGG TGC CTT GAC CCC AGT AGT CAA TAG CAT AGT CCC ATC CGT AAC CCC CTC TTG CAC AAT AGT AGA C		
H9	5'- CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA G	HE	
..H10	5'- TCA CCG GTT CCG GGA AGT AGT CCT TGA CCA GGC AGC CCA GGG CCG CTG TGC CCC CAG AGG TGC TCT TGG AGG AGG GTG CCA GGG G		

FIGURE 13

【図 14】

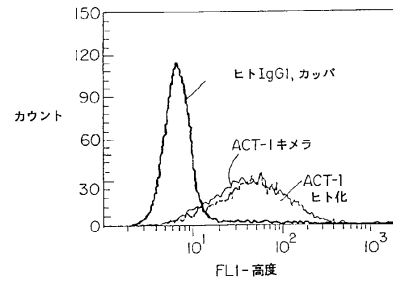


FIG. 14

【図 15】

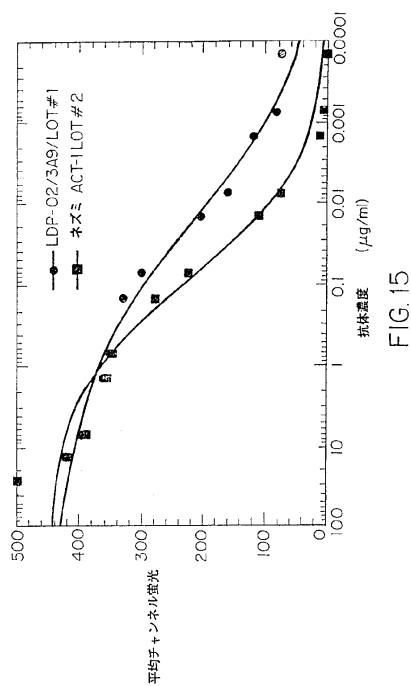


FIG. 15

【図 16】

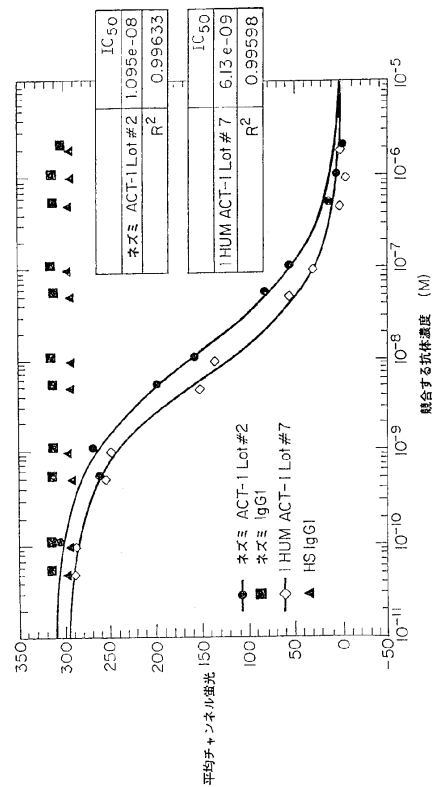
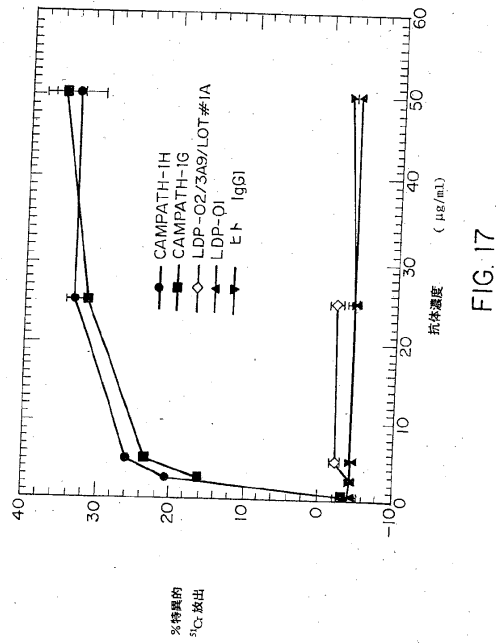
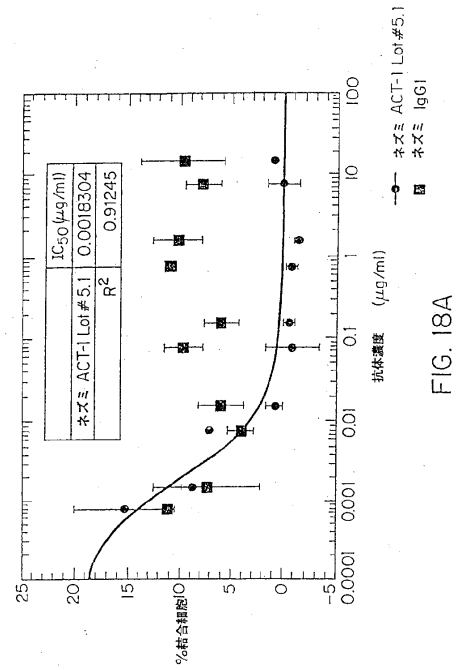


FIG. 16

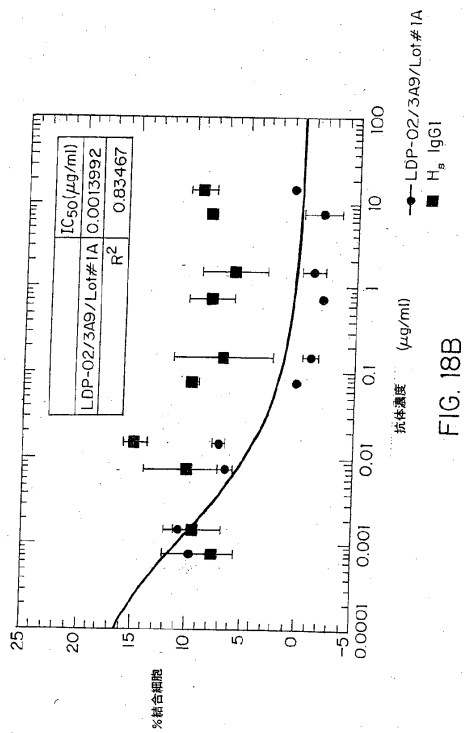
【図 17】



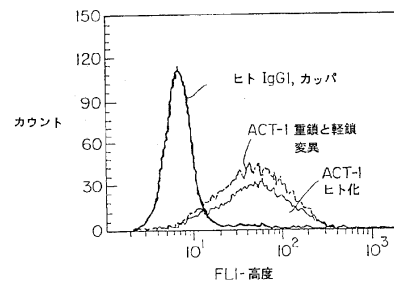
【図 18 A】



【図 18 B】



【図 19】



フロントページの続き

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

審査官 赤坂 祐樹

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

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/53-33/68
C12N 15/00-15/90

专利名称(译)	人源化免疫球蛋白与α4β7整联蛋白反应		
公开(公告)号	JP4578536B2	公开(公告)日	2010-11-10
申请号	JP2008120608	申请日	2008-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	米伦纽姆医药公司		
申请(专利权)人(译)	千年制药公司		
当前申请(专利权)人(译)	千年制药公司		
[标]发明人	ポナスポールディー リングラーダグラスジェイ ジョーンズエスタラン ニューマンウォルター サルダニャホセ ベンディグマリーエム		
发明人	ポナス,ポール,ディー. リングラー,ダグラス,ジェイ. ジョーンズ,エス.,タラン ニューマン,ウォルター サルダニャ,ホセ ベンディグ,マリー,エム		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K16/46 C12N15/09 A61K38/00 A61K39/395 A61P1/00 A61P29/00 A61P37/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/531		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P29/00 C07K14/70503 C07K16/2839 C07K2317/24 C07K2319/00		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K16/18 C07K16/46 C12N15/00.A G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	08/700737 1996-08-15 US		
其他公开文献	JP2008281562A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为炎症性肠病提供改进的治疗方法。在适合人源化免疫球蛋白的条件下使样品与人源化免疫球蛋白接触以特异性结合α4β7整联蛋白，和检测形成的抗体-α4β7整联蛋白复合物 其中人源化免疫球蛋白包含非人源轻链可变区的三个互补决定区（CDR1，CDR2和CDR3），至少一个和至少一个并从来源的轻链可变区衍生的重链可变区框架区和非人源的三个互补决定区的人来源的重链可变（CDR1，CDR2和CDR3）包含衍生自区域的框架区的抗原结合区，所述互补决定区包括：轻链：SEQ ID NO：12的CDR1氨基酸44-59 SEQ ID NO：12的CDR2氨基酸75-81 SEQ ID NO：12的CDR3氨基酸114-122 重链：SEQ ID NO：15的CDR1氨基酸50-54 SEQ ID NO：15的CDR2氨基酸69-85 SEQ ID NO：15的CDR3氨基酸118-129 具有图1中所示的氨基酸序列。【选择图】无

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