

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-357712

(P2004-357712A)

(43) 公開日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 4
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/02	4 B O 6 5
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06	4 C O 8 5
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-201096 (P2004-201096)	(71) 出願人	597011463
(22) 出願日	平成16年7月7日(2004.7.7)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(62) 分割の表示	特願平5-238180の分割		スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ
原出願日	平成5年9月24日(1993.9.24)		ユトラーセ 35
(31) 優先権主張番号	9220228:2	(71) 出願人	592089191
(32) 優先日	平成4年9月24日(1992.9.24)		タノックス バイオシステムズ インコー
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ポレイテッド
(31) 優先権主張番号	952802		TANOX BIOSYSTEMS IN
(32) 優先日	平成4年9月25日(1992.9.25)		CORPORATED
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 テキサス州77025
			ヒューストンステラ リンク ロード 1
			0301
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100077517
1. UNIX			弁理士 石田 敬
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリンイソタイプに対する再形状化されたモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 再形状化されたヒトモノクローナル抗体、それを用いてのアレルギーの診断、予防及び処理に関する。

【解決手段】 免疫グロブリンE (I g E) のイソタイプ決定基に対して向けられた再形状化されたヒトモノクローナル抗体及びその誘導体に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

順に超可変部 C D R 1 , C D R 2 及び C D R 3 を含んで成る抗原結合部位を含んで成る、I g E に対して特異的な再形状化されたヒトモノクローナル抗体；ここで前記 C D R 1 がアミノ酸配列 Met-Tyr-Trp-Leu-Glu を有し、前記 C D R 2 がアミノ酸配列 Glu-Ile-Ser-Pro-Gly-Thr-Phe-Thr-Thr-Asn-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Ala を有し、前記 C D R 3 が配列 Phe-Ser-His-Phe-Ser-Gly-Ser-Asn-Tyr-Asp-Tyr-Phe-Asp-Tyr を有し、前記再形状化されたヒト抗体がネズミ C D R - ドナー抗体 T E S - C 2 1 の親和性に少なくともほぼ等しい抗原結合親和性を有し；前記再形状化された抗体の直接的な同等物又は誘導体。

【請求項 2】

a) 順に超可変部 C D R 1 , C D R 2 及び C D R 3 を含んで成る第 1 ドメイン；ここで前記 C D R 1 がアミノ酸配列 Met-Tyr-Trp-Leu-Glu を有し、前記 C D R 2 がアミノ酸配列 Glu-Ile-Ser-Pro-Gly-Thr-Phe-Thr-Thr-Asn-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Ala を有し、前記 C D R 3 が配列 Phe-Ser-His-Phe-Ser-Gly-Ser-Asn-Tyr-Asp-Tyr-Phe-Asp-Tyr を有し；及び

b) 順に超可変部 C D R 1 , C D R 2 及び C D R 3 を含んで成る第 2 ドメイン；ここで前記 C D R 1 はアミノ酸配列 Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Thr-Asn-Ile-His を有し、前記 C D R 2 がアミノ酸配列 Tyr-Ala-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser を有し、前記 C D R 3 がアミノ酸配列 Gln-Gln-Ser-Asp-Ser-Trp-Pro-Thr-Thr を有し；を含んで成る抗原結合部位を含んで成り、前記再形状化されたヒト抗体がネズミ C D R - ドナー抗体 T E S - C 2 1 の親和性に少なくともほぼ等しい抗原結合親和性を有する請求項 1 記載の再形状化されたヒト抗体。

【請求項 3】

(a) 順に超可変部 C D R 1_H , C D R 2_H 及び C D R 3_H 並びにヒト H 鎖の不変部又はそのフラグメントを含んで成る免疫グロブリン H 鎖又はそのフラグメント；ここで前記 C D R 1_H はアミノ酸配列 Met-Tyr-Trp-Leu-Glu を有し、前記 C D R 2_H がアミノ酸配列 Glu-Ile-Ser-Pro-Gly-Thr-Phe-Thr-Thr-Asn-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Ala を有し、前記 C D R 3_H がアミノ酸配列 Phe-Ser-His-Phe-Ser-Gly-Ser-Asn-Tyr-Asp-Tyr-Phe-Asp-Tyr を有し；及び

(b) 順に超可変部 C D R 1_L , C D R 2_L 及び C D R 3_L を含んで成る L 鎖可変ドメイン並びにヒト L 鎖の不変部又はそのフラグメントを含んで成る免疫グロブリン L 鎖又はそのフラグメント；ここで前記 C D R 1_L がアミノ酸配列 Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Thr-Asn-Ile-His を有し、前記 C D R 2_L がアミノ酸配列 Tyr-Ala-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser を有し、前記 C D R 3_L がアミノ酸配列 Gln-Gln-Ser-Asp-Ser-Trp-Pro-Thr-Thr を有する；を含んで成る請求項 2 記載の再形状化されたヒト抗体。

【請求項 4】

(a) 1 位でのアミノ酸で開始し、そして 1 2 3 位でのアミノ酸で終結する配列番号 1 1 に示される配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメイン及びヒト H 鎖の不変部を含んで成る H 鎖；及び

(b) 1 位でのアミノ酸で開始し、そして 1 0 7 位でのアミノ酸で終結する配列番号 5 に示される配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメイン及びヒト H 鎖の不変部を含んで成る L 鎖を含んで成る請求項 2 記載の再形状化されたヒト抗体。

【請求項 5】

(a) 1 位でのアミノ酸で開始し、そして 1 2 3 位でのアミノ酸で終結する配列番号 1 3 に示される配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメイン及びヒト H 鎖の不変部を含んで成る H 鎖；及び

(b) 1 位でのアミノ酸で開始し、そして 1 0 7 位でのアミノ酸で終結する配列番号 5 に示される配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメイン及びヒト H 鎖の不変部を含んで成る L 鎖を含んで成る請求項 2 記載の再形状化されたヒト抗体。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

前記 H 鎖が H 鎖ヒト不変部 r 1 及びその誘導体を含んで成る請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の再形状化されたヒト抗体。

【請求項 7】

前記 H 鎖が H 鎖ヒト不変部 r 1 を含んで成り、そして前記 L 鎖が L 鎖ヒト不変部 及びその誘導体を含んで成る請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項記載の再形状化されたヒト抗体。

【請求項 8】

細胞系 E H 3 1 . 8 により生成された H 3 L 1 と命名された請求項 5 記載の再形状化されたヒト抗体又はその誘導体。

【請求項 9】

細胞系 E H 1 1 . 1 3 により生成された H 1 L 1 と命名された請求項 4 記載の再形状化されたヒト抗体又はその誘導体。 10

【請求項 10】

請求項 1 記載の再形状化されたヒト抗体の誘導体。

【請求項 11】

請求項 1 記載の再形状化されたヒト抗体、その直接的な同等物又は誘導体の調製方法であって、本発明のタンパク質を生成する適切な宿主を培養し、そして必要なら、前記タンパク質を単離し、そして場合によってはそれを誘導体に転換することを含んで成る方法。

【請求項 12】

a) 選択的に F R 及び C D R を含んで成る可変ドメインをコードする第 1 部分、ここで前記 C D R が順に C D R 1_H , C D R 2_H 及び C D R 3_H であり、そのアミノ酸配列が請求項 3 に同定されており、及び場合によっては、 20

b) ヒト H 鎖不変部又はそのフラグメントをコードする第 2 部分を含んで成る、H 鎖又はそのフラグメントをコードする D N A 構造体。

【請求項 13】

a) 選択的に F R 及び C D R を含んで成る可変ドメインをコードする第 1 部分、ここで前記 C D R が順に C D R 1_L , C D R 2_L 及び C D R 3_L であり、そのアミノ酸配列が請求項 3 に同定されており、及び場合によっては、

b) ヒト L 鎖不変部又はそのフラグメントをコードする第 2 部分を含んで成る、L 鎖又はそのフラグメントをコードする D N A 構造体。

【請求項 14】 30

請求項 1 2 記載の D N A 構造体及び / 又は請求項 1 3 記載の D N A 構造体を含んで成るハイブリッドベクター。

【請求項 15】

請求項 1 4 記載のハイブリッドベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 16】

細胞系 E H 1 1 . 1 3 である請求項 1 5 記載の宿主細胞。

【請求項 17】

細胞系 E H 3 1 . 8 である請求項 1 5 記載の宿主細胞。

【請求項 18】

ヒトにおけるアレルギー反応の予防及び / 又は処理に使用するための再形状化されたヒト抗体、その直接的な同等物及び / 又は誘導体。 40

【請求項 19】

請求項 1 記載の抗体、その直接的な同等物及び / 又は誘導体、及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る医薬組成物。

【請求項 20】

I g E の定質又は定量測定への請求項 1 記載の抗体、その直接的な同等物及び / 又は誘導体の使用。

【請求項 21】

請求項 1 記載の抗体、その直接的な同等物及び / 又は誘導体を含んで成る、I g E の定質又は定量測定のための試験キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫グロブリンE (I g E) のイソタイプ決定基に対して向けられた再形状化されたヒトモノクローナル抗体及びその誘導体に関する。前記抗体及びそれらの誘導体はアレルギーのインビトロ及びインビボ診断、予防及び処理のために有用である。

アレルギーは、外来性物質 (アレルゲン) に対する過大な免疫応答により誘発される過敏性状態である。アレルゲンとの接触のすぐ後でのアレルギー反応により特徴づけられる即座 (タイプ I) 過敏性は、B細胞により仲介され、そして抗原 - 抗体反応に基づけられており、そして遅延された過敏性はT細胞により仲介され、そして細胞免疫性の機構に基づかれています。最近、用語“アレルギー”とは、タイプI過敏性とますます同義になって来ている。

【0002】

即座過敏性は、アレルゲンとの接触に基づいて、抗体分泌性血漿細胞に分化するB細胞による免疫グロブリンクラスEの抗体 (I g E 抗体) の生成に基づかれる。I g E 誘発された反応は、身体のアレルゲン侵入の部位、すなわち粘膜表面及び/又は局所のリンパ節で生じる局所的な出来事である。局所的に生成されるI g E はまず、局所的な肥満細胞を敏感にし、すなわちI g E 抗体は、肥満細胞の表面上のF c_εレセプターにそれらの不変部により結合し、そして次に、“あふれた (s p i l l - o v e r) ” I g E が循環中に侵入し、そして身体を通しての循環性好塩基球及び組織固定された肥満細胞上のレセプターに結合する。結合されたI g E が続いてアレルゲンと接触される場合、F c_εレセプターが、アレルゲンの結合により架橋され、これに基づいて、細胞が脱顆粒化し、そして多くのアナフィラキシーメディエーター、たとえばヒスタミン、プロスタグランジン、ロイコトリエン、等を放す。それは、即座過敏性に典型的な臨床学的徴候、すなわち呼吸器又は腸の平滑筋の収縮、小さな血管の拡張及び水及び血漿タンパク質に対するそれらの透過性の上昇、たとえば鼻炎、アトピー性エグゼマ (e x c e m a) 及びぜんそくをもたらす粘膜の分泌、及びかゆさ及び苦痛をもたらす皮膚における神経末端の刺激を担当するそれらの物質の開放である。

【0003】

さらに、アレルゲンとの二次接触に基づく反応が、細胞表面上にI g E を表わすことによってアレルゲンとの一次接触の後、いくらかのB細胞が表面I g E 陽性B細胞 (s I g E⁺B細胞) の“記憶プール”を形成するので、増強される。

アレルギーの処理のための有望な概念は、I g E イソタイプ特異的であり、そして従って、I g E を結合することができるモノクローナル抗体の適用を包含する。このアプローチは、アレルギーの誘発における初期出来事であり、そしてアレルギー状態の維持を提供する、I g E 免疫応答をダウンレギュレーションすることによってアレルギー反応の阻害に基づかれています。他の抗体種類の応答は影響されないので、アレルギー徴候に対する即座及び長く続く効果が達成される。さらに、抗 - アレルギー剤として適切な抗体は、I g E 生成血漿細胞である表面I g E 陽性B細胞と接触し、その結果、それらはそれらのB細胞を機能的に排除するように使用され得る。しかしながら、原理上、I g E に対する抗体がまた、F c_εレセプターを架橋することによってI g E 感受性化肥満細胞からのメディエーター開放を誘発し、従って血清I g E 及びs I g E⁺B細胞レベルに及ぼす有益な効果に対抗する。結果的に、アレルギーの治療に適用できる抗体は、感受性化された肥満細胞及び好塩基性球上に結合されるI g E と反応することができるべきでないが、しかしs I g E⁺B細胞を認識する能力を保持すべきである。

【0004】

そのようなI g E イソタイプ特異的抗体は、Changなど (B i o t e c h n o l o g y 8 , 1 2 2 - 1 2 6 (1 9 9 0)) により、PCT出願第89/06138号及びヨーロッパ特許出願第396505号に記載されている。しかしながら、開示される抗体はヒト起源のものではないので、それらは、外来性タンパク質としてのそれらの免疫原

10

20

30

40

50

性、循環におけるそれらのかなり長い持続性、及び損傷免疫複合体の考えられる形成により、ヒトへの適用のためにほとんど適切ではない。それらの欠点は、ゲッ歯動物の抗体の可変ドメインとヒト抗体不変ドメインとを組合すキメラ抗体に、ゲッ歯抗-IgEモノクローナル抗体形質転換することによって実質的に減じられ得る。このアプローチは、ゲッ歯動物の親の抗-IgE抗体の抗原結合部位を保存し、そしてヒトイソタイプ及びエフェクター機能を付与する。しかしながら、ヒトへの使用のためには、そのようなキメラ抗体は、元のゲッ歯動物の抗体よりも十分な臨床学的利点を有さない。

【0005】

キメラ抗体の免疫原性は、また相補的決定領域(CDR)と呼ばれるゲッ歯動物の超可変部を、再形状化されたヒト抗体をもたらすヒトL及びH鎖可変部ドメインの骨格中に移植することによってさらに減じられ得る。この技法は、“一般的”なヒトH及びL鎖可変ドメイン内でのそれらの存在のために抗原特異的ゲッ歯動物のCDR配列の置換又は組換え移植を包含する(ヨーロッパ特許出願第239,400号)。この技術はヒト抗体への抗原結合部位の臨界及び主要部分をトランスファーするであろうことが推定される。

10

【0006】

天然の損なわれていない免疫グロブリン又は抗体は一般的に、個々の上部アームの末端で抗原結合部位を有するY形状テトラマー分子を含んで成る。抗原結合部位は、L鎖の可変ドメインに関連するH鎖の可変ドメインから成る。より詳しくは、抗体の抗原結合部位は、H鎖(V_H)の可変ドメインの3CDR及びL鎖(V_L)の可変ドメインの3CDRにより実質的に形成される。 V_L 及び V_H の両者において、CDRは、下記一般式(I)

20

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (I)

[式中、ポリペプチド鎖はN-末端で始まり、そしてC-末端で終結するように記載される]で表わされるポリペプチド鎖を形成する4種の骨格領域(FR)と共に交互に並ぶ。 V_H 及び V_L のCDRはまた、それぞれH1, H2, H3及びL1, L2, L3としても言及される。FR又はCDRを構成することに関する決定は通常、同じ種に生じる多くの抗体のアミノ酸配列を比較することによって行なわれ、そして同定のための一般的な規則は当業界において知られている(“Sequences of proteins of immunological interest”, Kabat E. A. など., U S department of health and human service, Public health service, National Institute of Health)。

30

【0007】

最近、結合のエネルギー論にL鎖可変ドメインにより付与される貢献は、関連するH鎖可変ドメインにより付与される貢献に比較して小さく、そして単離されたH鎖可変ドメインはそれら自体、抗原結合活性を有することが見出された。そのような分子は通常、単一のドメイン抗体として言及される(Ward, E, S, など., Nature 341, 544-546 (1989))。

【0008】

CDRは、b-シート骨格にドメイン内で連結されるループを形成する。アミノ酸配列とループの構造との関係は標準的な構造モデルにより説明され得る(Chothiaなど., Nature 342, 887-883 (1989))。このモデルによれば、抗体は、個々の超可変領域のために少ない主要鎖コンホメーション又は“標準的な構造体”のみを有する。そのコンホメーションは、CDRにおける及び一定のループのためには、骨格領域における特異的部位での少々のキーアミノ酸残基の存在により決定される。異なった免疫グロブリンに同じコンホメーションを有する超可変部が、それらの部位で同じ又はひじょうに類似するアミノ酸残基を有する。

40

【0009】

CDR移植が、ゲッ歯動物のCDR-ドナー抗体の親和性よりも有意に低い結合親和性を有する再形状化されたヒト(又はヒト化された)抗体を生成するいくつかのゲッ歯動物

50

のモノクローナル抗体について実施された。最近の発見は、CDRのトランスファーの他に、ヒト配列の骨格内の変化はCDR - 移植された生成物に満足する抗原結合活性を提供するために必要であることを示している。

【0010】

Queenなど、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989))は、ネズミ抗-Tacモノクローナル抗体からのCDRがヒト骨格中に移植され得ることを開示する。ヒト骨格は、ネズミ配列との相同性を最大にするように選択された。その著者は、CDR又は抗原と十分に相互作用するように選択されるFR内に位置するアミノ酸残基を同定するためにネズミ親抗体のコンピューターモデルを使用した。それらの残基はネズミ配列に見出される残基に突然変異化された。ヒト化された抗-Tac抗体は、ネズミ抗-Tac抗体の親和性のたった約1/3の親和性を有し、そしてこの抗体のヒト特徴の維持は不確実であった。

10

【0011】

驚くべきことには、ネズミCDR - ドナー抗体の親和性にほぼ等しいか又は越える、抗原、すなわちIgE結合親和性を有する、ヒトIgEに対して向けられた再形状化されたヒト抗体を生成することが可能であることが現在見出された。

従って、順に超可変部CDR1, CDR2及びCDR3を含んで成る抗原結合部位を含んで成る、IgEに対して特異的な再形状化されたヒトモノクローナル抗体、前記CDR1がアミノ酸配列Met-Tyr-Trp-Leu-Gluを有し、前記CDR2がアミノ酸配列Glu-Ile-Ser-Pro-Gly-Thr-Phe-Thr-Thr-Asn-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Alaを有し、前記CDR3が配列Phe-Ser-His-Phe-Ser-Gly-Ser-Asn-Tyr-Asp-Tyr-Phe-Asp-Tyrを有し、前記再形状化されたヒト抗体がネズミCDR - ドナー抗体TES - C21の親和性に少なくともほぼ等しい抗原結合親和性を有し、前記再形状化された抗体の直接的な同等物又は誘導体を提供することが本発明の1つの目的である。配列番号1に示されるアミノ酸配列において、CDR1はアミノ酸31から35であり、CDR2はアミノ酸50から66であり、そしてCDR3はアミノ酸99から112である。ネズミCDR - ドナー抗体はモノクローナル抗体TES - C21である。

20

【0012】

好ましくは、本発明は、a) 順に超可変部CDR1, CDR2及びCDR3を含んで成る第1ドメイン；ここで前記CDR1がアミノ酸配列Met-Tyr-Trp-Leu-Gluを有し、前記CDR2がアミノ酸配列Glu-Ile-Ser-Pro-Gly-Thr-Phe-Thr-Thr-Asn-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Alaを有し、前記CDR3が配列Phe-Ser-His-Phe-Ser-Gly-Ser-Asn-Tyr-Asp-Tyr-Phe-Asp-Tyrを有し；及び

30

b) 順に超可変部CDR1, CDR2及びCDR3を含んで成る第2ドメイン；ここで前記CDR1はアミノ酸配列Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Thr-Asn-Ile-Hisを有し、前記CDR2がアミノ酸配列Tyr-Ala-Ser-Glu-Ser-Ile-Serを有し、前記CDR3がアミノ酸配列Gln-Gln-Ser-Asp-Ser-Trp-Pro-Thr-Thrを有し；を含んで成る抗原結合部位を含んで成る再形状化されたヒト抗体に関し、ここで前記再形状化されたヒト抗体はネズミCDR - ドナー抗体の親和性に少なくともほぼ等しい抗原結合親和性を有し、さらに前記再形状化された抗体の直接的な同等物又は誘導体にも関する。前記第1ドメインのCDR1, CDR2及びCDR3は、配列番号1に同定される配列のタンパク質のCDRである。第2ドメインのCDR1, CDR2及びCDR3は、配列番号3に示されるアミノ酸配列におけるそれぞれのアミノ酸24~34, 50~56及び89~87である。

40

【0013】

抗原結合部位が第1及び第2ドメインの両者を含む場合、それらは同じポリペプチド鎖上に位置し、又は好ましくは、個々のドメインは異なった鎖上に存在し、第1ドメインは免疫グロブリンH鎖又はそのフラグメントの部分であり、そして第2ドメインは免疫グロブリンL鎖又はそのフラグメントの部分である。

本発明によれば、再形状化されたヒト抗体は、(1)それが個々の存在する鎖がヒト様骨格を含んで成る少なくとも1つの抗原結合部位を含んで成り、そして(2)存在するい

50

づれかの不変部がヒト免疫グロブリン不変部と少なくとも実質的に相同であるか又は好ましくはそれと同一であることで特徴づけられる分子に関する。本明細書で使用される場合、“ヒト様骨格”とは、特にヒト免疫グロブリン配列の骨格におけるアミノ酸と同一の少なくとも約70又はそれ以上、好ましくは少なくとも約75又はそれ以上のアミノ酸を含んで成る、骨格部分FR1, FR2, FR3及びFR4の配列から成る骨格である。従って、たぶん再形状化されたヒト抗体のCDRを除くすべての部分は、1又は複数天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に相同である。たとえば再形状化されたヒト抗体は、ネズミ可変部及びヒト不変部を含んで成るキメラ性抗体を包含しないであろう。

【0014】

ヒト様骨格は、特定のヒト免疫グロブリンの骨格と同一であり、又は好ましくは、特定のヒト骨格とは異なり、すなわち限定された数のアミノ酸残基が挿入され、欠失され又は他のアミノ酸残基により置換され得る。そのような変性は、単一のFR、すなわちFR1, FR2, FR3又はFR4に制限され、又は2, 3又はすべてのそれらの4種のFRを包含する。たとえばヒト受容体骨格内の疎水性アミノ酸は、他のアミノ酸により置換され得、好ましくはまた疎水性アミノ酸、たとえば相同アミノ酸は2つのアミノ酸により置換され得、又は欠失され得る。同様に、ヒト骨格内の親水性アミノ酸は、他のアミノ酸、2種のアミノ酸により置換され得、又は欠失され得、それによって、置換するアミノ酸は好ましくは、元の骨格の水素結合構造を維持する。そのような変性は、“手探り法”基礎に基づいて行なわれ、すなわちその効果は、創造された再形状化されたヒト抗体の抗原-結合親和性と、ネズミCDR-ドナー抗体TES-C21の親和性とを比較することによって評価される。抗原結合親和性の決定のために適切なアッセイは下記に記載される。

【0015】

特に、選択されたヒト受容体骨格内の制限された数のアミノ酸残基、好ましくは1~12個の残基が、ネズミモノクローナル抗体(ヒトHネズミ交換)、特にネズミ抗体TES-C21において対応する部位で存在するアミノ酸残基、及び/又は異なったヒト抗体(ヒトHヒト交換)において対応する部位で存在するアミノ酸残基により置換され得る。好ましくは、アミノ酸の予想される置換は、抗原結合及び/又はV_L/V_Hパッキングのためにたぶん重要なものとして見なされる特定の骨格残基の従来の特異性に基づかっている。そのような重要なアミノ酸は、それらの特定の性質及び/又は位置のために、

- 抗体のCDR内のアミノ酸と接触し、又はそのアミノ酸近くに位置すると思われ;
- 抗原との臨界的な相互作用に包含され;
- 対のV_H/V_L構造の全体の統合性を維持し、V_H及びV_Lドメイン内での又はそれらの間での相互作用に直接的に又は間接的に影響を及ぼすことに包含されると思われる骨格残基を含む。

【0016】

いわゆる決定的なアミノ酸の特異性の決定のために適切であることが知られている方法は分子造形法を包含する。たとえば抗原結合部位の分子モデルは創造され、そして一般的に入手でき、そして当業者に良く知られているコンピュータープログラムを用いることによってコンピューターモニター上に示され得る。

特に、再形状化された本発明の抗体の企画は、次の段階を含んで成る：

a) 配列番号1及び3に示されるアミノ酸配列及び配列調和により高い相同性であることが決定されているネズミ抗体のその対応する解決された構造に基づいてのネズミ抗体TES-C21のV_L及びV_Hのためのもっともらしい分子モデルの構成。前記解決された構造は、同じネズミ抗体又は2種の異なったネズミ抗体に起因する。

b) 既知のヒト免疫グロブリン配列、たとえば市販されているデータベース、たとえばKABATデータベース(“Sequences of proteins of immunological interest”, Kabat E.A.など, US department of health and human service, Public health service, National Institute of

10

20

30

40

50

H e a l t h) から得られる配列の V_H 及び V_L からの適切なヒト受容体骨格の選択。適切なヒト受容体骨格は、データベースにおける配列に比較して、抗体 T E S - C 2 1 の V_H 及び V_L ドメインに対して高い相同性であり、好ましくは、異常に相同性である特定の免疫グロブリンからの骨格、又は最っとも好ましくは、抗体 T E S - C 2 1 の V_H 及び V_L ドメインに対して高い相同性である多くのヒト抗体からのコンセンサス骨格である。移植のために選択される H 及び L 鎖骨格配列は同じヒト抗体に由来される必要はなく、好ましくは異なったヒト抗体に由来される。

c) ネズミ T E S - C 2 1 の C D R 及び式 I の選択されたヒト受容体骨格からの F R を含んで成る再形状化されたヒト抗体の V_H 及び V_L の分子モデルの構成。

d) 段階 a) 及び c) で得られた分子モデルの比較。

10

【0017】

本発明の再形状化されたヒト抗体においては、1つ、いくつかの又はすべての同定された重要なアミノ酸残基は、他のアミノ酸残基、特に抗体 T E S - C 2 1 の特定部位に存在する残基により置換され得る。好ましくは、選択されたヒト骨格内の“元の”アミノ酸残基は、それが推定される標準的な構造体の一部又は超可変ループの構造の決定において重要である場合、置換されない。しかしながら、アミノ酸残基の置換は、重要なアミノ酸に限定され得ない。好ましくは、重要でない残基に影響を及ぼす変化は、ヒト-ヒトタイプの変化である。

【0018】

本発明の再形状化されたヒト抗体において、アミノ酸 C y s は - S - S - 橋を形成する酸化された状態で存在できる。

20

本発明により提供される再形状化されたヒト抗体の例は、単一のドメイン抗体、一本鎖の抗体及び損なわれていない複数鎖、たとえばテトラマー抗体(十分な長さの H 及び L 鎖及びそのいずれかのフラグメント、たとえば F v , F (a b)₂ 及び F a b フラグメントを含んで成る)を包含する。

【0019】

単一のドメイン抗体は、単一のドメインを含んで成る単一の抗原結合部位を含んで成る。

一本鎖抗体(また s c F v と称する)は、H 及び L 鎖の可変ドメインから実質的に成る。好ましくは、それらの可変ドメインは、約 10 ~ 30 個、特に約 15 個のアミノ酸、たとえばグリシン及びセリンから選択されたアミノ酸を含んで成る短いペプチドリッカーを通して共有結合される。好ましいペプチドリッカーは、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser の 3 種の反復性単位から成る 15 個のアミノ酸ポリペプチドである。一本鎖抗体は、いずれかの H 又は L 鎖の不変部を含まない。

30

【0020】

本発明の再形状化されたヒト抗体は I g E に対して特異的であり、すなわちそれはヒト I g E のイソタイプ決定基に対して向けられる。従って、本発明の抗体は I g E 種の免疫グロブリンに共通する H 鎖上の抗原決定基を認識し、すなわちそれは異なった特異性の I g E 分子と反応するが、しかし他のイソタイプの免疫グロブリン又は免疫グロブリン L 鎖とは反応しない。

40

【0021】

本発明の再形状化された抗体は、ネズミ T E S - C 2 1 の親和性に少なくともほぼ等しい I g E - 結合親和性を有する必要がある。今後本明細書で使用される場合、用語“少なくともほぼ等しい”とは、再形状化されたヒト抗体(試験抗体)の I g E - 結合親和性が統計学的基礎に基づいて、対照抗体 T E S - C 2 1 の少なくとも約 90%、好ましくは 90% 以上、特に約 100% ~ 約 250% 以内である。再形状化された抗体は、T E S - C 2 1 の対応する構造に対して比較されるべきである。たとえば、再形状化された抗体が単一のドメイン抗体である場合、その親和性は単一のドメイン T E S - C 2 1 に関連づけられるべきである。このネズミ単一ドメイン抗体は、配列番号 1 及び 3 に与えられる情報に基づいて容易に調製され得る。この記載において、抗体の“親和性”又は“結合活性”間

50

には区別がないが、しかし用語“親和性”とは親和性又は結合活性のいずれかを言及すべきである。

【0022】

対照及び形状化された試験抗体の親和性の決定は、同じ態様で、すなわち同じアッセイにおいて同一の条件下で行なわれるべきである。お互い比較される場合、抗体は、同じ程度の純度を有すべきである。高く精製された抗体を使用することが好ましい。

IgEのための抗体の結合親和性は、既知の技法及び法則に基づいて、当業者により容易に確立され得る適切な定量アッセイを用いて決定される。

【0023】

決定されるべき適切なパラメーターは、平衡定数 K_{aff} （親和性定数）である。種々の数学的等式が、抗体-抗原相互作用のための親和性定数の実験的計算を促進するために開発された。 K_{aff} の測定のための適切な実験方法は、たとえば競争ラジオイムノアッセイ（RIA）又は競争酵素結合イムノアドソベントアッセイ（EIA）による結合された抗原：遊離抗原の比の測定、又はBeattyなど（J. Immunol. Meth. 100, 173~179 (1987)）により記載される非競争固相EIAによる合計の抗体濃度の測定に依存する。

10

【0024】

好ましくは、 K_{aff} は、CM5表面チップを用いてのBIAコア（TM）システム上でIgE抗原と抗体との即時の生物特異的相互反応（Jonsson, U. など, Biotec hniques 11, 620~627 (1991)）を分析することにより決定される。そのアッセイは製造業者の指針に従って実質的に行なわれ、そして動定数 K_{ass} 及び K_{diss} の測定を包含する。適切な抗原は、Serotecにより供給される市販のヒトIgE（たとえばBP094, Dotlikon Switzerland）又はヒト不変部を有するキメラ性抗体、たとえばSE44（Sunなど, J. Cell. Biol. 109, 2899 (1989)）である。特に、このアッセイは、次のことを含んで成る実験サイクルを包含する：

20

1) 化学的手段によるチップ表面上へのいわゆる捕獲抗体の固定化、すなわちネズミ抗体TES-C21を含む測定のためには、抗-マウス抗体、たとえば抗-マウスIgGが、又は本発明の再形状化された抗体を含む測定のためには、抗-ヒト抗体、たとえば抗-ヒトIgGが使用され、

30

2) 固定された捕獲抗体への対照又は試験抗体の結合、

3) 一定濃度の抗原と結合された対照又は試験抗体との接触。

【0025】

好ましくは、いくつかの、たとえば4回の実験サイクルが、一定量の結合された抗体を用い、そしてIgEの（既知）濃度を変えることで行なわれる。個々のサイクルの完結後、その表面を、たとえば酸、たとえばHClにより再生する。

本発明の再形状化された抗体の企画は、低い、好ましくは $1.9 \times 10^{-5} / s$ 又はそれ以下の低い解離速度（ K_{diss} ）と組合して、高い、好ましくは $2.5 \times 10^5 M^{-1} / s$ 又はそれ以上の高い会合速度（ K_{ass} ）を示す抗体を構成することを目的とする。

【0026】

40

本明細書で使用される場合、本発明の再形状化されたヒト抗体の直接的な同等物は、配列番号1に示されるようなCDR1, CDR2及びCDR3及び場合によっては、配列番号3に示されるようなCDR1, CDR2及びCDR3を順に含んで成る再形状化されたヒト抗体であり、ここで1つの可変ドメイン内で、CDR内での4個までのアミノ酸残基、すなわちCDR内の1, 2, 3又は4個のアミノ酸か他のアミノ酸により置換される。従って、用語“その直接的な同等物”とは、単一ドメインの再形状化されたヒト抗体（タンパク質Y）：

(1) ここで、全体として取られる超可変部CDR1, CDR2及びCDR3は配列番号1に示されるようなCDRに少なくとも90%相同性であり、そして、

(2) タンパク質YのFRと同一のFRを有し、しかも配列番号1におけるCDRと同一

50

のCDRを有する本発明の対照タンパク質の親和性に少なくともほぼ等しい、IgEのための親和性を有し；又は

結合部位当たり2つのドメインを有する再形状化された抗体（タンパク質Y）：

（1）ここで全体として取られる超可変部CDR_{1H}、CDR_{2H}、CDR_{3H}及びCDR_{1L}、CDR_{2L}、CDR_{3L}は配列番号1及び3に示されるようなCDRに少なくとも80%、好ましくは90%相同性であり、そして、

（2）タンパク質YのFR及び不変部と同一のFR及び不変部を有し、しかも配列番号1及び3における超可変部と同一の超可変部CDR_{1H}、CDR_{2H}、CDR_{3H}及びCDR_{1L}、CDR_{2L}、CDR_{3L}を有する本発明の対照タンパク質の親和性に少なくともほぼ等しい、IgEのための親和性を有する。

10

【0027】

後者の基準は、たとえば上記方法に従って、 K_{aff} を決定することによって試験され得る。

ネズミモノクローナル抗体TES-C21は、本発明の再形状化されたヒト抗体にも共通する次の特徴（特に）を示す：

- それはFc。受容体I又はIIを生む細胞へのIgEの結合を阻害し；
- ヒトIgE分泌細胞に特異的に結合し；
- Fc。受容体I又はIIを生む細胞、たとえば感作された肥満細胞及び好塩基性細胞の表面上に結合されるIgEを認識せず、そして結合せず；
- メディエーター（たとえばヒスタミン）開放のきっかけを生ぜしめず、
- 免疫応答におけるIgE形成を阻害する。

20

【0028】

それらの特徴的能力は、当業者において知られている方法、たとえば引用により本明細書に組込まれるヨーロッパ特許出願第396505号に開示される方法により決定され得る。

本発明の好ましい再形状化された抗体、又はその誘導体は、（a）順に超可変部CDR_{1H}、CDR_{2H}及びCDR_{3H}並びにヒトH鎖の不変部又はそのフラグメントを含んで成る1つの免疫グロブリンH鎖又はそのフラグメント；ここで前記CDR_{1H}はアミノ酸配列Met-Tyr-Trp-Leu-Gluを有し、前記CDR_{2H}がアミノ酸配列Glu-Ile-Ser-Pro-Gly-Thr-Phe-Thr-Thr-Asn-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Alaを有し、前記CDR_{3H}がアミノ酸配列Phe-Ser-His-Phe-Ser-Gly-Ser-Asn-Tyr-Asp-Tyr-Phe-Asp-Tyrを有し；及び

30

（b）順に超可変部CDR_{1L}、CDR_{2L}及びCDR_{3L}を含んで成るL鎖可変ドメイン並びにヒトL鎖の不変部又はそのフラグメントを含んで成る1つの免疫グロブリンL鎖又はそのフラグメント；ここで前記CDR_{1L}がアミノ酸配列Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Gly-Thr-Asn-Ile-Hisを有し、前記CDR_{2L}がアミノ酸配列Tyr-Ala-Ser-Glu-Ser-Ile-Serを有し、前記CDR_{3L}がアミノ酸配列Gln-Gln-Ser-Asp-Ser-Trp-Pro-Thr-Thrを有する；を少なくとも含んで成る。

【0029】

免疫グロブリンH又はL鎖のフラグメントは、十分な長さの鎖ではなく、そして可変ドメイン及び場合によっては鎖の不変部の一部を含んで成るH又はL鎖である。

40

より好ましくは、本発明の再形状化されたヒト抗体又はその誘導体は、（a）1位でのアミノ酸で開始し、そして123位でのアミノ酸で終結する配列番号11に示される配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメイン及びヒトH鎖の不変部を含んで成る1つのH鎖；及び

（b）1位でのアミノ酸で開始し、そして107位でのアミノ酸で終結する配列番号5に示される配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメイン及びヒトH鎖の不変部を含んで成る1つのL鎖を少なくとも含んで成る。

【0030】

特に好ましくは、本発明の再形状化されたヒト抗体又はその誘導体は、（a）1位でのアミノ酸で開始し、そして123位でのアミノ酸で終結する配列番号13に示される配列

50

と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメイン及びヒトH鎖の不変部を含んで成る1つのH鎖；及び

(b) 1位でのアミノ酸で開始し、そして107位でのアミノ酸で終結する配列番号5に示される配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメイン及びヒトH鎖の不変部を含んで成る1つのL鎖を含んで成る。

【0031】

本明細書に与えられる残基は、アミノ酸残基の数字に対応する。

ヒトH鎖の不変部は、イソタイプ (a), (d), (g) 又は μ (μ) のいずれかから選択され得る。種々のサブクラス、たとえばIgGサブクラスのH鎖が使用され得る。ヒトg1鎖の不変部が好ましい。異なったクラス及びサブクラスのH鎖が異なったエフェクター機能に關与し、そして従って、H鎖不変部のタイプを選択することによって、所望するエフェクター機能を有する再形状化されたヒト抗体が生成され得る。L鎖の不変部は、ラムダ (λ) 又は好ましくはカッパ (κ) 鎖である。

10

【0032】

細胞系EH31.8により生成される、H3L1と命名された再形状化されたヒト抗体が最っとも好ましい。

本発明はまた、本発明の再形状化されたヒト抗体の誘導体にも關する。再形状化されたヒト抗体の誘導体は、前記抗体の抗原特異性を有する。本発明によれば、誘導体とは、本発明の抗体の変性、たとえば吸着又は化学的変性により得られるいずれかの分子であることを意味する。たとえば、誘導体の意図された使用に依存して、本発明の抗体は、他のタンパク質性又は非タンパク質性分子の共有又は非共有結合により誘導体化され得る。抗体接合体をもたらず共有結合は、たとえば当業界において知られているカップリング技法を用いて達成される。そのような接合体において、抗体はスペーサー又はリンカー基により又は直接的に、接合パートナーに結合される。誘導体の例は、放射性ラベルされた再形状化されたヒト抗体、及びたとえば酵素、螢光又は化学発光マーカー、適切な細胞毒性又は細胞増殖抑制性物質、金属キレート、酵素でないタンパク質、たとえばアビジン、又は非タンパク質性分子、たとえばビオチンと本発明の再形状化されたヒト抗体との接合体である。

20

【0033】

本発明の抗体接合体のために使用される酵素は、たとえばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、b-D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、マレートデヒドロゲナーゼ、又はグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼである。

30

【0034】

螢光マーカーは、フルオレセイン、フルオロクロム、ロダミン及び同様のものを包含する。

化学発光マーカーは、たとえばルミノールのアクリジニウムエステルである。金属キレートの例は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン六酢酸(DPTA)、1,4,8,11-テトラアザテトラデカン、1,4,8,11-テトラアザテトラデカン-1,4,8,11-四酢酸、1-オキサ-4,7,12,15-テトラアザヘプタデカン-4,7,12,15-四酢酸、又は同様のものである。

40

【0035】

本発明の放射性ラベルされた抗体又はそのフラグメントは、たとえば放射性沃素 (^{123}I , ^{125}I , ^{131}I)、トリチウム (^3H)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、イットリウム (^{90}Y)、テクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) 又は同様のものを含む。

本発明はさらに、抗-IgE形状化されたヒト抗体、その直接的な同等物及びその誘導体の製造方法にも關する。

【0036】

本発明の再形状化されたヒト抗体、その直接的な同等物又はその誘導体は、本発明のタ

50

ンパク質を生成する下記にさらに定義されるような適切な宿主細胞が、インビトロ又はインビボで操作され、そして必要により、その所望するタンパク質が単離され、そしてその誘導体に任意に転換されることを特徴とする、それ自体既知の方法により調製される。本発明のタンパク質は、いずれかの適切な形質転換できる宿主を前記タンパク質の発現を可能にする条件下で培養し、前記タンパク質を単離し、そして場合によっては、前記単離されたタンパク質を、たとえばタンパク質加水分解により本発明のもう一つのタンパク質に、又はたとえば他の化合物、たとえば上記のようなタンパク質又は非タンパク質性分子の結合により本発明の誘導体に転換することを含んで成る方法により調製され得る。

【0037】

本発明の好ましい態様においては、(1)下記に定義されるような本発明の第1及び第2 DNA 構造体により形質転換された適切な宿主細胞を培養し、そして(2)その培養物から活性抗-IgE再形状化されたヒト抗体を回収することを含んで成る、複数鎖抗-IgE再形状化ヒト抗体の生成方法が提供される。複数鎖抗体は、H及びL鎖可変ドメインを含んで成る少なくとも一つの抗原結合部位を含んで成る抗体である。

【0038】

他方、H及びL鎖は別々に回収され、そしてインビトロでの折りたたみの後、活性抗体に再構成され得る。適切な再構成法は当業界において良く知られている。従って、本発明の複数鎖抗体の製造方法はまた：

(1)本発明の第1 DNA 構造体により形質転換される第1宿主細胞を培養し、そしてその培養物から前記H鎖又はそのフラグメントを回収し、そして

(2)本発明の第2 DNA 構造体により形質転換される第2宿主細胞を培養し、そしてその培養物から前記L鎖又はそのフラグメントを回収し、そして

(3)(1)で得られるH鎖又はそのフラグメント及び(2)で得られるL鎖又はそのフラグメントから活性抗-IgE再形状化抗体をインビトロで再構成することを含んで成る。

【0039】

類似する態様において、(1)本発明の一本鎖又は単一ドメインの再形状化されたヒト抗体をそれぞれコードするDNA構造体により形質転換される宿主細胞を培養し、そして(2)前記培養物から前記ペプチドを回収することを含んで成る本発明の一本鎖又は単一ドメインの再形状化されたヒト抗体の製造方法がまた提供される。

【0040】

再形状化されたヒト抗体のフラグメント、たとえばFab, Fab₂又はF(ab)₂。フラグメントは、上記のような組換えDNA技法により、又は酵素、たとえばパパイン又はペプシンによる消化及び/又は化学的還元によるジスルフィド結合の分解によるそれ自体既知の方法により、上記で調製された損なわれていない複数鎖の再形状化されたヒト抗体から調製され得る。

【0041】

適切な宿主は、真核細胞、たとえば動物細胞、植物細胞及び菌類、及び原核細胞、たとえばグラム陽性及びグラム陰性細菌、たとえばE.コリを包含する。好ましい真核宿主細胞は、哺乳類起源の細胞及び酵母細胞である。

今後使用される場合、インビトロとはエクスビボ(ex vivo)を意味し、従ってたとえば細胞培養及び組織培養条件を包含する。

【0042】

たとえば、インビトロでの哺乳類細胞の増殖は、通常 of 市販の培養培地、たとえばダルベッコ変性イーグル培地(DMEM)又はRPMI 1640(哺乳類血清、たとえばウシ胎児血清、又は微量元素及び増殖維持補充物、たとえば支持物細胞、たとえば正常なマウス腹腔滲出細胞、脾臓細胞、骨髓マクロファージ、2-アミノエタノール、インシュリン、トランスフェリン、低密度リポタンパク質、オレイン酸又は同様のものにより任意に補充されている)である適切な培養培地において行なわれる。

【0043】

10

20

30

40

50

インビトロ生成は、比較的純粋な抗体調製物を供給し、そして多量の所望する抗体の大規模産生を可能にする。細菌細胞、酵母及び哺乳類細胞の培養のための技法は当業界において知られており、そしてたとえばエアリフト反応器又は連続攪拌反応器における均質懸濁培養、又はたとえば中空繊維、マイクロカプセルにおいて、アガロース微小ビース又はセラミックカートリッジ上での固定された又は捕獲された細胞培養を包含する。

【0044】

本発明の多量の所望する再形状化されたヒト抗体はまた、哺乳類細胞をインビボで増殖することによっても得られる。このためには、所望する抗体を生成するハイブリドーマ細胞が組織適合性哺乳類中に注入され、抗体産生腫瘍の増殖が引き起こされる。場合によっては、動物は、注入の前、炭化水素、特に鉱油、たとえばプリスタン（テトラメチルペンタデカン）により感作される。1～3週間後、抗体がそれらの哺乳類の体液から単離される。たとえば所望する抗体を生成するハイブリドーマ細胞系Sp2/0に由来するトランスフェクトされた細胞が、プリスタンにより任意に予備処理されたBalb/cマウスの腹腔内に注入され、そして1～2週間後、腹水が動物から採取される。

10

【0045】

細胞培養上清液が、所望する再形状化されたヒト抗体について、抗原としてヒトIgEを用いて、好ましくは酵素イムノアッセイ、たとえばサンドイッチアッセイ又はドットアッセイ、又はラジオイムノアッセイによりスクリーンされる。たとえばサンドイッチ酵素イムノアッセイは、正しくアセンブリされた免疫イムノグロブリンが細胞培養上清液に存在するかどうかを決定するために使用され得、それによってL鎖ヒト不変部k又はl（適切な場合）に向けられた抗体及び所望するサブクラス9H鎖ヒト不変部に向けられた他の抗体が使用され、その1つは固体支持体に被覆され、そして他の1つは適切な酵素基質による検出を可能にする酵素に接合される。そのようなイムノアッセイは、酵素結合イムノアドゾーベントアッセイ（ELISA）であり、ここで適切なキャリアー、たとえばプラスチック製マイクロタイタープレートが免疫グロブリンEにより被覆され、そして試験されるべき培養上清液と共にインキュベートされる。結合されたモノクローナル抗体は、上清液における抗-IgE抗体を認識する酵素ラベルされた抗体と共にインキュベートし、そして適切な酵素基質溶液の続く添加により検出される。酵素基質反応は、たとえば眼又は光学的測定装置により観察され得る色彩の変化をもたらす。

20

【0046】

再形状化されたヒト抗体の単離のためには、培養上清液又は腹水における免疫グロブリンが、硫酸アンモニウムによる沈殿化、吸湿性材料、たとえばPEGに対する透析、選択膜を通しての濾過又は同様の手段により濃縮され得る。必要なら及び/又は所望なら、抗体は通常のクロマトグラフィー法、たとえばゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー又はアフィニティークロマトグラフィー、たとえばイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製される。好ましくは、再形状化されたヒト抗体は、クロマトグラフィー精製段階、たとえばプロテインA（本発明の抗体がFc部分を含む場合）によるアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー及び/又はゲル濾過を含んで成る方法により、それらを含む細胞上清液から単離される。

30

40

【0047】

本発明の再形状化されたヒト抗体誘導体は、それ自体既知の方法により、たとえば他の化合物への再形状化されたヒト抗体の吸着により、又は化学的に結合された接合体を供給するカップリングにより調製される。タンパク質、たとえば酵素と本発明の抗体との接合体は、たとえば上記のようにして調製された抗体とタンパク質とを、カップリング剤、たとえばグルタルアルデヒド、過ヨウ素酸塩、N,N'-o-フェニレンジマレイミド、N-(m-マレイミドベンゾイルオキシ)-スクシンイミド、N-(3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンオキシ)-スクシンイミド、N-エチル-N-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド又は同様のものの存在下で反応せしめることによって調製される。蛍光又は化学発光マーカ-との接合体は、カップリング剤、たとえば上記に列

50

拳されるものの存在下で、イソチオシアネート、好ましくはフルオレセイン - イソチオシアネートとの反応により調製される。

【0048】

ヨウ素 (^{123}I , ^{125}I , ^{131}I) により放射性ラベルされた再形状化抗体は、それ自体既知の方法に従ってのヨウ素化により、たとえば放射性ヨウ化ナトリウム又はカリウム及び化学酸化剤、たとえば次亜塩素酸ナトリウム、クロラミン T 又は同様のもの、又は酵素酸化剤、たとえばラクトペルオキシダーゼ又はグルコースオキシダーゼ及びグルコースにより本発明の抗体から得られる。本発明の抗体又はフラグメントは、たとえばジエチレントリアミン六酢酸 (DPTA) - キレート化によりイットリウム (^{90}Y) に結合される。テクネチウム - 99m によりラベルされた抗体又はフラグメントは、リガンド交換方法、たとえば錫イオン溶液によるペルテクネート (TcO_4^-) の還元、Sephadex カラム上での前記還元されたテクネチウムのキレート化及びこのカラムへの抗体の適用、又は直接的なラベリング技法、たとえばペルテクネート、還元剤、たとえば SnCl_2 、緩衝溶液、たとえばナトリウム - カリウムフタレート溶液、及び本発明の抗体のインキュベーションにより調製される。

【0049】

タンパク質への本発明の抗体の接合はまた、組換え DNA 技法、たとえば下記に説明される技法により直接的に調製され得る。

再形状化されたヒト抗体、その直接的な同等物又はその誘導体を生成するための方法は、親和性及び特異性の決定のために十分な量で所望するタンパク質を生成する。

【0050】

本発明はまた、本発明の再形状化されたヒト抗体及びその直接的な同等物をコードする組換え DNA にも関する。ひじょうに一般的な態様において、本発明の単一ドメイン再形状化ヒト抗体、本発明の一本鎖再形状化ヒト抗体、本発明の再形状化ヒト抗体の H 又は L 鎖又はそのフラグメントをコードする DNA 分子が供給される。定義によれば、そのような DNA は、コードする一本鎖 DNA、前記コード DNA 及びそれに対しての相補的 DNA から成る二本鎖 DNA 又はそれらの相補的 (一本鎖) DNA 自体を含んで成る。より詳しくは、本発明は、下記に記載されるような第 1 及び第 2 DNA 構造体に関する。

【0051】

第 1 の DNA 構造体は H 鎖又はそのフラグメントをコードし、そして a) 選択的に FR 及び CDR を含んで成る可変ドメインをコードする第 1 部分、ここで前記 CDR は順に CDR_{1H} , CDR_{2H} 及び CDR_{3H} であり、配列番号 1 におけるそのアミノ酸配列がそれぞれ 31 ~ 35 位、50 ~ 66 位及び 99 ~ 112 位であり；この第 1 部分は可変ドメインの最初のアミノ酸をコードするコドンで開始し、そして可変ドメインの最後のアミノ酸をコードするコドンで終結し；及び場合によっては、

b) H 鎖の不変部の最初のアミノ酸をコードするコドンで開始し、そして前記不変部又はそのフラグメントの最後のアミノ酸をコードするコドンで終結し、続いてナンセンスコドンが続く、ヒト H 鎖不変部又はそのフラグメントをコードする第 2 部分を含んで成る。好ましくは、この第 1 部分は、1 位でのアミノ酸で開始し、そして 123 位でのアミノ酸で終結する、配列番号 13 に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメインをコードする。より好ましくは、第 1 部分は、79 位でのヌクレオチドで始まり、そして 447 位でのヌクレオチドで終結する、配列番号 13 に示されるヌクレオチド配列を有する。第 2 部分は、ゲノム起原の DNA フラグメント (イントロンを含む) 又は cDNA フラグメント (イントロンを含まない) であり得る。存在するなら、g1 鎖の不変部をコードする第 2 部分が好ましい。

【0052】

第 2 の DNA 構造体は L 鎖又はそのフラグメントをコードし、そして a) 選択的に FR 及び CDR を含んで成る可変ドメインをコードする第 1 部分、ここで前記 CDR は順に CDR_{1L} , CDR_{2L} 及び CDR_{3L} であり、配列番号 3 におけるそのアミノ酸配列がそれぞれ 24 ~ 34 位、50 ~ 56 位及び 89 ~ 97 位であり；この第 2 部分は可変ドメイ

ンの最初のアミノ酸をコードするコドンで開始し、そして可変ドメインの最後のアミノ酸をコードするコドンで終結し；及び場合によっては、

b) L鎖の不変部の最初のアミノ酸をコードするコドンで開始し、そして前記不変部又はそのフラグメントの最後のアミノ酸をコードするコドンで終結し、続いてナンセンスコドンが続く、ヒトH鎖不変部又はそのフラグメントをコードする第2部分を含んで成る。好ましくは、この第2部分は、1位でのアミノ酸で開始し、そして107位でのアミノ酸で終結する、配列番号5に示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメインをコードする。より好ましくは、第2部分は、82位でのヌクレオチドで始まり、そして403位でのヌクレオチドで終結する、配列番号5に示されるヌクレオチド配列を有する。第2部分は、ゲノム起原のDNAフラグメント(イントロンを含む)又はcDNAフラグメント(イントロンを含まない)であり得る。存在するなら、鎖の不変部をコードする第2部分が好ましい。

10

【0053】

第1及び第2部分の両者を含んで成る第1及び第2DNA構造体が好ましい。この場合、第1及び第2部分はイントロン配列により分離され得る。

好都合には、第1及び第2DNA構造体は、第1部分の上流に位置し、そしてリーダーペプチドをコードする第3部分を含んで成り；この第3部分はリーダーペプチドの最初のアミノ酸をコードするコドンで始まり、そしてそのペプチドの最後のアミノ酸をコードするコドンで終結する。適切なリーダーペプチドは、宿主生物により鎖の分泌のために必要とされるペプチドであり、ここでそれらは発現され、そして続いて宿主により除去される。好ましくは、第1及び第2DNA構造体の第3部分は、免疫グロブリン遺伝子のリーダーペプチドをコードする。最っとも好ましくは、第1DNA構造体の第3部分は、19位でのアミノ酸により始まり、そして1位でのアミノ酸により終結する、配列番号13に示される配列と実質的に同一のアミノ酸を有するリーダーペプチドをコードする。また、最っとも好ましくは、第2DNA構造体の第3部分は、20位でのアミノ酸で始まり、そして1位でのアミノ酸で終結する、配列番号5に示される配列と実質的に同一のアミノ酸を有するリーダーペプチドをコードする。

20

【0054】

本発明はまた、本発明の再形状化されたヒト抗体の直接的な同等物をコードする組換えDNA、及びタンパク質への本発明の抗体の接合体をコードする組換えDNAにも関する

30

。技術の現状況は、当業者が本明細書に提供される情報を付与する本発明のDNA分子；すなわちCDRのアミノ酸配列及び従ってDNA配列コード(配列番号1及び3)を合成できるであろうような状況である。本発明の再形状化されたヒト抗体の可変ドメインをコードするDNA構造体を得るための適切な方法は、多くのオリゴヌクレオチドの合成、PCR方法によるそれらの増幅及び所望するDNA配列を付与するためにそれらのスプライシングを含んで成る。可変ドメイン遺伝子を構成するための他の方法は：

- 特異的なヒトモノクローナル抗体をコードする遺伝子をクローニングし；
- FR及びCDRをコードするDNAセグメントを決定し；
- CDRをコードするDNAセグメントを除去し、その結果、FRをコードするDNAセグメントが連結部での適切な制限部位と一緒に融合し；
- 配列番号1及び3における上記で同定された配列に従って二本鎖合成CDRカセットを調製し、ここで前記カセットは付着端を有し；
- FRの連結部で前記カセットを連結する(ヨーロッパ特許第239,400号)ことを含んで成る。

40

【0055】

所望により、本発明のDNA構造体は、種々の良く知られた方法により、たとえばランダム変異を誘発することによって又は特定部位変異誘発により変異誘発され得る。本発明の再形状化されたヒト抗体をコードするDNA構造体において、変異誘発はCDR内に位置するいずれのアミノ酸の変更をも導びかない。本発明の再形状化された抗体の直接的な

50

同等物をコードするDNA構造体においては、他のヌクレオチドによるヌクレオチドの置換が、1又は複数のCDRにおけるアミノ酸配列を変更することができる。

【0056】

本発明の再形状化された抗体の直接的な同等物をコードするDNAは、当業界において知られている方法に従って、たとえば本発明の再形状化された抗体をコードするDNAのランダム又は部位特異的変異誘発により調製され得る。不活性変異ではないが、しかしCDR内に位置する少なくとも1つのアミノ酸残基の置換をもたらす変異誘発は、このようにして生成されたタンパク質が上記基準を満たす場合、本発明の再形状化された抗体の直接的な同等物をコードするDNAを生成できる。

【0057】

明細書の次の部分で使用される場合、本発明の再形状化されたヒト抗体とは、その直接的な同等物を包含することを意味する。

さらに本発明は、上記DNA構造体の少なくとも1種、たとえばL鎖可変ドメイン及び/又はH鎖可変ドメインをコードする挿入体を含んで成るハイブリッドベクターである組換えDNAにも関し、ここで前記ベクターは、原核及び/又は真核宿主において複製できる。

【0058】

本発明の好ましいハイブリッドベクターは、上記のようなL鎖をコードする挿入体及び/又は上記のようなH鎖をコードする挿入体を含んで成る。

本発明のハイブリッドベクターは、複製又は自主的に複製する配列の起点、1又は複数の優先的なマーカー配列及び場合によっては、発現制御配列、シグナル配列及び追加の制限部位を含んで成る。

【0059】

好ましくは、本発明のハイブリッドベクターは、発現制御配列に操作可能的に連結される上記挿入体、特にこの後に記載されるものを含んで成る。

ベクターは典型的には、適合できる宿主細胞と共同して2種の機能を行なう。1つの機能は、免疫グロブリン鎖をコードする核酸のクローニングを促進し、すなわち有用な量の核酸を生成することである(クローニングベクター)。他の機能は、染色体外要素としての維持により、又は宿主染色体中への統合により、適切な宿主における複製及び遺伝子構造体の発現を提供することである(発現ベクター)。クローニングベクターは、上記のような遺伝子構造体、複製又は自主的に複製する配列の起点、選択マーカー配列及び場合によっては、シグナル配列及び追加の制限部位を含んで成る。発現ベクターはさらに、遺伝子の転写及び翻訳のために不可欠な発現制御配列を含んで成る。

【0060】

複製又は自主的に複製する配列の起点は、SV40又は他のウィルス源に起因する外因性起点を含むようにベクターを構成することにより、又は宿主細胞の染色体機構により提供される。

マーカーは、ベクターを含む宿主細胞の選択を可能にする。選択マーカーは、重金属、たとえば銅又は抗生物質、たとえばテトラサイクリン、アンピシリン、ゲネチシン(G-418)、ネオマイシン、カナマイシン又はヒグロマイシンに対する耐性を付与する遺伝子、又は宿主細胞の遺伝的損傷、たとえばチミジンキナーゼ、ヒポキカンチンホスホリルトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、又は同様のものの不在を補足する遺伝子を包含する。

【0061】

シグナル配列は、たとえば抗体の分泌を指図するリーダーペプチドをコードするプレ配列又は分泌リーダー、スプライスシグナル、又は同様のものであり得る。

発現制御配列として、ベクターDNAは、プロモーター、転写の開始及び停止及びmRNAの安定化のために必要な配列及び場合によっては、エンハンサー及びさらに調節配列を含んで成る。広範囲の種類のプロモーター配列が、宿主細胞の性質に依存して使用され得る。強く且つ同時に、十分に調節されるプロモーターが最っとも有用である。翻訳の開

10

20

30

40

50

始のための配列は、たとえばシャイン・ダルガーノ配列である。転写の開始及び停止及び mRNA の安定化のために必要な配列は、ウィルス cDNA 又はたとえば発現宿主からの真核 cDNA の非コード 5' - 領域及び 3' - 領域からそれぞれ利用できる。エンハンサーは、ゲノム起原又はたとえばシミアンウィルス、ポリオーマウィルス、ウシ乳頭腫ウィルス、Mooney 肉腫ウィルス又は特にヒトサイトメガロウィルスに由来するウィルス起原の転写 - 刺激 DNA 配列である。

【0062】

ベクター DNA の種々の DNA セグメントは操作可能的に連結され、すなわちそれらは隣接し、そしてお互い機能的な関係に配置されている。

E. コリ株における複製及び発現のために適切であるベクターの例は、バクテリオファージ、たとえばバクテリオファージの誘導體又はプラスミドである。適切なベクターは、完全なレプリコン、マーカー遺伝子、制限エンドヌクレアーゼのための認識配列（その結果、外来性 DNA 及び適切には、発現制御配列がそれらの部位で挿入され得る）、及び場合によってはシグナル配列、及びエンハンサーを含んで成る。本発明の発現ベクターは、DNA がプロモーターにより制御されている、上記で定義された適切なプロモーター及び DNA 構造体を含んで成る発現カセットを含んで成る。

【0063】

微生物プロモーターは、感温性リプレッサーにより制御されるバクテリオファージの強い左方向プロモーター P_L である。E. コリプロモーター、たとえば lac リプレッサーにより調節され、そしてイソプロピル - D - チオガラクトシドにより誘発された lac (ラクトース) プロモーター、trp リプレッサーにより調節され、そしてトリプトファン飢餓により誘発された trp (トリプトファン) プロモーター、及び lac リプレッサーにより調節された tac (ハイブリッド trp - lac プロモーター) である。

【0064】

酵母における複製及び発現のために適切であるベクターは、酵母複製開始部及び酵母のための選択遺伝子マーカーを含む。そのようなベクターの1つのグループは、いわゆる、複製の起点としての ars 配列（自立性複製配列）を含む。それらのベクターは、形質転換の後、酵母細胞内での染色体外に保持され、そして自立的に複製される。さらに、サッカロミセス セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae) から 2 μ のプラスミド DNA のすべて又は一部を含むベクターが使用され得る。そのようなベクターは、細胞内にすでに存在する 2 μ のプラスミド中に組換えにより組込まれ、又は自立的に複製するであろう。2 μ の配列は、高い形質転換頻度及び高いコピー数が達成される予定である場合に特に適切である。

【0065】

酵母における発現のために適切である発現制御配列は、高く発現された酵母遺伝子の配列である。従って、TRP1 遺伝子、ADH1 又は ADHII 遺伝子、酸ホスファターゼ (PHO3 又は PHO5) 遺伝子、イソシクローム遺伝子、又は解糖路に關与するプロモーター、たとえばエノラーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - ホスフェートキナーゼ (PGK)、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース - 6 - ホスフェートイソメラーゼ、3 - ホスホグリセレートムターゼ、ピルベートキナーゼ、トリホスホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルココキナーゼ遺伝子のためのプロモーターが使用され得る。

【0066】

哺乳類宿主細胞のために適切なプロモーターは、ヒト免疫グロブリン、又はウィルス、たとえば SV40、ラウス肉腫ウィルス (RSV)、アデノウィルス 2、ウシ乳頭腫ウィルス (BPV)、パポーウィルス BK 変異体 (BKV) 又はマウス又はヒトサイトメガロウィルス (CMV) から得られる。ヒト CMV プロモーターが好ましい。他方、ベクターは、哺乳類発現生成物、たとえばアクチン、コラーゲン、ミオシン等からのプロモーター、又は天然のプロモーター、及び免疫グロブリン遺伝子配列に通常、關係する制御配列を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0067】

ベクターは真核及び原核宿主の両者のために適切である。本発明のDNA分子が調製されれば、それは便利には、適切な発現ベクター中にトランスファーされ得る。適切なプロモーター、又はH鎖又はL鎖不変部をコードする遺伝子を含んで成る発現ベクターは市販されている。

L鎖及びH鎖のための遺伝子構造物は、2種のベクターの助けにより宿主細胞中に連続的に又は同時にトランスファーされる。他方、H及びL鎖の両者は、同じハイブリッドベクター中にクローン化され、そして宿主細胞中に単一構造体として1段階方法で導入される。第3の方法は、連結されていないDNAフラグメントの同時トランスフェクションを利用する。

【0068】

所望する再形状化されたヒト抗体をコードする組換えDNAは、たとえば形質転換された宿主細胞を培養することによって調製され得る。

特に、そのようなDNAは、

a) IgEに対して特異的な再形状化されたヒト抗体の可変H及び/又はL鎖可変ドメインをコードするDNAを調製し；

b) ゲノムライブラリーからDNAを単離し、そして抗体の不変領域をコードする所望するDNAをDNAプローブを用いて選択することによって、ヒト抗体のH及び/又はL鎖不変領域をコードするDNAを調製し；

c) 段階a)のDNA又は段階a)及びb)のDNAを適切なハイブリッドベクター中に導入し；

d) 得られたハイブリッドベクターを受容宿主細胞にトランスファーし、又は所望する遺伝子をコードするDNAを回収し、そして適切な受容宿主細胞中に連結されていないDNAをトランスファーし；

e) 形質転換された宿主細胞を選択し、そして培養し、そして場合によっては；

f) 所望するDNAを単離することを含んで成る方法により調製され得る。

【0069】

上記方法の段階b)に従ってのゲノムヒトDNAが、適切なヒト組織、好ましくはヒト胎盤又はヒト胎児肝細胞から当業界において知られている方法に従って単離される。ゲノムDNAライブラリーが、適切な制限エンドヌクレアーゼによる制限消化によりそれから構成される。そのゲノムDNAライブラリーがたとえばニトロセルロース膜上で複製され、そして対象のDNA配列のためのDNAプローブによりスクリーンされる。所望するDNAは、PCR技法を用いて増幅され得る。

【0070】

組換えDNAのトランスファー、たとえばハイブリッドベクターのトランスファー及び形質転換された細胞の選択が下記に説明される。

さらに、本発明は、上記組換えDNAにより形質転換された適切な宿主細胞、すなわち本発明の所望する再形状化されたヒト抗体のH鎖をコードするDNA及び/又はL鎖をコードするDNAにより形質転換される宿主細胞にも関する。宿主細胞は細胞当たり多数のベクターのコピーを含むことが好ましい。

【0071】

本発明の宿主細胞は、インビトロ培養できるべきである。適切な宿主細胞は原核又は真核起原のものであり、そして細菌細胞、特にE.コリ、酵母、たとえばサッカロミセスレピシアエ又は哺乳類細胞を包含する。官能テトラマー抗体の生成のための適切な環境を提供するためには、真核、特に哺乳類又は酵母起源の宿主細胞が好ましい。なぜならば、官能テトラマー抗体分子の生合成は正しい新生ポリペプチド鎖折りたたみ及びアセンブリーを必要とする。原核宿主、特にE.コリは、本発明の抗体フラグメント、たとえばFab-及びFv-フラグメントの生成のために使用され得る。

【0072】

適切な宿主の例は、制限又は変性酵素を欠く又はほとんど有さない微生物、たとえば細

10

20

30

40

50

菌、特にE. コリの株、及び酵母、たとえばサッカロミセス セレビスシアエである。

本発明の好ましい宿主細胞は、哺乳類細胞、たとえばCOS-7細胞、Bowes黒色腫細胞、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、胎児肺細胞L-132及びリンパ起原の哺乳類細胞、たとえばリンパ腫、骨髄腫、ハイブリドーマ、トリオーマ又はクオドローマ細胞である。

【0073】

それらの宿主細胞は、2つの別々のベクターの助けにより連続的に又は同時にトランスファーされ、又はこれまで示されたように二重-構造体(L-鎖/H-鎖)ベクターを用いての一段階方法によりトランスファーされた、L鎖遺伝子構造体のみにより、H鎖遺伝子構造体のみにより又は両者によりトランスフェクトされる。他方、連結されていない遺伝子構造体は、宿主細胞中に連続的又は同時にトランスフェクトされ得る。

10

【0074】

上記のような再形状化されたヒト抗体を分泌する両遺伝子構造体によりトランスフェクトされた宿主細胞、特に細胞系EH31.8が好ましい。

本発明の宿主細胞の追加の例は、本発明の抗体の高レベルの発現を促進するように追加のDNA要素を組み込む、H-及びL-鎖遺伝子構造体の他の配向を含む類似する組換えプラスミドによりトランスフェクトされた細胞である。

【0075】

本発明の宿主細胞は、遺伝的に安定しており、一定した特異性の本発明の再形状化されたヒト抗体を生成し、そして好ましくは分泌し、そして強く凍結された培養物を融解し、そして再クローン化することによって活性化され得る。

20

形質転換された宿主細胞は、当業界において知られている方法により、同化可能な炭素源、たとえば炭水化物、たとえばグルコース又はラクトース、窒素源、たとえばアミノ酸、ペプチド、タンパク質、又はそれらの分解生成物、たとえばペプトン、アンモニウム塩又は同様のもの、及び無機塩、たとえば硫酸、リン酸及び/又は炭酸ナトリウム、カリウム、マグネシウム及びカルシウムを含む液体培地において培養される。その培地は、さらに、たとえば増殖促進物質、たとえば微量元素、たとえば鉄、亜鉛、マンガン及び同様のものを含む。

【0076】

培地は好ましくは、選択圧力を付与し、そして形質転換されていない又はハイブリッドベクターを損なった細胞の増殖を防ぐために選択される。従って、たとえば、抗生物質が、ハイブリッドベクターがマーカーとして耐抗生物質性遺伝子を含む場合、培地に添加される。たとえば、必須アミノ酸において栄養要求性であり、そしてハイブリッドベクターが宿主欠損を補足する酵素をコードする遺伝子を含む宿主細胞が使用される場合、前記アミノ酸を欠く最少培地が、形質転換された細胞を培養するために使用される。

30

【0077】

培養は、当業界において知られている方法によりもたらされる。培養条件、たとえば温度、培地のpH値及び発酵時間が、本発明のポリペプチド又は誘導体の最大力価が得られるように選択される。従って、E. コリ又は酵母株は好ましくは、約20 ~ 40、好ましくは約30の温度及び4 ~ 8、好ましくは約7のpHで、約4 ~ 30時間、好ましくは本発明のポリペプチド又は誘導体の最大収率が達成されるまで、振盪又は攪拌しながら、含浸培養により好気性条件下で培養される。

40

【0078】

細胞密度が十分な値に達した場合、培養は中断され、そしてポリペプチド又は誘導体が単離され得る。ハイブリッドベクターが適切な分泌シグナル配列を含む場合、ポリペプチド又は誘導体が、培養培地中に形質転換された細胞により直接的に分泌される。さもなければ、細胞は、たとえば界面活性剤、たとえばSDS, NP-40(TM), Triton(TM)又はデオキシコール酸により破壊されるべきであり、リゾチーム又は同様に作用する酵素により溶解されるべきである、又は浸透ショック又は超音波により破壊されるべきである。細胞の破壊はまた、シグナル配列が細胞周辺に所望するタンパク質の分泌を

50

指図する場合に必要とされるであろう。酵母が宿主微生物として使用される場合、細胞壁は、グルコシダーゼによる酵素的消化により除去され得る。他方又はさらに、機械的力、たとえば剪断力(たとえばFrenchプレス、Dynoミル及び同様のもの)又はガラスビーズ又は酸化アルミニウムと共に振盪又はたとえば液体窒素における交互の凍結、及びたとえば30 ~ 40 での融解並びに超音波処理を用いて、細胞を破壊することができる。

【0079】

タンパク質、核酸及び他の細胞成分を含む、細胞の分解の後に得られた混合物の遠心分離の後に得られた細胞上清液又は溶液は、それ自体既知の態様で、本発明のポリペプチドを含むタンパク質において富化される。従って、たとえばほとんどの非タンパク質成分は、ポリエチレンイミン処理により除去され、そして本発明のポリペプチド及び誘導体を含むタンパク質はたとえば、上記方法により単離される。

10

【0080】

本発明はまた、上記適切な受容宿主細胞が本発明の1又は複数のベクターにより形質転換され、そしてその形質転換された細胞が選択されることを特徴とする、形質転換された宿主細胞の調製方法にも関する。

微生物の形質転換は、たとえばS.セレビスシアエ(A. Hinnenなど, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978)及びE.コリ(M. Mandelなど, J. Mol. Biol. 53:159, 1970)に関して、従来のようにして行なわれる。

20

【0081】

従って、E.コリ細胞の形質転換方法は、たとえばDNA撮取を可能にするために細胞のCa²⁺前処理、及びハイブリッドベクターと共にインキュベートを包含する。形質転換された細胞の続く選択は、たとえばベクターDNAのマーカ配列の性質に依存する親細胞からの形質転換された細胞の分離を可能にする選択培地に細胞をトランスファーすることによって達成され得る。好ましくは、ベクターを含まない細胞の増殖を可能にしない増殖培地が使用される。酵母の形質転換はたとえば、グルコシダーゼによる酵素細胞壁の酵素的処理、ポリエチレングリコール及びCa²⁺イオンの存在下でのベクターによる前記得られたスフェロプラストの処理、及び前記スフェロプラストを寒天に埋め込むことによって前記細胞壁の再生を含んで成る。好ましくは、再生寒天は、上記形質転換された細胞の同時での再生及び選択を可能にする手段で調製される。

30

【0082】

高等真核起原の細胞、たとえば哺乳類細胞系の形質転換は、好ましくはトランスフェクションにより達成される。トランスフェクションは、従来技法、たとえばリン酸カルシウム沈殿、細胞核中へのマイクロインジェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、すなわち細胞膜の透過性を一時的に高める短い電気パルスによるDNAの導入、又は同様の手段により従われる。トランスフェクションは、ヘルパー化合物、たとえばジエチルアミノエチルデキストラン、ジメチルスルホキシド、グリセロール、ポリエチレングリコール又は同様のもの、又はベクターDNA及びリン酸カルシウムの同時沈殿物の存在下で行なわれ得る。

40

【0083】

トランスフェクション工程の後、トランスフェクトされた細胞は、トランスフェクションのために使用されるDNAの選択マーカに適合する選択方法の助けにより同定され、そして選択される。選択マーカは、重金属、たとえば銅又は抗生物質、たとえばG-418(ゲネチシン、ネオマイシン-誘導体)又はヒグロマイシンに対する耐性を付与する遺伝子、又は宿主細胞の遺伝的損傷、たとえばチミジンキナーゼ、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ又は同様のものの不在を補足する遺伝子を含む。たとえば、トランスフェクションのために使用されるDNAがゲネチシン耐性のためのマーカを含む場合、形質転換された細胞は、抗生物質ゲネチシンの存在下での培養により形質転換された細胞から同定され、そして分離される。

50

【0084】

本発明の再形状化されたヒト抗体又はその誘導体は、特に体液、たとえば血清における、インビトロでの及びインビボでの I g E の定性及び定量決定のために有用である。

たとえば、再形状化されたヒト抗体又はその誘導体は、I g E の抗原決定基と前記抗体のパラトープとの間の結合相互作用による既知のいずれかのイムノアッセイに使用され得る。そのようなアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素、イムノフルオレセンス、化学ルミネセンス、免疫沈殿、ラテックス凝集又は血球凝集イムノアッセイである。

【0085】

本発明の再形状化されたヒト抗体は、ラジオイムノアッセイ (R I A) においてそれ自体で又は放射性ラベルされた誘導体の形で使用され得る。R I A のいずれか既知の変法、たとえば可溶相 (均質) R I A、固相 (不均質) R I A、I g E の直接的な又は間接的な (競争) 決定による単一 R I A 又は二重 (サンドイッチ) R I A が使用され得る。

【0086】

そのようなラジオイムノアッセイの例はサンドイッチ R I A であり、ここで適切なキャリアー、たとえばマイクロタイプレート又は試験管、たとえばポリスチレン、ポリプロピレン又はポリ塩化ビニルのプラスチック表面、又はプラスチックビーズ、フィルター紙、デキストラン等、酢酸セルロース又はニトロセルロースシート、磁気粒子又は同様のものが、単純な吸着により又は場合によってはキャリアーの活性化の後、本発明の抗体により被覆される。次に、I g E 及び最終的に、抗原とまた反応し、そしてたとえば ^{125}I により放射性ラベルされる再形状化された抗体を含む試験溶液が添加される。試験溶液における I g E の量は、結合された再形状化抗体の量に直接的に比例し、そしてキャリアーに結合される放射能を測定することによって決定される。

【0087】

本発明の再形状化されたヒト抗体は、酵素イムノアッセイにおいてそれ自体で又は酵素接合された誘導体の形で使用され得る。上記のように、ラジオイムノアッセイに関しては、酵素イムノアッセイのいずれか既知の変法が使用され得る。

試験は、放射性ラベルの代わりに酵素ラベルを用いて上記ラジオイムノアッセイに類似する態様で行なわれる。試験溶液に存在する I g E の量に対応する、形成された免疫複合体の量は、酵素基質溶液の添加により決定される。酵素基質反応は、たとえば眼又は光学的測定装置により観察され得る色の変化をもたらす。

【0088】

本発明の再形状化された抗体は、化学発光アッセイにおいてそれ自体で又は化学発光マーカーと接合された誘導体の形で使用され得る。上記のように、ラジオイムノアッセイに関しては、化学発光アッセイのいずれか既知の変法が使用され得る。

試験は、放射性ラベルの代わりに化学発光ラベルを用いて上記ラジオイムノアッセイに類似する態様で行なわれる。試験溶液に存在する I g E の量に対応する、形成された免疫複合体の量は、発光のきっかけをつくる化合物、たとえば H_2O_2 及び NaOH を添加し、そして光学的測定装置により光の発光を測定することによって決定される。

【0089】

I g E の決定のためへの上記のような本発明の再形状化されたヒト抗体又はその誘導体の使用はまた、それ自体既知の他のイムノアッセイ、たとえば免疫蛍光アッセイ、抗体被覆された又は抗原被覆されたラテックス粒子によるラテックス凝集、抗体被覆された又は抗原被覆された赤血球による血球凝集、抗体被覆された光学繊維を用いての弱い光アッセイ及び結合の出来事を電氣的又は光学的シグナルに転換する他の直接的に作用するイムノセンサーを包含する。

【0090】

本発明の再形状化されたヒト抗体又はその誘導体はまた、好ましくはブランク形成細胞 (P F C) アッセイにおいて、I g E 産生細胞の決定のためにも有用である。

本発明のブランク形成アッセイは、固相イムノアッセイの原理に基づかれている。固相

10

20

30

40

50

イムノアッセイのいずれが既知の変法、たとえばラジオイムノアッセイ、酵素、免疫蛍光又は化学発光イムノアッセイ又は同様の方法が使用され得る。

【0091】

そのようなブランク形成細胞アッセイの例は、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) に基づく PFC アッセイである。IgE - 産生細胞の合計量の決定のためには、サンドイッチ RIA のための上記のような適切なキャリアーが本発明の抗体により被覆される。遠心分離、濾過又は同様の手段により IgE - 産生細胞を含む体液から得られるそのような細胞の懸濁液、及び IgE に対して特異的な第 2 ポリクローナル又はモノクローナル抗体、たとえば酵素、たとえばアルカリホスファターゼと接合される、第 1 抗体以外の IgE の異なったエピトープを認識する本発明の抗体が添加される。試験懸濁液における IgE - 産生細胞の量は、結合された第 2 抗体の量に直接的に比例し、そして着色された反応生成物の進行をもたらす適切な基質溶液を添加し、そして着色されたスポット (ブランク) を計数することによって決定される。特定のアレルゲンに対して向けられた IgE を生成する IgE - 産生細胞の画分の決定のためには、キャリアーがまず、上記のような細胞懸濁液の添加の前、アレルゲン又はアレルゲンの吸着可能接合体により被覆される。アレルゲンに対して向けられる試験懸濁液における IgE の画分は表面結合されたアレルゲンに結合し、そして酵素により接合される本発明の抗体、及び着色された反応生成物の進行をもたらす適切な基質溶液を添加、そして着色されたスポット (ブランク) を計数することによって決定される。

10

【0092】

さらに、本発明は、本発明のモノクローナル抗体及び/又はその誘導体、及び場合によっては、他のモノクローナル又はポリクローナル抗体及び/又は付随物を含んで成る IgE 及び/又は IgE 産生細胞の定性及び定量決定のための試験キットにも関する。

20

ラジオイムノアッセイのための本発明の試験キットは、たとえば適切なキャリアー、1又は複数のモノクローナル抗体の任意に凍結乾燥せしめられた又は濃縮された溶液、放射性ラベルされたモノクローナル抗体又は放射性ラベルされた IgE の溶液、IgE の標準溶液、緩衝溶液及び場合によっては、非特異的吸着及び凝集体形成を防ぐための界面活性剤、ピペット、反応容器、検量曲線及び同様のものを含む。試験キットの 1 又は複数のモノクローナル抗体は、本発明のモノクローナル抗体である。特定のアレルゲンに対して向けられた IgE を生成する IgE - 産生細胞の決定のための試験キットは、さらに、アレ

30

【0093】

酵素イムノアッセイのための本発明の試験キットは、たとえば適切なキャリアー、1又は複数のモノクローナル抗体の任意に凍結乾燥され又は濃縮された溶液、酵素ラベルされたモノクローナル抗体、酵素ラベルされた IgE、ポリクローナル抗 - IgE 血清及び/又は抗 - IgE 抗体を認識し、そして結合する酵素ラベルされたモノクローナル又はポリクローナル抗体の任意に凍結乾燥され又は濃縮された溶液、固体又は溶解された形での酵素质質、IgE の標準溶液、緩衝溶液、界面活性剤、ピペット、反応容器、検量曲線、色彩基準表及び同様のものを含む。試験キットの中の 1 又は複数のモノクローナル抗体は本発明のモノクローナル抗体である。特定のアレルゲンに対して向けられた IgE を生成する IgE - 産生細胞の決定のための試験キットはさらに、アレルゲンの溶液又はアレルゲンの吸着性接合体の溶液を含む。

40

【0094】

さらに、本発明の再形状化されたヒト抗体及びそれらの誘導体は、いずれかの既知の従来の染色技法、たとえば流動細胞計測分析により表面 IgE 陽性 (sIgE⁺) B 細胞の定質及び定量決定のために使用され得る。

さらに、本発明のモノクローナル抗体及び/又はそれらの誘導体は、アレルギーの処理及び/又は予防のために有用である。

【0095】

治療効果は、本発明の再形状化されたヒト抗体及びその誘導体の特定の特徴により Ig

50

E免疫応答をダウンレギュレートすることによって達成される。

それらは、遊離IgEを結合し、そしてFc_EレセプターI又はIIを担持する細胞、特に肥満細胞及び好塩基性細胞へのIgEの結合を阻害することによって、形成されたIgEを中和できる。

【0096】

それらは、表面IgE陽性B細胞(sIgE⁺B細胞)の表面上に発現されるIgEを認識し、そして結合し、そして従って、アレルゲンへの第2の暴露の後、IgE生成をもたらす“記憶プール”を形成するそのような細胞の集団の消耗において有用である。選択された免疫グロブリン(サブ)クラスの再形状化されたヒト抗体の生成の可能性は、sIgE⁺B細胞の特定の殺害をもたらす宿主免疫システムの細胞機構の活性化を可能にする。これはまた、細胞毒性薬物を標的細胞に運ぶであろう、そのような細胞毒性薬物と本発明のモノクローナル抗体との接合体により達成され得る。

10

【0097】

本発明の再形状化されたヒト抗体及びそれらの誘導体はFc_EレセプターI又はIIを担持する細胞、たとえば肥満細胞及び好塩基性細胞上での細胞親和性IgEを認識しないので、それらはそれらの細胞により仲介体開放を誘発しない。

本発明のモノクローナル抗体及びその誘導体はまた、それらは免疫応答におけるIgEの形成に対して有意な阻害効果を有するので、長く続く治療効果を有する。

【0098】

結果的に、本発明の再形状化されたヒト抗体及びそれらの誘導体は、たとえばIgE抗体及び表面IgE陽性B細胞の除去、従ってアレルギー応答を排除し、そしてIgE形成を阻害することによって、徴候を処理するよりもむしろ、アレルギーの根底にある原因に実際的に影響を及ぼす処理を提供する。前記処理は前進する反復された用量を必要とせず、そして本発明の再形状化されたヒト抗体及びそれらの誘導体は、アレルギーの徴候の検出の前、投与による予防処理のために使用され得ることが特に好都合である。

20

【0099】

それらはヒトに投与される場合、弱い免疫原性又は非免疫原性であるので、本発明の再形状化されたヒト抗体及びその誘導体は特に、インビボ診断、治療用途及び予防のために有用である。好ましくは、再形状化されたヒト抗体は、治療目的のために投与される場合、自己タンパク質としてヒトにより許容される。

30

哺乳類のための毎日の治療的用量は、患者の状態及び適用の態様に依存して、体重1kg当たり約0.1mg~10mgである。

【0100】

本発明はまた、本発明の再形状化されたヒト抗体及び/又はその誘導体を含んで成る医薬調製物にも関する。医薬調製物は、たとえば治療的に有効量の再形状化されたヒト抗体及び/又はその誘導体及び無機又は有機固体又は液体の医薬キャリアーを含んで成る。

非経口適用及び吸入のための医薬調製物が好ましい。筋肉内皮下又は静脈適用又は吸入のための調製物は、たとえば凍結乾燥又は濃縮された調製物からの使用のすぐ前、等張水溶液又は懸濁液により調製される。医薬調製物は、滅菌され、そしてたとえば成分を保存し、安定化し、湿潤し、乳化し又は溶解するためのアジュバント、浸透圧の調整のための塩、緩衝液及び/又は粘性を調節するための化合物、たとえば、ナトリウムカルボキシセルロース、デキストラン、ポリビニルピロリドン又はゼラチンを含む。それらは、たとえば従来の混合、溶解又は凍結乾燥による当業界において知られている方法により調製され、そして約0.01%~約50%の活性成分を含む。注射のための調製物は、加工され、アンプル、バイアル又は使い捨て注射装置中に満たされ、そして当業界において知られている方法に従って滅菌状態で密封される。

40

【0101】

本発明の医薬調製物は、ヒトにおけるアレルギー反応、特に、アレルギー性ぜん息、アレルギー性鼻炎及びアトピー性エグゼマ(excema)に関連する即座タイプの過敏性に特有な反応の予防及び処理のために使用され得る。

50

本発明は特に、再形状化されたヒト抗体、組換えDNA、形質転換された宿主細胞、及び例に記載されるようなその調製方法に関する。次の例は本発明を例示するものであって、本発明を制限するものではない。

【0102】

略語： V_L = L鎖可変部； V_H = H鎖可変部；CDR = 相補的決定領域；FR = 骨格領域；HCMV = ヒトサイトメガロウイルス。

材料：

ヒト血漿から精製された、kL鎖を有するヒトIgGは、すべてSigma, Buchs, Switzerlandから購入された(IgG1: I-3889; IgG2: I-4139; IgG3: I-4389及びIgG4: I-4639)。ヒト骨髄腫血清からのヒトIgM(カタログ番号PHP003)及びヒトIgD(カタログ番号PHP005)は、Serotecから得られた。ヒト血漿からのIgA(IgA1: 400105; IgA2: 400108)は、Calbiochem, Laufelfingen, Switzerlandから得られた。

10

【実施例】

【0103】

例1: モノクロナール抗体C2の V_L 及び V_H の分子モデル構築

ヒトIgEを認識するマウスのモノクロナール抗体C21の V_L 領域(配列番号1)及び V_H 領域(配列番号2)の分子モデルは、 V_L については、高い相同性のマウスの抗リゾチーム抗体HyHEL-10(Padlan, E. A., Silverton, E. W., Sherif, S., Cohen, G. H., Smith-Gill and Davies, D. R., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 5938; Brookhaven Database中に配列3HFMと称されている、Bernstein et al., J. Mol. Biol. 112, 535-542(1977))の解析構造に基づいて構築され、そして、 V_H については、マウスの抗リゾチーム抗体HyHEL-5(Sherif, S., Silverton, E. W., Padlan, E. A., Cohen, G. H., Smith-Gill, S. J., Binzel, B. C. and Davies, D. R., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 8075; 前記のBrookhaven Database中に配列2HFMと称されている)の解析構造に基づいて構築される。mAb C21及びHyHEL-10又はHyHEL-5のL鎖及びH鎖の可変領域は、それぞれ、91%と90%のアミノ酸の同一性を有している。このモデルは、UNIXオペレーティング・システム下に作動するSilicon Graphics IRIS 4D上で、そして分子モデル構築パッケージQUANTA(Polygen Corp., USA)を使用して構築される。このフレームワーク内の同一残基は保持され; 非同一残基はQUANTAの蛋白モデル構築能力に取り込まれた最大重複手段(Snow, M. E. and Amzel, L. M., 1986, Proteins 1: 267)を用いて置換される。

20

30

【0104】

マウスC21抗体由来の、 V_L 領域の相補的決定領域CDR1(L1), CDR2(L2)及びCDR3(L3)並びに V_H 領域の相補的決定領域CDR1(H1)及びCDR2(H2)は、以前に仮定された標準的な形態(Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sherif, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M. and Poljak, R. J., 1989, Nature, 342: 877)に一致する。これらのループの主鎖のねじれ角は、元の抗体の構造内のもの(L-1~L-2のためのHyHEL-10及びH-1~H-2のためのHyHEL-5)と同じに保たれている。 V_H 領域のCDR3(H3)については、標準的な構造は存在せず、それ故、異なってモデル化される。30の候補ループが、QUANTA内で実行され

40

50

る如き頒布されたアルゴリズム (Jones, T. A. and Thirup, S., 1986, EMBO J., 5: 819 - 822) を使用して、91の高分解蛋白構造から抽出され、そして最も良い変異体が肉眼により選ばれる。このループは、H3 CDRのいずれかの側の上の3つのフレームワーク残基上で固定されている。従って、V_H領域のH3は、CDR3 (L3) に大まかに対応している残基87 ~ 106の領域内のBence-Jones蛋白RHE (Furey, W., Wang, B. C., Yoo, C. S. and San, M., 1983, J. Mol. Biol., 167: 661 - 692) 上でモデル化される。

【0105】

好ましくない原子接触を緩和し、そしてファン・デル・ワールス力及び静電相互作用を最適化するために、QUANTA内で実行される如きCHARMポテンシャル (Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S. and Karplus, M., 1983, J. Comp. Chem., 4: 187) を用いて、最も急な降下のそして結合勾配エネルギーの細小化に供される。

【0106】

例2：再形成化されたヒトC21のV_L及びV_H領域の設計

再形状化されたヒトC21のV_L及びV_H領域のデザインは、第一に、KABATデータベース (Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., Perry, H. M. and Gottesman, K. S., 1987, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office) に見られるようなヒトV_L及びV_H領域の上記共通配列 (consensus sequence) (変異体C21-L1, C21-L2, C21-L3, C21-H1及びC21-H3) に基づいている。さらに、2つの、より再形状化されたヒトC21のV_H領域 (C21-Hay1及びC21-Hay3) は、個々のヒト抗体のフレームワーク領域 (FR) に基づいている。

【0107】

共通性に基づく再形状化ヒトC21可変領域の設計のために、マウスC21抗体からのV_L及びV_H領域のアミノ酸配列を、上記KABATデータベースからのヒト抗体のV_L及びV_H領域のための上記共通配列と比較する。この分析により、マウスC21 V_L領域及びマウスC21 V_H領域が、それぞれ、ヒト・カップV_LサブグループIII共通配列 (77%のアミノ酸配列が同じ) 及びヒトV_HサブグループI共通配列 (71%のアミノ酸配列が同じ) に最も似ていることが、明らかにされる。これらのヒト共通配列を、ネズミC21のCDR及びその対応共通配列のヒトFRを含む、上記の再形状化されたヒトC21のL及びH鎖可変領域C21-L0及びC21-H0を設計するために使用する。良好な抗原結合を達成するのに潜在的に重要であり、そしてV_L/V_Hパッキングに対して臨界的であることができるであろうフレームワーク残基を同定するために、マウスC21可変領域の分子モデル (例1) を使用する。このグラフィック分析の結果として、FR内の著名なヒト共通アミノ酸のいくつかを、それらの対応するマウスC21残基と交換する。これらの交換は、以下の範疇の1つに陥らない場合には、ヒト・フレームワーク領域内にのみあると考える。

(1) ヒト共通配列 (ヒト・サブグループ1 ; HSG1) は、この位置で好まれる主要なアミノ酸を全く示さないが、元のマウスC21配列中に見出されたアミノ酸は、その対応するヒト免疫グロブリン可変領域サブグループの少なくとも1つの別個の配列内に存在する。例えば、HSG1は、アミノ酸残基19に共通配列をもたないと記載されている (Kabat他、前記)、但しいくつかのヒト抗体は、この位置にLys残基をもっている。Lysは、上記C21配列中にもあるので、それが、上記再形状化抗体中に保持されている。

〔2〕フレームワーク位置でのアミノ酸は、仮定された標準的な構造の一部であり、上記CDR又は超可変領域ループの構造を決定することにおいて重要であり、そしてそれ故、その抗原結合部位の形状及び完全性を維持するために必須であると思われる (Chothia, C. and Lesk, A. M., 1987, J. Mol. Biol., 196: 901; Chptia, C. et al., 1989、前記)。

【0108】

これらの規則に従って、上記再形状化されたヒトL鎖及びH鎖の可変領域C21-L0及びC21-H0内の4つ及び6つのアミノ酸を、ヒト共通配列と比べたときに、交換し、変異体C21-L1及びC21-H1を生じさせる。この交換されたアミノ酸の位置は、C21-L1及びその以下に決定された修飾変異体C21-L1(配列番号5)中の、1, 3, 49及び60である。C21-H1(配列番号11)中では、交換アミノ酸の位置は、38, 40, 67, 70及び87である。上記の規則の例外は、上記再形状化されたヒトC21_{V_H}領域の位置76であり、当該位置で、我々は、上記ヒトV_H共通配列中に見つけられるような、この位置のための最も頻度の多いヒト・アミノ酸(thr)を選択する。

【0109】

V_L及びV_Hの更に新しい変異体は、(それぞれ、C21-L1及びC21-H1と比較しての)以下の変更を含んでいる：

C21-L2(配列番号7)：位置60でのアスパラギン酸(セリンの代わり)C21-L3(配列番号9)：位置1でのグルタミン酸(アスパラギン酸の代わり)；位置3でのバリン(ロイシンの代わり)；

C21-H3(配列番号13)：位置38でのアルギニン(リジンの代わり)；位置40でのアラニン(アルギニンの代わり)；位置67でのアルギニン(リジンの代わり)；位置87でのアルギニン(トレオニン)

C21-L1及びC21-H1を用いたデータベース検索により、再形状化されたヒトC21_{V_L}変異体C21-L1が、ヒト・カップL鎖可変領域HUMIG KAF(EMBL database, Heidelberg, Germany; Newkirk, M. M., Gram, H., Heinrich, G. F., Oestberg, L., Capra, J. D. and Isserman, R. L., 1988, J. Clin. Invest., 81: 1511-1518)に最も似ている(91%の配列が同じ)こと、並びに、再形状化されたヒトC21_{V_H}変異体C21-H1が、ヒトH鎖可変領域HUMIG HAY(EMBL database、前記; Dersimonian, H., Schwartz, R. S., Barrett, K. J. and Stollar, B. D., 1987, J. Immunol., 139: 2496-2501)に最も似ている(78%の配列が同じ)ことが、明らかになる。これらの配列は、以下に、それぞれ、KAF及びHAYと称する。KAF及びヒト・カップV_LサブグループIII共通配列のFRは、位置49及び85のみで異なる。位置49では、その推定の抗原結合のために、その対応マウスC21アミノ酸(リジン)が保持されている、しかるに、位置85では、ヒトV_L III共通アミノ酸であるバリンが、KAF内にみられるメチオニンに交換されている。従って、C21-L1の変更された変異体は、C21-L1(配列番号5)と名付けるが、個々のヒトL鎖可変領域KAF(Newkirk, M. M. et al., 1988、前記)に基づいている。それは、その中に位置85でバリンの代わりにメチオニンが在るということにおいて、第一の変異体C21-L1とは異なっている。この再形状化された変異体C21-L2(配列番号7)及びC21-L3(配列番号9)も、位置85にメチオニンをもっている。

【0110】

反対に、ヒトH鎖可変領域HAY及びヒトV_HサブグループI共通配列のFRは、数カ所で異なっている。この個々のヒト抗体に高程度の類似性を示す再形状化されたヒトC21_{V_H}領域を構築するために、再形状化されたヒトC21_{V_H}領域の2以上の変異体を、ヒトH鎖可変領域HAYのH鎖可変領域由来のFRに基づき設計する。HAYを基礎

10

20

30

40

50

とする再形状化されたヒトC21_{V_H}変異体の構築は、再形状化されたヒトC21変異体C21-H1及びC21-H3の、FR2及びFR3内の、それぞれ、位置43, 44, 48, 76及び77での5つの変更を必要とする。これらのHAYを基礎とする変異体を、それぞれ、C21-Hay1(配列番号15)及びC21-Hay3(配列番号17)と称する。HAY及びヒトV_HサブグループI共通配列のFR間の、位置30及び72での2つの追加の違いは、マウスC21_{V_H}領域内のものとして保持され、そして交換されるものとして見なされていない。なぜなら、それらは、CDRの構造を定義している標準的な残基であるからである(Chothia, C. et al., 1989、前記)。

【0111】

例3: ヒト化抗体遺伝子の設計及び構築

ヒト化抗体遺伝子カセットの設計のために、効率的な発現及びクローニングに必要な追加の配列を、得られたコード領域の5'-及び3'-末端に追加する。再形状化ヒトC21抗体の効率的な発現のための真核生物のリーダー配列を、フレーム内で、設計されたヒト化可変領域に追加する。再形状化ヒトC21_{V_L}領域のためのリーダー配列は、そこからの可変領域がC21_{V_L}領域の再形状化のために使用されるヒト抗体KAFのカッパL鎖内で見つかったリーダー配列(Newkirk, M. M. et al., 1988、前記)から得られる。再形状化ヒトC21_{V_H}領域のためのリーダー配列は、ヒト抗体HG3_{CL}(Rechavi, G., Ram, D., Glazer, L., Zakut, R. and Givol, D., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80: 855-859)、すなわち、ヒトV_HサブグループIのメンバー(Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., Perry, H. M. and Gottesman, K. S., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition. U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office)のH鎖内に見つけれられたリーダー配列から得られる。再形状化ヒトC21_{V_L}/_{V_H}領域のための、得られた蛋白配列を、次に、Genetics Computer Group, University of Wisconsin, USAのSequence Analysis Software Package内に見られるような、マウス配列のためのコドン慣用表(Codon Usage Table)を使用して、DNA配列に逆翻訳する。そしてまた、設計されたDNAフラグメントに、その5'-末端で、真核生物の翻訳シグナル(Kozak, M., 1987, J. Mol. Biol., 196: 947-950)を、その3'-末端で、供与体のスプライジング部位(Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F. and Chambon, P., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 4853-4857)を、そしてその設計された哺乳類発現ベクターへの便利なサブクローニングのためのHindIII(5'-末端)及びBamHI及びXbaI(3'-末端)を追加する。

【0112】

上記の再形状化ヒトC21_{V_L}及びV_H領域C21-L1及びC21-H1をコードする設計されたヒト化抗体遺伝子カセットを、次に、合成DNAポリヌクレオチドを使用した遺伝子合成により構築する。完全なDNAフラグメントを、20個のヌクレオチドにより、互いに重複する6つの領域に再分割する。それぞれの再形状化ヒトC21可変領域遺伝子カセットのために、6つの5'-リン酸化及びPAGE-精製ポリヌクレオチド、すなわち、C21-LA(配列番号19)、C21-LB(配列番号20)、C21-LC(配列番号21)、C21-LD(配列番号22)、C21-LE(配列番号23)、C21-LF(配列番号24)、C21-HA(配列番号25)、C21-HB(配列番号26)、C21-HC(配列番号27)、C21-HD(配列番号28)、C21-HE(配列番号29)~HF(配列番号30)と名付けるものを、Genosys Bi

10

20

30

40

50

otechnologies, houston, Texas, USAから購入する。次に、それらを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく遺伝子合成において組み立てる。5ピコモルのそれぞれのポリヌクレオチド(すなわち、LA~LF)を、最初にアニーリングし、そして10mMのTris-HCl pH8.3、1.5mMのMgCl₂、50mMのKCl、10mMのβ-メルカプトメタノール、0.05%(w/v)のTween-20、0.05%のNP-40(Merck, Zurich)、200μM/dNTPs(N=G, A, T又はC)及び5UのVent™ DNAポリメラーゼ(New England Biolabs)を含む100μlの反応液内に希釈する。温度段階は、Techne PHC-2温度サイクラーを使用して、95 / 1分、50 / 2分及び72 / 4分である。この第一のサイクルの後、オリゴヌクレオチド・プライマー、C21-5 (配列番号31)及びC21-L3 (配列番号33)又はC21-H3 (配列番号32)の50ピコモルを所望の5' - 及び3' - 末端でハイブリダイズさせ、完全な長さのDNAフラグメントを添加し、そして以下: 95 / 1分、60 / 2分及び72 / 2分、のサイクリング・パラメーターを使用する約20サイクルのPCR反応において増幅する。次に、このPCR混合液を、クロロホルム1容量で1回抽出し、そして8M LiClの1/10容及びエタノールの3容の添加により、そのDNAを沈殿させる。この沈殿DNAを、H₂Oに再溶解し、そして供給者(Boehringer, Mannheim, Germany)により示された条件下で、HindIII及びBamHI制限酵素処理エンドヌクレアーゼにより処理する。所望のサイズのDNAフラグメント(C21-L1=416塩基対及びC21-H1=459塩基対)を、1%アガロース/TBE内で、電気泳動により精製し、そしてそのゲルから切除する。ゲル片をより小さなフラグメントに切断し、液体窒素中5分間で冷凍し、そして次に、マイクロ遠心分離機内の遠心分離(30分間、136000×g)により、ガラスウールを通して溶出する。室温での、フェノール-クロロホルム抽出及びLiCl/エタノール沈殿の後、上記の精製HindIII-BamHI制限フラグメントを、pBluescript KS II M13+(Stratagene)にサブクローニングし、そしてコンピテント大腸菌(*E. coli*)細胞(GIBCO-BRLからのHB101株)にトランスフェクトする。正確なサイズのDNA挿入物を含むKS+C21/L1又はC21/H1のどちらかの多数のプラスミド・クローンを、Sequenase(USB)を使用して配列決定する。このDNA配列内の点突然変異誘発及び/又は欠失を、異なったクローン間でのDNA制限酵素フラグメントの交換及び/又は頒布された手順(kammann, M., Laufs, J., Schell, J. and Gronenborn B., 1989, Nucl. Acids Res., 17: 5404)に従うオリゴヌクレオチド特異的PCR突然変異誘発により訂正する。正しいDNA配列を示すHindIII-BamHIフラグメントを、次に、L又はH鎖発現ベクターにサブクローニングし、プラスミドHCMV-カップ-C21/L1及びHCMV-ガンマ1-C21/H1(図1に示す)を創出する。ここでは、再形状化ヒトL又はH鎖可変領域をコードする上記のHindIII-BamHIフラグメントは、それぞれ、ヒト・カップ及びガンマI定常領域をコードするDNAに結合されている。両方のプラスミドは、Simian Virus 40(SV40)、HCMVエンハンサー・ドメイン、HCMVプロモーター、及びアンピシリン選択遺伝子の原型を含んで成る(kettleborough et al., 1991、前記)。

【0113】

再形状化ヒトC21 V_L領域変異体C21-L2及びC21-L3を、PCR反応の間に生じる組み換え事件(Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Ehrlich, H., 1986, Cold Spring Harbour Symp., 51: 263 and Yelov, A. A. and Shabarova, Z. A., 1990, Nucl. Acids Res., 18: 3983)を利用するオリゴヌクレオチド-特異的突然変異誘発により作り出す。オリゴヌクレオチド・プライマー、C21-5 (配列番号31)、L/D60SL(配列番号35)、L/D60S-SL(配列番号36)(C21-L2のため

の)、RSP(配列番号34)、L/E1D-V3L(配列番号37)、L/E1D-V3L-SL(配列番号38)(C21-L3のための)及びC21-L3(配列番号33)(C21-L2及び-L3のための)を、2つのL鎖のV-領域変異体のそれぞれのための、2つのDNAフラグメントをPCR増幅により作りだすために合成する。ターミナル・オリゴヌクレオチド・プライマー(C21-5, RSP及びC21-L3)を除き、オリゴヌクレオチドは、所望のコドン変更の必要のある配列を取り込む。プライマー対RSP及びL/E1D-V3Lを除き、約50ピコモルの適切なプライマー対を、約10ngのKS+C21/L1由来XhoI-NotIフラグメントと組合せ、3ユニットのVentTM DNAポリメラーゼ及び25PCR増幅サイクルを使用する(60/25秒、72/40秒及び93/25秒)。プライマー対RSP及びL/E1D-V3Lのために、約150ngのKS+C21/L1プラスミドDNAをテンプレートとして使用し、35サイクル(40/30秒、72/1分及び93/30秒)を使用して所望のDNAフラグメントをPCR増幅する。これらの反応の生成物を、アガロース・ゲル電気泳動により精製し、最初に結合させ、そして約5~30ngのそれぞれのDNAフラグメントを、5ユニットのVentTM DNAポリメラーゼにより増大させる(95/1分、50/2分及び72/4分)。ターミナル・オリゴヌクレオチド・プライマーC21-5及びC21-L3を次に添加し、そしてその結合した完全な長さのDNAフラグメントを、25サイクル(95/1分、50/2分及び72/2分)を使用してPCR増幅する。C21-L2及びC21-L3のためにPCR増幅されたDNAを、次に、DNA制限エンドヌクレアーゼHindIII及びBamHIを使用した処理の後、pBluescript KS II M13+(Stratagene)にサブクローニングする。次に、正しい配列を、前記のように、HCMV-ガンマ1-発現ベクターに転移させる。

【0114】

再形状化ヒトC21_{V_H}領域変異体C21-H3, C21-Hay1及びC21-Hay3を、C21-L1及びC21-L2のために記載された同様の方法で作る。これらのC21_{V_H}領域変異体を得るために、オリゴヌクレオチド・プライマー、C21-5, H/R38K-A40R-L(配列番号39)、H/R38K-A40R-SL(配列番号40)、H/R67K-L(配列番号41)、H/R67K-SL(配列番号42)、H/R87T-L(配列番号43)、H/R87T-S(配列番号44)、HayFR2(配列番号45)、HayFR2-S(配列番号47)、HayFR3(配列番号48)、HayFR3S(配列番号49)及びC21-H3を、DNAテンプレートとして、すなわち、異なった再形状化ヒトC21のV_H変異体のための所望のコドン変更を含む2本鎖DNAフラグメントとして、C21-H1(C21-H3及びC21-Hay1のための)及びC21-H3(C21-Hay3のための)を使用したPCR増幅のために使用する。対応するアガロース・ゲル精製フラグメントを次にPCR組み換えし、前記のように、完全な長さのDNAフラグメントを産生する。DNA制限エンドヌクレアーゼHindIII及びBamHIによる処理、これに続く、前記のpBluescript KS II M13+(Stratagene)へのクローニングの後、HCMV-ガンマ1-発現ベクターにクローニングされる前にその正しい配列についてプラスミドのクローンをチェックする。

【0115】

例4: COS細胞中の組み換えプラスミドのトランジェント発現

再形状化ヒトC21_H及びL鎖をコードする遺伝子を有するHCMV発現ベクターの10µgを使用して、COS細胞をエレクトロポレーションする。10µgのH-及びL-鎖発現プラスミドを、PBS/o(GIBCO-BRL, Basel, Switzerland)により供給されたCa²⁺及びMg²⁺を欠くPBS; cat. no. 041-04190M)中のCOS細胞の1×10⁷細胞/ml懸濁液0.8mlに添加する。次に、Bio-Rad Gene Pulserを、上記懸濁細胞に、25µFの静電容量での1900Vのパルスを送るために使用する。この細胞は、5%v/vのガンマグロブリ

ンを含まず、そして熱により不活性化されたウシ血清 (G I B C O - B R L , B a s e l , S w i t z e r l a n d ; c a t . n o . 0 6 3 - 0 6 5 1 0 H) を含む 1 0 m l の D M E M に プレーティングする前に、1 0 分間、回復に供される。7 2 時間のインキュベーションの後、培地を回収し、細胞及び細胞破壊物を取り除くために遠心分離する。次に、この C O S 細胞の上澄み液を、0 . 4 5 μ m の膜を通して濾過し、そして E L I S A により、ヒト・ガンマ 1 / カッパ・イソタイプの集合した抗体の存在について分析する。このヒト化抗体を、更に、蛋白 A アフィニティー・クロマトグラフィーにより精製する。

【 0 1 1 6 】

例 5 : ヒト I g G / カッパ製造のための E L I S A 検定

9 6 - w e l l のマイクロタイター・プレート (N u c M a x i S o r b , c a t , N o . 4 3 9 4 5 4) を、P B S / o , p H 7 . 2 中のヤギ抗ヒト I g G (F c 特異的 ; D i a n o v a , # 1 0 9 - 0 0 5 - 0 9 8) の 1 : 1 0 0 0 希釈の 5 0 μ l により、一夜、被覆する。この段階及び全てのこれに続く段階の後、プレートを、2 0 0 μ l の P B S T (0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を含む P B S / o p H 7 . 2) で 3 x 洗浄する。自由な結合部位を、1 0 0 μ l の R I A - バッファー (P B S T 中の 1 % ウシ血清アルブミン) により、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間、保護する。5 0 μ l のサンプル、及び R I A - バッファー中のそれらの希釈液を添加し、そして混合液を 3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションする。高精製組み換えヒト抗体 F 5 - 4 4 4 (ヒト・ガンマ 1 / カッパ・イソタイプ、欧州特許出願第 4 9 8 7 6 7 号) が、標準として役立つ。R I A - バッファー中のワサビダイコン・ペルオキシダーゼ (S i g m a , B u c h s , S w i t z e r l a n d ; c a t . n o . A - 7 1 6 4) と結合したアフィニティー - 精製ヤギ抗 - ヒト・カッパ - L 鎖抗血清の 1 : 1 0 0 0 希釈液の 5 0 μ l を、次に使用し、そして 3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションする。A B T S (2 , 2 - アジノ - ビス (3 - エチルベンズ - チアゾリン - 6 - スルホン酸)) 基質溶液 (B i o R a d , G l a t t b r u g g , S w i t z e r l a n d ; # 1 7 2 - 1 0 6 4) を、発色のために使用する。適切なインキュベーション時間の後、この酵素反応を 2 % (w / v) のシュウ酸の等容量を使用して停止させる。4 1 5 n m での吸収を、結合し、そして十分に集合したヒト抗体の定量化のために使用する。

【 0 1 1 7 】

例 6 : C O S 細胞上澄み液からのヒト抗体の蛋白 A 精製

トランジェント発現したヒト化抗体を、H R 5 / 5 F P L C カラム (P h a r m a c i a , U p p s a l a , S w e d e n) 中に充填した 1 m l の P r o s e p A カラム (B i o p r o c e s s i n g L t d , D u r h a m , E n g l a n d) 上のアフィニティー・クロマトグラフィーにより精製する。このカラムを、F P L C 系 (P h a r m a c i a , U p p s a l a , S w e d e n) 上で、2 m l / 分の一定流速で操作し、そしてこのカラムから溶出する蛋白を、2 8 0 n m での紫外線吸収によりフロー・セル内で検出する。このカラムを、P B S / o p H 8 . 0 (2 0 m M リン酸 N a , 1 5 0 m M N a C l) の 1 0 カラム容量で洗浄すること、1 0 0 m M のクエン酸ナトリウム・バッファー p H 3 . 0 による前溶出すること、及び P B S / o p H 8 . 0 の 1 0 カラム容量による再平衡することにより、調製する。0 . 4 5 μ m 膜を通しての濾過により清澄化された、C O S 細胞上澄み液 (2 0 ~ 5 0 m l) を、蠕動 (p e r i s t a l t i c) ポンプにより上記カラムの上に直接的に充填する。次に、このカラムを、紫外線吸収がベースラインに戻るまで P B S / o p H 8 . 0 で洗浄する。次に、ウシ I g G を、このベースラインがゼロに戻るまで 1 0 0 m M クエン酸ナトリウム・バッファー p H 5 . 0 で洗浄することにより、溶出する。最後に、1 0 0 m M クエン酸ナトリウム・バッファー p H 3 . 0 を使用して、ヒト化抗体を溶出して、そしてその溶出液を、1 M T r i z m a - B a s e (S i g m a , B u c h s , S w i t z e r l a n d) の添加により、直ちに p H 7 . 0 に調整する。このヒト化抗体の精製度を、C o o m a s s i e ブルー染色 (L a e m m l i , U . K . , 1 9 7 0 , N a t u r e , 2 7 7 : 6 8 0 - 6 8 5) を使用した S D S - ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動により分析する。バイオセンサー分析のために、この中性とした蛋白 A の溶出液を、C e n t r i c o n - 1 0 マイクロコンセントレーター (A m i c o n) 内で濃縮し、そしてこの

バッファーをPBS/o pH7.2に変更する。この抗体調整物の精製度に依存して、この蛋白濃度を、280nmでの紫外線吸収、又は、標準として既知の、マッチングするイソタイプの精製組み換えキメラ抗体F5-444を使用するヒト・ガンマ/カップELISAの、いずれかにより定量する。

【0118】

例7：生体特異的相互作用検定(BIA)による、マウスと再形状化ヒトC21

抗体との結合活性及び特異性の分析

再形状化ヒトC21可変L及びH鎖の異なった組合せの結合活性(avidity)及び特異性(specificity)を、リアルタイムの生体特異的相互作用検定(Joensson, U., Faegerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Loeffas, S., Persson, B., Roos, H., Roennberg, I., Sjoelande r, S., Stenberg, E., Stahlberg, R., Urbaniczky, C., OEstlin, H. and Malmqvist, M., 1991, BioTechniques, 11:620-627)を使用して分析する。全ての実験を、CM5センサー・チップを使用したBIACore商標システム(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden)上で実施する。捕獲(capture)抗体として、約11,000RU(11ng/mm²)のポリクロナル・ウサギ抗マウスIgG1(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden, cat.no. BR-1000-55)又はウサギ抗ヒトIgG(Pharmacia Biosensor ABから得る)を、本質的に先に記載された(Joensson, U. et al., 1991, 前記)それらのアミノ基及びEDC/NHSの化学を使用して、上記センサー・チップ上に固定する。ヒトIgEへの結合の集合速度を決定するために、それぞれの抗体について、4つの実験サイクルを実施する。それぞれのサイクルは、一定量のテスト抗体とその対応する受取抗体との結合、これに続く、このテスト抗体と固定濃度抗体(ヒトIgE;モノクロナール抗体SE44;3.125, 6.25, 12.5及び25nM)との相互作用、これに続く、40mM HClを使用したその表面の最終的な再生から成る。実験の詳細は、以下のようである：

【0119】

- 〔1〕流速は、5µl/分であり；
- 〔2〕HBS(10mM HEPES、3.4mM EDTA、150mM NaCl、0.05% BIA界面活性剤、pH7.4)を操作バッファーとして使用し；
- 〔3〕テスト抗体(PBS/o pH7.2中の)を、HBS中で、最終濃度5~10µg/mlまで希釈し、そして捕獲抗体に結合させ、1300~2200RU(1.3~2.2ng/mm²)の結合テスト抗体を得て；
- 〔4〕ヒト・モノクロナール抗体IgE(SE44)を、上記結合テスト抗体上を9分間通過させ；
- 〔5〕4µlの40mM HClを、抗体-抗原複合体を取り出すために使用し、そして次のサイクルのために、その表面を準備し；
- 〔6〕この検定温度を25とする。

この抗体-抗原相互作用の集合定数を、次に、Biocore商標システム内で実行されるコンピュータ・プログラムを使用して計算する。

【0120】

分解速度定数を決定するためにも、同様のプロトコールを使用する、但し、分解相は含まれない。検定条件は、先に記載したものと同一である。テスト抗体を、固定された受取(catching)抗体を介して、最初に上記センサー・チップ表面に結合させる。最も高い濃度(25nM)でのIgE(SE44)を、上記抗体に結合させる。結合後、HBSバッファーを、5µl/分の一定流速で上記センサー・チップ表面を通過させ、そして15~25分間にわたり共鳴シグナルの減少を監視する。このセンサー・チップを、最後に、4µlの40mM HCl溶液で洗浄することにより再生する。抗体：IgE複合体の

分解は、一次反応であるため、このセンサーグラムの線型部分を、B I O C O R E 商標システム内で実行されるコンピュータ・プログラムを使用してその分解速度定数を計算するために使用する。

【 0 1 2 1 】

ヒト化 C 2 1 抗体の、速度定数 $K_{a s s}$ (抗体 - 抗原集合物の速度定数) 及び $K_{d i s s}$ (抗体抗原複合体の分解の速度定数) 及び結合活性 (等量定数 $K_{a f f}$ により表される) を、表 1 に要約する。

表 1 : 再形状化ヒト C 2 1 抗体の速度定数及び結合活性。 $K_{a s s}$ については、独立実験の数をカッコ内に与え ; それぞれの $K_{d i s s}$ を、2 つの独立した実験において決定する。

【 0 1 2 2 】

【 表 1 】

抗 体	$K_{a s s} \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$	$K_{d i s s} \times 10^5 M^{-5} s^{-1}$	$K_{a f f} \times 10^{10} M^{-1}$
TES-C21	2.4±0.3 (6)	2.6±0.0	0.92±0.12
C21-H1/L1	2.6±0.1 (3)	3.0±1.1	0.87±0.32
C21-H1/L2	2.8±0.1 (3)	5.7±0.2	0.49±0.02
C21-H1/L3	2.9±0.4 (3)	6.2±1.0	0.47±0.10
C21-H3/L1	2.5±0.3 (3)	1.9±0.6	1.32±0.44
C21-H3/L2	2.5±0.3 (4)	4.4±0.7	0.57±0.11
C21-H3/L3	2.6±0.5 (3)	3.5±0.2	0.74±0.15
C21-Hay3/L1	2.5±0.3 (3)	4.1±0.6	0.61±0.12
C21-Hay3/L2	2.5±0.3 (3)	3.1±0.6	0.81±0.18
C21-Hay3/L3	2.6±0.3 (3)	15.9±1.8	0.16±0.03

10

20

【 0 1 2 3 】

これらのヒト C - 2 1 抗体の全ては、殆ど同じ集合定数をもっている。結合の結合活性における減少は、主に、高い分解速度により引き起こされる。再形状化ヒト C 2 1 L 鎖の異なる変異体を、そのアミノ末端での位置 1 及び 3 の重要性について分析する。抗原への良好な結合は、これらの位置でのアミノ酸が上記 C 2 1 L 鎖中に在るものと同じであるとときに得られる。完全なヒト K A F を使用すれば、F R 1 が、その H 鎖パートナーにも係わらず結合を減少させる。

30

【 0 1 2 4 】

本再形状化ヒト C 2 1 抗体を、生体特異的相互作用検定により、ヒト免疫グロブリンの全てのイソタイプへの結合についてもテストする。最初に、テスト抗体を、前記のように、センサーチップ上の固定化捕獲抗体に別々に結合させる。次に、それぞれの固体化ウサギ抗 - ヒト I g G とウサギ抗 - マウス I g G 1 抗体との交差活性を、全イソタイプ、I g M , I g D , I g A 1 , I g A 2 , I g G 4 , I g G 3 , I g G 2 , I g G 1 及び I g E (S E 4 4) のヒト免疫グロブリンの 5 μ g / ml をそれぞれ 5 分間上記前処理された表面上に次々に通過させる前に、キメラ抗 - C E A 抗体 1 0 μ g / ml R e K . 4 1 を使用して 5 分間遮断 (b l o c k) する (ヒト・ガンマ 1 / カッパ、欧州特許出願第 3 2 3 8 0 6) 。最後に、この表面を、4 0 m M H C l により再生する。流速、温度及び他の条件は、前記のものと同じである。センサーグラムを、B I O C O R E 商標システムを使用して記録する。本再形状化されたヒト C 2 1 抗体は、ヒト I g E イソタイプに特異的である。

40

【 0 1 2 5 】

例 8 : 永久細胞系の調製

トランスフェクションのための、再形状化された T E S C - 2 1 ヒト C M V H - 及び L - 鎖発現ベクターのプラスミド D N A を、塩化セシウム勾配における平衡のための遠心分離により 2 回精製する。この組み換え免疫グロブリン遺伝子を、Gene P u l s e r 装置 (B i o R a d , R i c h m o n d , C A) の使用によるエレクトロポレーション

50

により、マウス骨髄腫NSO細胞に導入する。NSO細胞 ($2 \sim 3 \times 10^7$) を、リン酸塩 - バッファー生理食塩水 (PBS) で洗浄し、そしてBspCI - 線状化H - 及びL - 鎖プラスミドDNAのそれぞれ $10 \mu\text{g}$ を含む 0.8 ml のPBSに再懸濁する。 210 V の電場及び $960 \mu\text{FD}$ の静電容量で、エレクトロポレーションを実施する。回収した細胞を、 2% FBS (胎児ウシ血清) を含む無蛋白ハイブリドーマ培地 (PFHM, Gibco) 中で希釈し、そして 96-well のマイクロタイター・プレート内に well 当たり 10^4 細胞でプレATINGする。48時間のインキュベーションの後、トランスフェクト細胞を、 0.7 mg/ml のG418 (Gibco) 及び 2% のFCS (胎児ウシ血清) を含むPFHM内で選択する。2週間後、薬剤耐性コロニーを含む well を、ELISAによるヒトIgGの製造のために、スクリーニングする。ELISAは、上記培養上澄み液内に発現した組み換えヒトIgG/カップパ抗体の定量のために開発される。Immulon 2 (Dynatech Labs) の 96-well プレートを、室温で、PBS中の $0.5 \mu\text{g/ml}$ のヤギ抗 - ヒト・カップパ抗体 (Southern Biotech) の $100 \mu\text{l}$ により、一夜被覆する。次に、 well を、Blotto (PBS中の 5% 乾燥ミルク粉) により1時間、ブロックし、そして 0.05% のTween - 20 (PBST) を含むPBSで洗浄する。培養上澄み液 ($50 \mu\text{l}$) を、上記被覆 well に添加し、そして1時間インキュベーションする。PBSTで洗浄後、Blotto内で $1/50,000$ に希釈したワサビダイコン・ペルオキシダーゼ - 結合のヤキ抗 - ヒトIgG (Fc) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab) の $100 \mu\text{l}$ を、それぞれの well に添加し、そしてそのプレートを1時間インキュベーションする。 0.1% の $3, 3, 5, 5$ - テトラメチル・ベンジジン (Sigma) 及び 0.003% の過酸化水素 (sigma) を含むペルオキシダーゼ基質溶液を、 well 当たり $100 \mu\text{l}$ で添加し、そして室温で 0.5 時間インキュベーションを行う。この反応を $50 \mu\text{l}$ の 2 M 硫酸の添加により停止し、そしてそれぞれの well 中の反応混合液の吸光度を、Dynatech MR5000プレート・リーダーを使用して 450 nm での指示を読む。再形状化されたTESC - 21ヒトCMV発現プラスミド、H1, H3, L1、及びL3を、4つの組合せ: H3L1, H3L3, H1L1、及びH1L3内のNSO細胞をトランスフェクトするために使用する。H3L1, H3L3, H1L1、及びH1L3のそれぞれ $142, 122, 68$ 、及び 64 well の全てが、 0.01 より低いバックグラウンドを伴って、 0.05 よりも大きい吸光度の読みを与える。それぞれの組合せのために、IgGの分泌レベルに基づく1つの細胞系: H3L1抗体を分泌するEH31.8; H3L3抗体を分泌するEH33.16; H1L1抗体を分泌するEH11.13; 及びH1L3抗体を分泌するEH13.5を選ぶ。

【0126】

寄託データ:

以下の細胞系を、1992年9月23日に、American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, U.S.A. に寄託した (寄託番号をカッコ内に与える)。

再形状化されたヒト抗体H3L1を生産する細胞系EH31.8 (HB 11130) 40

再形状化されたヒト抗体H1L1を生産する細胞系EH11.13 (HB 11132)

ネズミ・モノクロナール抗体TES - C21を生産する細胞系TES - C21 (HB 11133)

再形状化されたヒト抗体H3L3を生産する細胞系EH31.16 (HB 11131)

再形状化されたヒト抗体H1L3を生産する細胞系EH13.5 (HB 11134)

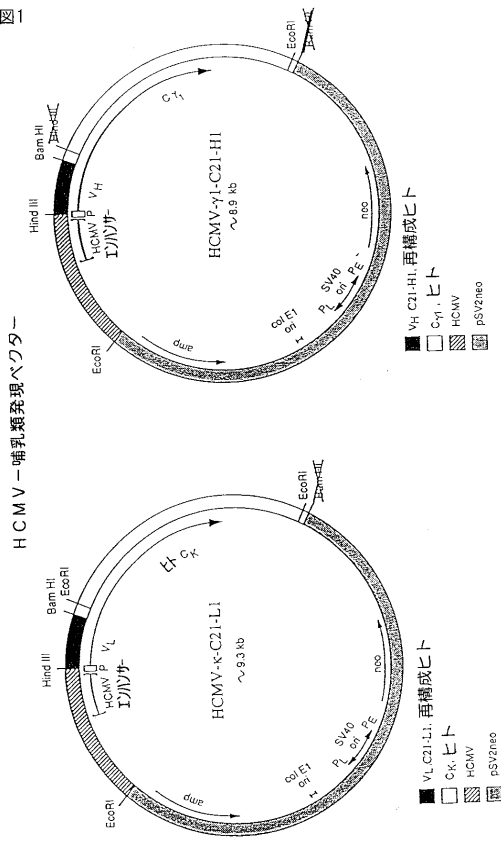
【図面の簡単な説明】

【0127】

【図1】ヒトkL鎖不変ドメインに融合されるC21 - L1及びヒトr1H鎖不変ドメインに融合されるC21 - H1を生成するために使用されるHCMV - 哺乳類発現ベクターが示される。

【 図 1 】

図 1



【 配列表 】

[2004357712000001.app](#)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 16/42	C 0 7 K 16/42	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

(74)代理人 100096345

弁理士 岩出 昌利

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ノルマン ハルトマン

スイス国, 4 1 2 5 リーヘン, グスタルテンライベーク 6 7

(72)発明者 フランク コルビンガー

ドイツ連邦共和国, 7 9 1 1 4 フライブルク, マルテゼローデンスシュトラッセ 1デー

(72)発明者 ジョゼ サルダナ

イギリス国, イーエヌ 1 1 ティーイー, ミドルセックス, アンフィールド, リンコルン ウェイ
2 2 エー

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA01 DA02 DA05 EA04 GA11 HA17

4B064 AG27 CA01 CA19 CC24 CE12 DA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BA03 BD15 BD18 CA25 CA44

4C085 AA14 CC03 DD62 EE07 FF11 FF13

4H045 AA11 AA20 CA40 DA76 EA22 EA54 FA74 GA15 GA26

专利名称(译)	重构免疫球蛋白同种型的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2004357712A	公开(公告)日	2004-12-24
申请号	JP2004201096	申请日	2004-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司 唐纳士公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司 Tanox公司公司ABI公司		
[标]发明人	ノルマンハルトマン フランクコルビンガー ジョゼサルダナ		
发明人	ノルマン ハルトマン フランク コルビンガー ジョゼ サルダナ		
IPC分类号	A61K39/395 A61K38/00 A61K47/48 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P37/08 C07K11/20 C07K11/22 C07K14/00 C07K16/00 C07K16/42 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/13 C12P21/08 C12R1/19 C12R1/865 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K47/6873 A61K2039/505 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 C07K16/4291 C07K16/465 C07K2317/565 C07K2319/02		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.N A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P37/08 C07K16/42 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53.N C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BD15 4B065/BD18 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE07 4C085/FF11 4C085/FF13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	9220228:2 1992-09-24 GB 07/952802 1992-09-25 US		
其他公开文献	JP3718214B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供重塑的人单克隆抗体，并使用相同的诊断，预防和/或治疗过敏。解决方案：本发明涉及针对免疫球蛋白E (IgE) 的同种型决定簇及其衍生物的重构人单克隆抗体。 Ž

図 1

HCMV-哺乳類発現ベクター

