(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2006-45237
(P2006-45237A)
(43)公開日　平成18年2月16日(2006.2.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	ZNA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4H045

審査請求 有　請求項の数 1　OL　（全 78 頁）

(21)出願番号　特願2005-228930 (P2005-228930)
(22)出願日　平成17年8月5日 (2005.8.5)
(62)分割の表示　特願平7-519770の分割
原出願日　平成7年1月25日 (1995.1.25)
(31)優先権主張番号　08/186,269
(32)優先日　平成6年1月25日 (1994.1.25)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　399013971
エラン　ファーマシューティカルズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，サウス　サンフランシスコ，ゲイトウェイ　ブールバード　８００
(74)代理人　100107489
弁理士　大塩　竹志
(72)発明者　メアリー　エム．ベディング
イギリス国，ロンドン　エヌダブリュ６１ティーエックス，ウェスト　ハンプステッド，ソレント　ロード　５３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】白血球付着分子ＶＬＡ－４に対するヒト化抗体

(57)【要約】　（修正有）
【課題】　ＶＬＡ－４レセプタに対し強い結合親和力を示すが、免疫原性のないヒト化抗体を提供する。
【解決手段】　特定なマウス２１．６免疫グロブリン軽鎖可変ドメインの対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列をもつ３つの相補性決定領域、及びヒトカッパ軽鎖可変領域フレームワーク構造配列からの構造であって、Ｌ４５，Ｌ４９，Ｌ５８及びＬ６９（Ｋａｂａｔの番号付け規則による）から成る第１のグループの中から選ばれた少なくとも１つの位置が、マウス２１．６免疫グロブリン軽鎖可変領域フレームワーク構造の等価の位置に存在するのと同じアミノ酸残基によって占有されている構造を含むヒト化軽鎖を含む、ヒト化免疫グロブリン。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒト化重鎖及びヒト化軽鎖を含むヒト化免疫グロブリンにおいて、
（１）ヒト化軽鎖は、配列番号２で示されるマウス２１．６免疫グロブリン軽鎖可変ドメインの対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列をもつ３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１，ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）、及びヒトカッパ軽鎖可変領域フレームワーク構造配列からの可変領域フレームワーク構造であって、Ｌ４５，Ｌ４９，Ｌ５８及びＬ６９（Ｋａｂａｔの番号付け規則による）から成る第１のグループの中から選ばれた少なくとも１つの位置が、マウス２１．６免疫グロブリン軽鎖可変領域フレームワーク構造の等価の位置に存在するのと同じアミノ酸残基によって占有されている、可変領域フレームワーク構造を含み、
（２）ヒト化重鎖は、配列番号４で示されるマウス２１．６免疫グロブリン重鎖可変ドメインの対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列をもつ３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１，ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）、及びヒト重鎖可変領域フレームワーク構造配列からの可変領域フレームワーク構造であって、Ｈ２７，Ｈ２８，Ｈ２９，Ｈ３０，Ｈ４４，Ｈ７１（Ｋａｂａｔの番号付け規則による）から成る第２のグループの中から選択された少なくとも１つの位置が、マウス２１．６免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワーク構造の等価の位置に存在するのと同じアミノ酸によって占有されている、可変領域フレームワーク構造を含み；
ここで、該ヒト化免疫グロブリンは、約$10^{7}\cdot M^{-1}$の下限をもつ結合親和力でα４インテグリンに対して特異的に結合し、ここで、該２１．６免疫グロブリンは、配列番号２で示される可変ドメインをもつ軽鎖、および配列番号４で示される可変ドメインをもつＩｇＧ１重鎖を有する、ヒト化免疫グロブリン。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は一般に、白血球付着分子ＶＬＡ－４のアルファ－４サブユニットに対して特異的なヒト化抗体に関する。
【背景技術】
【０００２】
炎症は、感染又は傷害に対する血管化組織の応答であり、血管の内皮細胞に対する白血球の付着及び周囲の組織内へのその浸潤によってもたらされる。正常な炎症においては、浸潤する白血球は、毒性媒介物質を放出して侵入生物体を殺し、砕片や死細胞の食作用を行い、組織修復及び免疫応答において１つの役目を果たす。しかしながら病的炎症においては、浸潤白血球は過剰な応答性をもち、重大な又は致死的な損傷をひきおこす可能性がある。例えば、Ｈｉｃｋｅｙ，Ｐｓｙｃｈｏｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ＩＩ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９０）（非特許文献１）を参照のこと。
【０００３】
内皮細胞に対する白血球の付着は、内皮細胞及び白血球の上の細胞表面リガンドとレセプタの特異的相互作用を介してもたらされる。一般に、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ３４６：４２５－４３３（１９９０）（非特許文献２）を参照のこと。
【０００４】
リガンド及びレセプタの同一性は、異なる細胞サブタイプ、解剖学的な場所、及び炎症刺激について変動する。ＶＬＡ－４白血球細胞表面レセプタは、最初に、Ｈｅｍｌｅｒ ＥＰ ３３０，５０６（１９８９）（あらゆる目的のためその全体が引用により本書に組み込まれる）（特許文献１）によって同定された。
【０００５】
ＶＬＡ－４は、各々α及びβ鎖を含む細胞表面レセプタのβ１インテグリン系統群の一員である。ＶＬＡ－４はα４鎖とβ１鎖を含んでいる。ＶＬＡ－４はＶＣＡＭ－１と呼ばれる内皮細胞リガンドに対して特異的に結合する。Ｅｌｉｃｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌ

l　６０：５７７－５８４（１９９０）（あらゆる目的のため引用によりその全体を本書に組み入れる）（非特許文献３）を参照のこと。

【０００６】

ＶＣＡＭ－１は、まず最初に活性化されたヒト臍静脈上に検出されたが、このリガンドは、脳の内皮細胞上にも検出された。例えば、共有の同時係属出願ＵＳ第０７／８７１，２２３号（あらゆる目的のためその全体を本書に引用により組み入れる）を参照のこと（特許文献２）。

【０００７】

ＶＬＡ－４のごとき付着分子は、治療薬としての潜在的標的である。ＶＬＡ－４レセプタは、脳内皮細胞上に常時存在するリガンドと相互作用することから、特に重要な標的である。脳の炎症の結果もたらされる疾病及び状態は、特に重大な結果をひき起こす。例えば、このような疾病の１つである多発性硬化性（ＭＳ）は、慢性的経過（再燃及び軽快を伴う又は伴わないもの）をとり、重症の能力障害及び死を招く。この病気には米国だけでも２５０，０００人から３５０，０００人が罹患していると推定される。

【０００８】

ＶＬＡ－４レセプタに対する抗体は、インビトロ及び動物モデルにおけるインビボの両方でのその抗炎症潜在能についてテストされてきた。ＵＳＳＮ　０７／８７１，２２３（特許文献３）及びＹｅｄｎｏｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３５６：６３－６６（１９９２）（非特許文献４）（あらゆる目的のためその全体を引用により本明細書に組み入れる）を参照のこと。インビトロ実験では、抗ＶＬＡ－４抗体が脳の内皮細胞に対するリンパ球の付着を遮断するということが実証されている。動物実験では、多発性硬化症をシミュレートする人工的に誘発された状態（実験的自己免疫脳脊髄炎）をもつ動物に対する抗－ＶＬＡ－４抗体の効果がテストされる。これらの実験は、抗－ＶＬＡ－４抗体の投与が動物における脳の炎症及びそれに続く麻痺を防ぐということを示している。集合的にみるとこれらの実験は、多発性硬化症及びその他の炎症性疾患及び障害を治療するための潜在的に有用な治療薬として抗－ＶＬＡ－４抗体を同定している。

【０００９】

今日までに入手可能である抗ＶＬＡ－４抗体がもつ重要な問題点は、それらが全てマウス由来のものであり、従って臨床的使用においてヒト抗マウス応答（ＨＡＭＡ）を発生させる確率が高いということにある。ＨＡＭＡ応答は、患者体内でのマウス抗体の効力を低下させ、連続的投与を妨げる。この問題に対する１つのアプローチは、マウス抗体をヒト化することにある。このアプローチでは、供与体マウス可変領域からの相補性決定領域（ＣＤＲｓ）及びその他のいくつかのアミノ酸がヒト可変受容領域の中に移植され、その後ヒト定常領域に連結される。例えばＲｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２７（１９８８）（非特許文献５）：Ｗｉｎｔｅｒ，ＵＳ　５，２２５，５３９（１９９３）（各々あらゆる目的のためその全体を引用によりこの明細書に組み入れる）（特許文献４）を参照のこと。

【００１０】

ヒト化抗体としてはいくつかの例が生産されているが、マウス抗体からヒト化抗体への遷移には、抗体が異なると解決法が変わる競合する複数の考慮事項の間の妥協が必要である。免疫原性を最小限におさえるために、免疫グロブリンはできるかぎり多くのヒト受容体配列を保持しなければならない。しかしながら、真正な結合特性を保持するためには、免疫グロブリンフレームワーク構造は、もとのマウス供与体免疫グロブリン内の領域にできるかぎり近いＣＤＲ領域の３次元コンホメーションを確保するべくヒト受容体配列の充分な置換を含まなくてはならない。これらの競合する考慮事項の結果として、これまでに生産されてきた多くのヒト化抗体は、それらが由来した対応するマウス抗体と比べ幾分かの結合親和力欠如を示す。例えば、Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５２２－５２５（１９８６）（非特許文献６）；Ｓｈｅａｒｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：４３６６－４３７３（１９９１）（非特許文献７）；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ４：７７

３－７８３（１９９１）（非特許文献８）；Ｇｏｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：４１８１－４１８５（１９９１）（非特許文献９）；Ｔｅｍｐｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ９：２６６－２７１（１９９１）（非特許文献１０）を参照のこと。

【特許文献１】ＥＰ 第３３０，５０６号（１９８９）

【特許文献２】ＵＳＳＮ第０７／８７１，２２３号

【特許文献３】ＵＳＳＮ第０７／８７１，２２３号

【特許文献４】ＵＳ 第５，２２５，５３９号（１９９３）

【非特許文献１】Ｈｉｃｋｅｙ，Ｐｓｙｃｈｏｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ＩＩ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９０）。

【非特許文献２】Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ３４６：４２５－４３３（１９９０）。

【非特許文献３】Ｅｌｉｃｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ６０：５７７－５８４（１９９０）

【非特許文献４】Ｙｅｄｎｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５６：６３－６６（１９９２）

【非特許文献５】Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２７（１９８８）。

【非特許文献６】Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）

【非特許文献７】Ｓｈｅａｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：４３６６－４３７３（１９９１）。

【非特許文献８】Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ４：７７３－７８３（１９９１）

【非特許文献９】Ｇｏｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：４１８１－４１８５（１９９１）。

【非特許文献１０】Ｔｅｍｐｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ９：２６６－２７１（１９９１）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

上述のことに基づくと、あったとしてもわずかであるヒト抗マウス応答を示す一方で、ＶＬＡ－４レセプタに対する強い親和力を示すヒト化抗－ＶＬＡ－４抗体に対する必要性が存在しているのは明白なことである。本発明は、この必要性そしてその他の必要性をも満たすものである。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

（発明の要約）

本発明は、ＶＬＡ－４リガンドに対して特異的に結合するヒト化免疫グロブリンを提供する。ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖とヒト化重鎖を含んでいる。このヒト化軽鎖は、マウス２１－６免疫グロブリン軽鎖の対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列をもつ３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１，ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）、及び位置Ｌ４５，Ｌ４９，Ｌ５８及びＬ６９から成る第１のグループの中から選択された少なくとも１つの位置を除いてヒトカッパ軽鎖可変領域フレームワーク構造配列からの１つの可変領域フレームワーク構造を含んで成り、ここでアミノ酸位置は、マウス２１．６免疫グロブリン軽鎖可変領域フレームワーク構造の等価の位置に存在するものと同じアミノ酸によって占有されている。ヒト化重鎖は、マウス２１－６免疫グロブリン重鎖の対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列を有する３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１，ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）、及びＨ２７，Ｈ２８，Ｈ２９，Ｈ３０，Ｈ４４，Ｈ７１から成るグループの中から選択された少なくとも１つの位置を除いてヒト重鎖可変領域フレームワーク構造配列からの可変領域フレー

ムワーク構造を含んで成り、ここでアミノ酸位置は、マウス２１－６免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワーク構造の等価の位置に存在するものと同じアミノ酸により占有されている。免疫グロブリンは、約10^{7} M^{-1}の下限とマウス２１－６免疫グロブリンの親和力の約５倍という上限をもつ親和力でＶＬＡ－４に対し特異的に結合する。

【００１３】

通常、ヒト化軽鎖及び重鎖可変領域フレームワーク構造は、それぞれＲＥ１及び２１／２８'ＣＬの可変領域フレームワーク構造配列からのものである。ヒト化軽鎖可変領域フレームワーク構造がＲＥ１からのものである場合、少なくとも２つのフレームワーク構造アミノ酸が置換される。１つのアミノ酸は、上述の第１の位置グループからのものである。その他のアミノ酸は、位置Ｌ１０４，Ｌ１０５及びＬ１０７から成る第３のグループからのものである。この位置は、ＲＥ１以外のヒト免疫グロブリンからのカッパ軽鎖の等価位置に存在するものと同じアミノ酸により占有されている。

【００１４】

いくつかのヒト化免疫グロブリンは、図６内のＬａ又はＬｂと呼称された成熟軽鎖可変領域配列、又は図７内のＨａ，Ｈｂ又はＨｃと呼称された成熟重鎖可変領域配列を有する。好ましいヒト化免疫グロブリンとしては、Ｌａ軽鎖及びＨａ，Ｈｂ又はＨｃ重鎖をもつものが含まれる。

【００１５】

本発明は同様に、上述のＶＬＡ－４に対するヒト化免疫グロブリンの結合フラグメントをも提供する。

【００１６】

もう１つの態様においては、本発明は、上述のＶＬＡ－４に対するヒト化免疫グロブリンをコードする核酸を提供する。

【００１７】

同様に提供されるのは、マウス２１．６抗体又は上述のヒト化免疫グロブリンの３次元画像を表示するようにプログラミングされたコンピュータである。

【００１８】

もう１つの態様では、本発明は、薬学組成物及びそれを使用した治療方法を提供する。

【００１９】

薬学組成物は、上述のようなヒト化免疫グロブリン又は結合フラグメント、そして薬学的に受容可能な担体を含む。いくつかの治療方法においては、多発性硬化症といったような炎症性疾患を患う患者に対して、治療上有効な量の薬学組成物が投与される。

【００２０】

同様に提供されるのは、上述のヒト化免疫グロブリン及び結合フラグメントを用いたＶＬＡ－４抗原を検出する方法である。これらの方法においては、患者及び患者からの組織標本に対して、ヒト化抗体又は結合フラグメントか投与される。抗体又はフラグメントと標本中に存在するＶＬＡ－４の間の特異的結合によって形成された複合体が検出される。

【００２１】

より特定すれば、本発明は以下に関する。

（１）ヒト化重鎖及びヒト化軽鎖を含むヒト化免疫グロブリンにおいて、(1)ヒト化軽鎖には、マウス２１－６免疫グロブリン軽鎖の対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列をもつ３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１，ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）、及びＬ４５，Ｌ４９，Ｌ５８及びＬ６９から成る第１のグループの中から選ばれた少なくとも１つの位置を除いてヒトカッパ軽鎖可変領域フレームワーク構造配列からの可変領域フレームワーク構造が含まれており、ここでアミノ酸位置は、マウス２１－６免疫グロブリン軽鎖可変領域フレームワーク構造の等価の位置に存在するものと同じアミノ酸によって占有されており、(2)ヒト化重鎖には、マウス２１－６免疫グロブリン重鎖の対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列をもつ３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１，ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）、及びＨ２７，Ｈ２８，Ｈ２９，Ｈ３０，Ｈ４４，Ｈ７１から成るグループの中から選択された少なくとも１つの位置を除いてヒト重鎖可変領域フレームワーク構造配列からの可変領域

フレームワーク構造が含まれており、ここでアミノ酸位置は、マウス２１－６免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワーク構造の等価の位置に存在するものと同じアミノ酸によって占有されており；免疫グロブリンは、約10^{7}・M^{-1}の下限と、マウス２１－６免疫グロブリンの結合親和力の約５倍の上限をもつ結合親和力でＶＬＡ－４リガンドに対して特異的に結合する、ヒト化免疫グロブリン。

（２）ヒト化軽鎖可変領域フレームワーク構造が、第１のグループから選択された少なくとも１つの位置を除いて、又位置Ｌ１０４，Ｌ１０５及びＬ１０７から成る第３のグループの中から選択された少なくとも１つの位置を除いて、ＲＥ１可変領域フレームワーク構造配列からのものであり、アミノ酸位置が、ＲＥ１以外のヒト免疫グロブリンからのカッパ軽鎖の等価の位置に存在する同じアミノ酸によって占有されている、項（１）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（３）ヒト化重鎖可変領域フレームワーク構造が２１／２８′ＣＬ可変領域フレームワーク構造配列からのものである、項（２）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（４）ヒト化軽鎖可変領域フレームワーク構造には、第１のグループ内の位置にあるマウス２１．６免疫グロブリンからの少なくとも３つのアミノ酸及び第３のグループの中の位置にあるＲＥＩ以外のヒト免疫グロブリンからのカッパ軽鎖からの３つのアミノ酸が含まれており、又ヒト化重鎖可変領域フレームワーク構造には、第２のグループ内の位置にあるマウス２１．６免疫グロブリンからの少なくとも５つのアミノ酸が含まれている、項（３）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（５）ヒト化軽鎖可変領域フレームワーク構造が、第１のグループからの少なくとも３つの位置及び第３のグループからの３つの位置を除いて、ＲＥ１軽鎖可変領域フレームワーク構造配列と同一であり、重鎖可変領域フレームワーク構造は、第２のグループからの少なくとも５つの位置を除いて２１／２８′ＣＬ重鎖可変領域フレームワーク構造配列と同一である、項（４）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（６）第１のグループからの少なくとも３つの位置がＬ４５，Ｌ５８及びＬ６９であり、第２のグループからの少なくとも５つの位置がＨ２７，Ｈ２８，Ｈ２９，Ｈ３０及びＨ７１である、項（５）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（７）ヒト化軽鎖には、マウス２１－６重鎖の対応する相補性決定領域と同一である相補性決定領域が含まれており、ヒト化重鎖には、ヒト化重鎖のＣＤＲ３領域が位置Ｈ９８においてフェニルアラニン残基を含んでいてもいなくてもよいという点を除いて、マウス２１－６重鎖の対応する相補性決定領域と同一である相補性決定領域が含まれている、項（６）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（８）ヒト化重鎖のＣＤＲ３が位置Ｈ９８にフェニルアラニン残基を含んでいる、項（７）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（９）成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列が図６でＬａ（配列番号７）と呼称されている配列である、項（１）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（１０）成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列が図６でＬｂ（配列番号８）と呼称されている配列である、項（１）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（１１）成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列が図７でＨａ（配列番号１１）と呼称されている配列である、項（１）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（１２）成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列が図７でＨｂ（配列番号１２）と呼称されている配列である、項（１）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（１３）成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列が図７でＨｃ（配列番号１３）と呼称されている配列である、項（１）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（１４）成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列が図７のＨａ（配列番号１１）である、項（９）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（１５）成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列が図７のＨｂ（配列番号１２）である、項（９）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（１６）成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列が図７でＨｃ（配列番号１３）と呼称されている、項（９）に記載のヒト化免疫グロブリン。

（１７）項（１４）又は項（１６）に記載のヒト化免疫グロブリンの結合フラグメント。
（１８）定常領域ドメインを有する、項（１４）又は項（１６）に記載のヒト化免疫グロブリン。
（１９）定常領域ドメインがエフェクター機能を有する、項（１８）に記載のヒト化免疫グロブリン。
（２０）定常領域ドメインにエフェクター機能が欠如している、項（１８）に記載のヒト化免疫グロブリン。
（２１）エフェクター機能が補体結合反応又は抗体依存性細胞障害作用を行なうことができる、項（１９）に記載のヒト化免疫グロブリン。
（２２）項（１）に記載のヒト化抗体又はその結合フラグメントの重鎖をコードする核酸。
（２３）項（１）に記載のヒト化抗体又はその結合フラグメントの軽鎖をコードする核酸。
（２４）モニター上に項（１）に記載のヒト化免疫グロブリンの三次元表示を表示するようにプログラミングされたコンピュータ。
（２５）項（１４）又は項（１６）に記載のヒト化抗体又はその結合フラグメント及びそのための薬学的に受容可能な担体を含んで成る薬学組成物。
（２６）ＶＬＡ－４抗原を検出するための方法において、患者又は患者からの組織標本に対して項（１４）又は項（１６）に記載のヒト化免疫グロブリン又はその結合フラグメントを投与する段階；及び抗体又はフラグメントと標的標本中に存在するＶＬＡ－４の間の特異的結合によって形成される複合体を検出する段階、を含んで成るＶＬＡ－４抗原を検出するための方法。
（２７）項（２５）に記載の薬学組成物を治療上有効な量だけ投与する段階を含んで成る、内皮細胞に対する白血球の付着を阻害する方法。
（２８）内皮細胞が脳細胞である、項（２７）に記載の方法。
（２９）項（２５）に記載の薬学組成物を治療上有効な量だけ患者に投与する段階を含んで成る、炎症性疾患を治療する方法。
（３０）炎症性疾患が多発性硬化症である、項（２９）に記載の方法。

【発明の効果】

【００２２】

ＶＬＡ－４レセプタに対して強い親和力を示し、かつ免疫原性が最小限に抑えられたヒト化抗体が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２３】

（定義）

２０の天然アミノ酸についての略号は、慣習的な用法に従う（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－Ａ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（第2版．，Ｅ．Ｓ．Ｇｏｌｕｂ ＆ Ｄ．Ｒ．Ｇｒｅｎ，ｅｄｓ，ｅｄｓ．，Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，ＭＡ，１９９１））。２０の慣習的アミノ酸の立体異性体（例えばＤ－アミノ酸）、α－α－２置換アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、乳酸といった非天然アミノ酸、及びその他の非慣習的アミノ酸も又、本発明のポリペプチドのための適切な構成要素である。非慣習的アミノ酸の例としては、４－ヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタメート、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリシン、ε－Ｎ－アセチルリシン、ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリシン、ω－Ｎ－メチルアルギニン、及びその他の類似のアミノ酸及びイミノ酸（例えば４－ヒドロキシプロリン）が含まれる。その上、アミノ酸は、グリコシル化、リン酸化などによって修正され得る。

【００２４】

本書中で用いられるポリペプチド表記法では、標準的な用法及び慣習に従って左方向はアミノ末端方向であり、右方向はカルボキシ末端方向である。同様にして、相反する規定

のないかぎり、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左末端は５′末端であり、２本鎖ポリヌクレオチド配列の左方向は５′方向と呼ばれる。未完成ＲＮＡ写しの５′→３′添加の方向は、転写方向と呼ばれる；ＲＮＡと同じ配列をもちＲＮＡ写しの５′末端に対し５′のところにあるＤＮＡストランド上の配列領域は「上流配列」と呼ばれる；ＲＮＡと同じ配列をもちＲＮＡ写しの３′末端に対し３′のところにあるＤＮＡストランド上の配列領域は、「下流配列」と呼ばれる。

【００２５】

「ポリヌクレオチド配列」という語句は、５′から３′末端へと読まれるデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の１本鎖又は２本鎖重合体のことを言う。これには、自己複製プラスミド、ＤＮＡ又はＲＮＡの感染性重合体及び非機能的ＤＮＡ又はＲＮＡが含まれる。

【００２６】

以下の用語は、２つ以上のポリヌクレオチドの間の配列関係を記述するために使用される：「基準配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性百分率」及び「実質的同一性」。基準配列というのは、配列比較のための基礎として用いられる規定の配列である；基準配列は、例えば、図１又は２のポリヌクレオチド配列といったような１つの配列リスト内に与えられた全長ｃＤＮＡ又は遺伝子配列のようにさらに大きい配列のサブセットであってもよいし、或いは又、完全なＤＮＡ又は遺伝子配列を含んでいてもよい。一般に、基準配列の長さは、少なくとも２０ヌクレオチド、往々にして少なくとも２５ヌクレオチド、そして頻繁には少なくとも５０ヌクレオチドである。２つのポリヌクレオチドは、各々（１）２つのポリヌクレオチド間で類似している１つの配列（すなわち、完全ポリヌクレオチド配列の一部分）を含んでいてもよいし又（２）さらに２つのポリヌクレオチド間で発散する１つの配列を含んでいる可能性もあることから、２つ（又はそれ以上）のポリヌクレオチド間の配列比較は標準的には、配列類似性をもつ局所的領域を同定し比較するべく「比較ウィンドウ」全体にわたり２つのポリヌクレオチドの配列を比較することによって行なわれる。

【００２７】

ここで使用する「比較ウィンドウ」というのは、ポリヌクレオチド配列を少なくとも２０の隣接するヌクレオチドの基準配列に対して比較でき、又その中のポリヌクレオチド配列の一部分が、２つの配列を最適に整列させるべく（付加又は欠失を含まない）基準配列に比べて２０パーセント以下の付加又は欠失を含み得るような、少なくとも２０の隣接するヌクレオチド位置の概念的セグメントのことである。

【００２８】

比較ウィンドウを整列させるための配列の最適なアラインメントは、Ｓｍｉｔｈ　＆　Ｗａｔｅｒｍａｎ，Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ２：４８２（１９８１）の局所的相同性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　＆　Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉａｌ．４８：４４３（１９７０）の相同性アラインメントアルゴリズム、Ｐｅａｒｓｏｎ　＆　Ｌｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）８５：２４４４（１９８８）の類似性探索方法（これらの各々は本書にあらゆる目的のためその全体が参考として内含されている）、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実現（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｐａｃｋａｇｅ　Ｒｅｌｅａｓｅ　７．０，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐｅ，５７５　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ内のＧＡＰ，ＢＥＳＦＩＴ，ＦＡＳＴＡ，及びＴＦＡＳＴＡ）又は検査によって実施でき、さまざまな方法によって生成された最高のアラインメント（すなわち比較ウィンドウ全体にわたり最高の配列類似性百分率を結果としてもたらすもの）が選択される。

【００２９】

「配列同一性」という語は、比較ウィンドウ全体にわたり２つのポリヌクレオチド配列が同一である（すなわち、ヌクレオチド毎のベースで）ことを意味する。

【００３０】

「配列同一性百分率」という語は、比較ウィンドウ全体にわたり２つの最適に整列された配列を比較し、一致した位置の数を生成するべく両方の配列内で同一の核酸塩基（例えばＡ，Ｔ，Ｃ，Ｇ，Ｕ又はＩ）が起こる位置の数を決定し、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の合計数（すなわちウィンドウサイズ）で除し、結果に１００を乗じて配列同一性百分率を生成することによって、計算される。本書で使用されている「実質的同一性」という語は、合計で比較ウィンドウ全体にわたる基準配列の２０パーセント以下となる欠失又は付加を含みうるポリヌクレオチド配列に対し基準配列を比較することによって配列同一性百分率が計算されるものとして、少なくとも２０個のヌクレオチド位置の比較ウィンドウ、頻繁には少なくとも２５～５０のヌクレオチドのウィンドウにわたり１つの基準配列に対して比較した場合に少なくとも８５パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも９０～９５パーセントの配列同一性、より普通には少なくとも９９パーセントと配列同一性を有する配列がポリヌクレオチドに含まれている、ポリヌクレオチド配列の１つの特性を意味している。基準配列は、例えば図１又は２に示されている配列といったより大きい配列のサブセットであってよい。

【００３１】

ポリペプチドに対して適用される場合、「配列同一性」という語は、ペプチドが対応する位置において同一のアミノ酸を共有することを意味する。「配列同一性」という語は、ペプチドが対応する位置において同一の又は類似のアミノ酸（すなわち保存的置換）をもつことを意味している。「実質的同一性」という語は、２つのペプチド配列が、例えば省略時ギャップ重みを用いたプログラムＧＡＰ又はＢＥＳＴＦＩＴによって最適に整列された時点で少なくとも８０パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも９０パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも９５パーセントの配列同一性又はそれ以上（例えば９９パーセントの配列同一性）を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換が異なっている。「実質的類似性」という語は、２つのペプチド配列が、対応する配列類似性百分率を共有することを意味する。

【００３２】

「実質的に純粋な」という語は、目的種が存在する優占種である（すなわちモルベースで組成物内の他のどの個々の種よりも豊富である）ことを意味し、好ましくは、実質的に精製された分画とは、目的種が、存在する全ての高分子種の少なくとも約５０パーセント（モルベースで）を構成している組成物である。一般に、実質的に純粋な組成物は、組成物内に存在する全ての高分子種の約８０～９０パーセント以上を構成することになる。最も好ましくは、目的種は、組成物が単一の高分子種で本質的に構成されている本質的均質性（従来の検出方法では組成物内に汚染種を検出できない）に至るまで精製される。

【００３３】

アミノ酸置換を保存的又は非保存的として分類する目的で、アミノ酸は以下のとおりにまとめられる：第Ｉ群（疎水性側鎖）：ノルロイシン、ｍｅｔ，ａｌａ，ｖａｌ，ｌｅｕ，ｉｌｅ；第ＩＩ群（中性親水性側鎖）：ｃｙｓ，ｓｅｒ，ｔｈｒ；第ＩＩＩ群（酸性側鎖）：ａｓｐ，ｇｌｕ；第ＩＶ群（塩基性側鎖）：ａｓｎ，ｇｌｎ，ｈｉｓ，ｌｙｓ，ａｒｇ；第Ｖ群（鎖配向に影響を及ぼす残基）：ｇｌｙ，ｐｒｏ；及び第ＶＩ群（芳香族側鎖）：ｔｒｐ，ｔｙｒ，ｐｈｅ。保存的置換には、同じクラスの中のアミノ酸の間の置換が関与する。非保存的置換は、これらのうちの１クラスの一員をもう１つのものと交換することである。

【００３４】

免疫グロブリンの成熟重鎖及び軽鎖の可変領域からのアミノ酸は、それぞれＨｘ及びＬｘｘと呼称される。なおここでｘは、Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，の「免疫学的に有利なタンパク質の配列」（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９８７）及び（１９９１））（あらゆる目的のためその全体が参考として内含されている以下集合的に「Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，」と呼ぶもの）のスキーマに従ったアミノ酸の位置を表わす番号である。Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．は、各々のサブクラスについて抗体のための数多くのアミノ酸配列を列挙し、又そのサブクラ

スの中の各残基位置について最も一般的に発生するアミノ酸を列挙している。Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．は、列挙された配列の中の各アミノ酸に対して残基番号を割当てるための方法を使用し、残基番号を割当てるためのこの方法は、この分野において標準となった。

【００３５】

Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．のスキーマは、問題の抗体をＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．内のコンセンサス配列の１つと整列させることによって、必携の中に含まれていないその他の抗体にまで拡大させることができる。Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．の番号づけシステムを使用することにより、様々な抗体の中で等価の位置でアミノ酸を直ちに同定することができる。例えば、ヒト抗体のＬ５０位置にある１つのアミノ酸が、マウス抗体のアミノ酸位置Ｌ５０に対する等価位置を占有する。

【００３６】

（詳細な説明）

（Ｉ．ＶＬＡ－４に特異的なヒト化抗体）

本発明の一実施態様においては、ＶＬＡ－４のアルファサブユニットに対して特異的なヒト化免疫グロブリン（又は抗体）が提供されている。ヒト化免疫グロブリンは、実質的にヒト免疫グロブリン（受容体免疫グロブリンと呼ばれる）からの可変フレームワーク構造領域及び、実質的にｍｕＭＡｂ２１．６と呼ばれるマウス免疫グロブリン（受容体免疫グロブリンと呼ぶ）からの相補性決定領域を有する。定常領域が存在する場合、これは同様に実質的にヒト免疫グロブリンからのものである。ヒト化抗体は、少なくとも10^7，10^8，10^9又は$10^{10}M^{-1}$というＶＬＡ－４に対する特異的結合親和力を示す。通常、ＶＬＡ－４に対するヒト化抗体の結合親和力の上限は、ｍｕＭＡｂ２１．６のもの（約10^9M^{-1}）の３倍又は５倍以内である。往々にして結合親和力の下限は、同様にｍｕＭＡｂ２１．６のものの３倍又は５倍以内である。

【００３７】

Ａ．免疫グロブリンの一般的特性

基本的抗体構造ユニットは、１つの四量体を含むものとして知られている。各々の四量体は、各々１つの「軽」鎖（約２５ｋＤａ）と１つの「重」鎖（約５０～７０ｋＤａ）を有する２つの同一のポリペプチド鎖の対で構成されている。各々の鎖のアミノ末端部分には、主として抗原認識を担う約１００～１１０又はそれ以上のアミノ酸の可変領域が含まれる。各々の鎖のカルボキシ末端部分は、主としてエフェクター機能を担う定常領域を構成する。

【００３８】

軽鎖は、カッパ又はラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ｍｕ、アルファ、デルタ又はイプシロンとして分類され、それぞれＩｇＧ，ＩｇＭ，ＩｇＡ，ＩｇＤ及びＩｇＥといった抗体のイソタイプを規定する。軽鎖及び重鎖の中で、可変及び定常領域は、重鎖も同じく約１０個以上のアミノ酸の「Ｄ」領域を内含している状態で、約１２個以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって連結されている（一般に、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（基礎免疫学）（Ｐａｕｌ，Ｗ．，ｅｄ．，第２版，Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．，１９８９）、第７章（あらゆる目的のためその全体が参考として内含されている）を参照のこと）。

【００３９】

各々の軽鎖／重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。鎖は全て、相補性決定領域又はＣＤＲとも呼ばれる３つの超可変領域によって連結された比較的保存されたフレームワーク構造領域（ＦＲ）の同じ一般的構造を示す。各対の２つの鎖からのＣＤＲは、フレームワーク構造により整列させられ、特異的エピトープに対する結合を可能にしている。ＣＤＲ及びＦＲ残基は、上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，の標準的配列の定義に従って明確に表わされる。代替的構造の定義づけがＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）：Ｎａｔｕｒｅ　３４２：８７８－８８３（１９８９）；及びＪ．Ｍｏｌ．Ｂｌｏｌ．１８６：６５１－６６３（１９８９）（以下、集合的に「Ｃｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ」と呼び、あらゆる目的のためその全体

が参考として内含されている）によって提案されてきた。上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．によって定義されたようなフレームワーク構造位置が上述のＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，によって定義されるような構造的ループ位置を構成する場合、マウス抗体の中に存在するアミノ酸は通常、ヒト化抗体の中に取り込まれる。

【００４０】

Ｂ．ヒト化抗体の産生

（１）　マウスＭＡｂ２１．６

ヒト化抗体の産生のための出発材料はｍｕＭＡｂ２１．６である。この抗体の分離及び特性は、ＵＳＳＮ　０７／８７１，２２３の中に記述されている。簡単に言うと、ｍｕＭＡｂ２１．６は、ＶＬＡ－４のアルファ－４サブユニットに対して特異的であり、腫瘍壊死因子で刺激されたラット脳細胞の組織培養に対するヒトリンパ球結合を阻害するものであることが示されてきた。ｍｕＭＡｂ２１．６抗体重鎖及び軽鎖可変領域をコードするｃＤＮＡのクローニング及び配列決定については、例１に記述されており、ヌクレオチド及び予想されたアミノ酸配列は、図１及び図２に示されている。これらの図は同様に、フレームワーク構造及び相補性決定ドメインへのアミノ酸コーティング配列決定の細分化を例示している。Ｎ末端からＣ末端まで、軽鎖及び重鎖は両方共ドメインＦＲ１，ＣＤＲ１，ＦＲ２，ＣＤＲ２，ＦＲ３，ＣＤＲ３及びＦＲ４を含んでいる。各ドメインに対するアミノ酸の割当ては、上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，の番号づけの慣習に従っている。

（２）フレームワーク構造残基を供給するためのヒト抗体の選択

ヒト可変領域フレームワーク構造内へのマウスＣＤＲの置換は、ヒト可変ドメインフレームワーク構造が、ＣＤＲが由来したマウスの可変フレームワーク構造を同じ又は類似のコンホメーションを採用した場合に、その正しい空間的配向の保持という結果をもたらす確率が最も高い。これは、ＣＤＲが由来したマウス可変フレームワーク構造ドメインと高度の配列同一性を示すフレームワーク構造配列をもつヒト抗体からヒト可変ドメインを得ることによって達成される。重鎖及び軽鎖可変フレームワーク構造領域は、同じ又は異なるヒト抗体配列から誘導されうる。ヒト抗体配列は、天然に発生するヒト抗体の配列であってもよいし、又はいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列でもあり得る。Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（タンパク質工学）４：７７３（１９９１）；Ｋｏｌｂｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ６：９７１（１９９３）を参照のこと。

【００４１】

適切なヒト抗体配列は、既知のヒト抗体の配列とのマウス可変領域のアミノ酸配列のコンピュータ比較によって同定される。この比較は、重鎖及び軽鎖について別々に行なわれるが、各々について原理は類似している。この比較は、上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．により規定される通り、ｍｕ２１．６軽鎖が、亜型カッパ１のヒト軽鎖に対し最大の配列同一性を示すこと、そしてｍｕ２１．６重鎖が、亜型１のヒト重鎖に対する最大の配列同一性を示すことを明らかにする。かくして、軽鎖及び重鎖ヒトフレームワーク構造領域は通常、これらの亜型のヒト抗体又はこのような亜型のコンセンサス配列から誘導される。ｍｕＭＡｂ２１．６からの対応する領域に対する最大の配列同一性を示す好ましい軽鎖及び重鎖ヒト可変領域は、それぞれ抗体ＲＥ１及び２１／２８＇ＣＬからのものである。

（３）コンピュータモデリング

マウスＣＤＲ領域とヒト可変フレームワーク構造領域の不自然な並置は、或る種のアミノ酸残基の置換によって補正されないかぎり結合親和力の損失を導く不自然なコンホメーション上の制約条件を結果としてもたらし得る。置換のためのアミノ酸残基の選択は、一部にはコンピュータモデリングによって決定される。

【００４２】

免疫グロブリン分子の３次元画像を生成するためのコンピュータハードウェア及びソフトウェアが広く入手可能である。一般に、分子モデルは、その免疫グロブリン鎖又はドメインについての解明済みの構造から出発して生成される。モデリングすべき鎖は、解明済みの３次元構造の鎖又はドメインとのアミノ酸配列類似性について比較され、最大の配列

類似性を示す鎖又はドメイン（１個又は複数）が分子モデルの構築のための出発点として選択される。例えば、ｍｕＭＡｂ２１．６の軽鎖については、フレームワーク構造領域、ＣＤＲ１及びＣＤＲ２領域をモデリングするための出発点はヒト軽鎖ＲＥ１であった。ＣＤＲ３領域については、出発点は、異なるヒト抗体ＨｙＨＥＬ－５の軽鎖からのＣＤＲ３領域であった。モデリングされつつある免疫グロブリン鎖又はドメイン内の現在のアミノ酸と、出発構造内のアミノ酸の間の差を許容するため、解明済み出発構造は修正される。修正された構造は、その後、複合免疫グロブリンへと組立てられる。

【００４３】

最後に、モデルは、エネルギー最小化によって、そして全ての原子が互いから適切な距離内にあること及び結合の長さ及び角度が化学的に受容できる限界内にあることを確認することにより、洗錬される。例４では、ｍｕＭＡｂ２１．６の可変領域のための３次元コンピュータモデルを生成するのにとられる段階について詳述されており、モデルは図５に示されている。このモデルの方は、ヒトフレームワーク構造の構造内で置換されたｍｕＭＡｂ２１．６相補性決定領域を含む抗体の３次元構造を予測するための出発点として役立つことができる。以下で論述するさらなるアミノ酸置換が導入される場合、構造を表わす付加的なモデルを構築することが可能である。

（４）アミノ酸残基の置換

上述のとおり、本発明のヒト化抗体は、実質的にヒト免疫グロブリンからの可変フレームワーク構造領域と、実質的にｍｕＭＡｂ２１．６と呼ばれるマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域を含んで成る。ｍｕＭＡｂ２１．６及び適切なヒト受容体免疫グロブリンの相補性決定領域を同定した後、次のステップは、これらの成分からの残基がある場合に、結果として得られるヒト化抗体の特性を最適化するのに置換すべきなのはどの残基であるかを決定することである。一般に、マウス残基の導入はヒトの体内で抗体がＨＡＭＡ応答を惹起する危険性を増大することから、ヒトアミノ酸残基とマウスのものとの置換は最小限におさえるべきである。アミノ酸は、ＣＤＲコンホメーション及び／又は抗原への結合に対して考えられるその影響に基づいて、置換向けに選択される。このような考えられる影響の調査は、モデリング、特定の場所におけるアミノ酸の特性の検査又は特定のアミノ酸の置換又は突然変異の効果の経験的観察によって行なわれる。

【００４４】

１つのアミノ酸からｍｕＭＡｂ２１．６可変フレームワーク構造領域と等価のヒト可変フレームワーク構造領域の間で異なる場合、ヒトフレームワークアミノ酸は、それが、（１）抗原に直接、非共有的に結合する（例えばｍｕＭＡｂ２１．６の位置Ｌ４９，Ｌ６９にあるアミノ酸）、（２）ＣＤＲ領域に隣接する、上述のＣｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．により提案されている代替的定義づけの下でＣＤＲ領域の一部である、又はその他の形でＣＤＲ領域と相互作用する（例えば、ＣＤＲ領域から約３Å以内にある）（例えば、ｍｕＭＡｂ２１．６の位置Ｌ４５，Ｌ５８，Ｈ２７，Ｈ２８，Ｈ２９，Ｈ３０及びＨ７１にあるアミノ酸）、又は、（３）V_L-V_Rインタフェイスに参与する（例えばｍｕＭＡｂ２１．６の位置Ｈ４４にあるアミノ酸）場合には、通常等価のマウスアミノ酸で置換されるべきである。

【００４５】

置換のためのその他の候補としては、その位置においてヒト免疫グロブリンにとっては普通でない受容体ヒトフレームワーク構造アミノ酸である（例えばｍｕＭＡｂ２１．６の位置Ｌ１０４，Ｌ１０５及びＬ１０７にあるアミノ酸）。これらのアミノ酸は、より典型的なヒト免疫グロブリンの等価位置からのアミノ酸で置換されうる。代替的には、等価位置におけるヒト免疫グロブリンに典型的なものである場合、マウスＭａｂ２１．６内の等価位置からのアミノ酸を、ヒトフレームワーク構造領域内に導入することができる。

【００４６】

一般に、上述の基準を満たすアミノ酸の全て又は大部分を置換することが望ましい。しかしながら場合によっては、特定のアミノ酸が上述の基準を満たすか否かについては幾分かの不明確さが存在し、一方がその特定の置換を有し他方が有していない代替的な変異体

免疫グロブリンが産生される。本発明のヒト化抗体は、通常、少なくともＬ４５，Ｌ４９，Ｌ５８及びＬ６９といった位置のうちの少なくとも１つ、２つ又は３つ、さらに普通には４つの位置において、対応するｍｕＭＡｂ２１．６残基でのヒト軽鎖フレームワーク構造残基の置換を内含することになる。ヒト化抗体は同様に、通常、Ｈ２７，Ｈ２８，Ｈ２９，Ｈ３０，Ｈ４４及びＨ７１といった位置のうちの少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ又は５つ、そして時として６つの位置において、ヒト重鎖フレームワーク構造残基の置換を含む。任意には、Ｈ３６も同様に置換され得る。好ましい実施態様においては、ヒト軽鎖受容体免疫グロブリンがＲＥ１であるとき、軽鎖は同様に、Ｌ１０４，Ｌ１０５及びＬ１０７といった位置のうちの少なくとも１つ又は２つそしてさらに普通には３つの位置で、置換を含んでいる。

【００４７】

これらの位置は、より典型的なアミノ酸残基をもつヒト免疫グロブリンの等価位置からのアミノ酸で置換される。置換すべき適切なアミノ酸は図６及び７に示されている。

【００４８】

通常、ヒト化抗体内のＣＤＲ領域は、ｍｕＭＡｂ２１．６抗体内の対応するＣＤＲ領域と実質的に同一、より普通には同一である。しかしながら、場合によっては、ＣＤＲ領域内の残基の１つを変更することが望ましい。例えば、例５はｍｕＭＡｂ２１．６　ＣＤＲ３とＶＣＡＭ－１リガンドの間アミノ酸類似性を同定している。この観察事実は、ＶＣＡＭ－１にさらに密に類似するよう重鎖ＣＤＲ３領域を設計し直すことによってヒト化抗体の結合親和力を改善することができるということを示唆している。従って、ＣＤＲ３ドメインからの単数又は複数のアミノ酸をＶＣＡＭ－１結合ドメインからのアミノ酸と置換させることができる。通常望ましいわけではないが、結果として得られたヒト化免疫グロブリンの結合親和力に著しい影響を及ぼすことなくＣＤＲ残基の単数又は複数の保存的アミノ酸置換を行なうことが時として可能である。

【００４９】

上述の特異的アミノ酸置換のため以外に、ヒト化免疫グロブリンのフレームワーク構造領域は、通常、それらが由来したヒト抗体のフレームワーク構造領域と実質的に同一、さらに普通には、同一である。当然のことながら、フレームワーク構造領域内のアミノ酸の多くは、抗体の特異性又は親和力に対しほとんど又は全く直接的に貢献しない。従って、結果として得られるヒト化免疫グロブリンの特異性又は親和力を著しく変更することなく、フレームワーク構造残基の数多くの個々の保存的置換を許容することが可能である。しかしながら、一般には、このような置換は望ましくない。

（５）可変的領域の産生

ヒト化免疫グロブリンのＣＤＲ及びフレームワーク構造構成要素を概念的に選択したならば、このような免疫グロブリンを産生するためにさまざまな方法を利用することができる。コードの縮重のため、さまざまな核酸配列が各々の免疫グロブリンアミノ酸配列をコードすることになる。望ましい核酸配列はｄｅ　ｎｏｖｏ固相ＤＮＡ合成又は、望ましいポリヌクレオチドの早期に調製された変異体のＰＣＲ突然変異誘発によって産生することができる。標的ポリペプチドＤＮＡの置換、欠失及び挿入変異体を調製するためには、オリゴヌクレオチドを媒介とする突然変異誘発が好ましい方法である。Ａｄｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＤＮＡ２：１８３（１９８３）を参照のこと。簡単に言うと、標的ポリペプチドＤＮＡは、１本鎖ＤＮＡ鋳型に対し望ましい突然変異をコードするオリゴヌクレオチドをハイブリッド形成することによって、変性される。ハイブリダイゼーションの後、オリゴヌクレオチドプライマを取り込む鋳型の第２の相補性ストランド全体を合成するためにＤＮＡポリメラーゼが使用され、これが標的ポリペプチドＤＮＡ内の選択された変性をコードする。

（６）定常領域の選択

上述のとおりに産生されたヒト化抗体の可変セグメントは標準的には、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部分、標準的にはヒト免疫グロブリンのものに連鎖される。ヒト定常領域ＤＮＡ配列は、さまざまなヒト細胞から周知の手順に従って分離され得

るが、好ましくは不死化されたＢ細胞から分離される（上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ，及びＷＯ８７／０２６７１を参照のこと）（その各々はあらゆる目的のため引用によりその全体を本明細書に組入れる）。通常、抗体は、軽鎖及び重鎖の両方の定常領域を内含している。重鎖定常領域は通常、ＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２，ＣＨ３，及びＣＨ４領域を内含する。

【００５０】

ヒト化抗体には、ＩｇＭ，ＩｇＧ，ＩｇＤ，ＩｇＡ及びＩｇＥを含むあらゆるタイプの定常領域及びＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３及びＩｇＧ４を含むあらゆるイソタイプをもつ抗体が含まれる。ヒト化抗体が細胞障害活性を示すことが望まれる場合、定常ドメインは通常補体固定定常ドメインであり、クラスは標準的にＩｇＧ１である。このような細胞障害活性が望まれない場合、定常ドメインはＩｇＧ２クラスのものでありうる。ヒト化抗体は、複数のクラス又はイソタイプからの配列を含んでいてよい。

（７）発現系

場合によっては定常領域に連鎖された、ヒト化軽鎖及び重鎖可変領域をコードする核酸が、発現ベクター内に挿入される。同じ又は異なる発現ベクター内で軽鎖及び重鎖をクローニングすることができる。免疫グロブリン鎖をコードするＤＮＡセグメントは、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実に行なう発現ベクター内の制御配列に対し作動的に連鎖される。このような制御配列としては、シグナル配列、プロモータ、エンハンサー及び転写終結配列が含まれる。発現ベクターは、エピソームとして又は宿主染色体ＤＮＡの一部として、宿主生体内で標準的に複製可能である。一般には、発現ベクターは、望ましいＤＮＡ配列で形質転換された細胞の検出を可能にするため、例えばテトラサイクリン又はネオマイシンといった選択マーカーを含むことになる（例えば米国特許第４，７０４，３６２号参照）。

【００５１】

大腸菌は、本発明のポリヌクレオチドをクローニングするのに特に有用な１つの原核生物宿主である。使用に適したその他の微生物宿主には、バシラス・サチリスといったようなかん菌及びサルモネラ、セラチアなどのその他のエンテロバクター及びさまざまなシュードモナス種が含まれる。これらの原核生物宿主の中で、宿主細胞と相容性のある発現制御配列（例えば複製起点）を標準的に含むような発現ベクターも作ることができる。さらに、ラクトースプロモータ系、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモータ系、ベーターラクタマーゼプロモータ系、又はファージラムダからのプロモータシステムといったさまざまな周知のプロモータが任意の数だけ存在することになる。プロモータは、標準的に、任意にはオペレーター配列と共に発現を制御し、転写及び翻訳を開始し完成させるためリボソーム結合部位配列などを有する。

【００５２】

酵母といったようなその他の微生物も発現のために使用できる。サッカロマイセスが好ましい宿主であり、適切なベクターは、望まれる通りに３－ホスホグリセレートキナーゼ又はその他の解糖酵素を含むプロモータ及び複製起点といった発現制御配列、終結配列などを有する。

【００５３】

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養も、本発明のポリペプチドを発現し産生するのに使用することができる（Ｗｉｎｎａｃｋｅｒ「遺伝子からクローンへ（ＶＣＨ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎ．Ｙ．，Ｎ．Ｙ．，１９８７を参照のこと）。無傷免疫グロブリンを分泌することのできる数多くの適切な宿主細胞系統が当該技術分野で開発されてきていることから、現在真核生物細胞が好まれており、これには、ＣＨＯ細胞系統、さまざまなＣｏｓ細胞系統、Ｈｅｌａ細胞、好ましくは骨髄腫細胞系統又は形質転換されたＢ細胞又はハイブリドーマが含まれる。これらの細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモータ及びエンハンサーといった発現制御配列（Ｑｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．８９；４９－６８（１９８６））、及びリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写ターミネータ配列といった必要な処理情報部位を含

むことができる。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、ＳＶ４０、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、サイトメガロウイルスなどから誘導されるプロモータである。

【００５４】

注目のポリヌクレオチド配列（例えば重鎖及び軽鎖コード配列及び発現制御配列）を含むベクターは、細胞宿主のタイプに応じて異なる周知の方法によって宿主細胞の中に移送され得る。例えば、原核生物細胞のためには一般に塩化カルシウムトランスフェクションが利用され、一方その他の細胞宿主のためには、リン酸カルシウム処理又は電気穿孔法を用いることができる（一般に、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，分子クローニング：実験室マニュアル（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ，第２版、１９８９年）（あらゆる目的のため参考としてその全体が内含されている）を参照のこと）。別々の発現ベクター上で重鎖及び軽鎖がクローニングされた時点で、ベクターは、無傷免疫グロブリンの発現及び組立てを得るため同時トランスフェクションを受ける。

【００５５】

ひとたび発現されると、全抗体、その二量体、個々の軽鎖及び重鎖又は本発明のその他の免疫グロブリン形態を、硫酸アンモニウム沈降、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィ、ゲル電気泳動などを含めた当該技術分野の標準的手順に従って精製することができる（一般にＳｃｏｐｅｓ，「タンパク質精製」（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎ．Ｙ．，１９８２）を参照）。少なくとも約９０～９５％の均質性をもつ実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましいが、薬学的用途のためには９８～９９％又はそれ以上の均質性が最も好ましい。

【００５６】

Ｃ．ヒト化抗体のフラグメント

本発明のもう１つの実施態様においては、ヒト化抗体のフラグメントが提供されている。標準的には、これらのフラグメントは、少なくとも10^{7} M^{-1}、より標準的には10^{8}又は10^{9} M^{-1}の親和力でのＶＬＡ－４抗原に対する特異的結合を示す。ヒト化抗体フラグメントは、別々の重鎖、軽鎖Ｆａｂ，Ｆａｂ′，Ｆ（ａｂ′）$_2$，Ｆａｂｃ及びＦｖを内含する。フラグメントは組換え型ＤＮＡ技術又は無傷免疫グロブリンの酵素的又は化学的分離によって産生される。

（ＩＩ．核酸）

ヒト化抗体及びそのフラグメントは通常核酸の発現により産生される。本出願に記述するヒト化抗体又はそのフラグメントをコードする全ての核酸は、本発明に明示的に内含される。

（ＩＩＩ．コンピュータ）

本発明のもう１つの態様においては、モニター上に抗体の３次元画像を表示するようにプログラミングされたコンピュータが提供されている。例えば、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステムの下で作動し分子モデリングパッケージＱＵＡＮＴＡ（Ｐｏｌｙｇｅｎ　Ｃｏｒｐ，ＵＳＡ）を用いたシリコングラフィックスＩＲＩＳ　４Ｄワークステーションが適している。ヒト化抗体の変異体のモデルを視覚化するためにコンピュータが有用である。一般に、本発明の抗体は、すでに満足のいく結合親和力を提供している。しかしながらさらに強い結合親和力をもつ抗体を、或る種のアミノ酸残基のさらなる変化によって同定できる可能性も高い。３次元画像は同様に、抗体の結合親和力に著しい影響を及ぼすことなく保存的置換の対象となりうる数多くの重要でないアミノ酸をも同定する。集合的には、保存的置換でさえ免疫グロブリンの物性に対し著しい効果を及ぼす可能性がある。しかしながら、個々の保存的置換は免疫グロブリンの物性を著しく損わないであろうと考えられる。

（ＩＶ．ヒト化抗体テスト）

本発明のヒト化抗体は、さまざまな検定によってテストされる。これらの検定には、ＶＬＡ－レセプタを支持する細胞に対する抗体の結合の存在又は強度を検出するための単純な結合検定が含まれる。抗体は同様に、ＶＣＡＭ－１リガンドを発現する内皮細胞とＶＬ

Ａ－４レセプタを支持する細胞の相互作用を遮断するその能力についてもテストされる。内皮細胞は、培養内で成長され刺激されてもよいし或いは自然に発生する胚組織切片の構成要素であってもよい。上述のＹｅｄｎｏｃｋ　ｅｔ　ａｌ．及びＵＳＳＮ　０７／８７１，２２３を参照のこと。ヒト化抗体は同様に、実験的自己免疫胚脊髄炎（ＥＡＥ）をもつ実験動物における炎症及びその後の麻痺を予防又は低減させるその能力についてもテストされる。ＥＡＥは、ミエリン塩基性タンパク質に特異的なCD_4^+Ｔ細胞を実験動物に注射するか、又は動物をミエリン塩基性タンパク質で直接免疫化することによって誘発される。このタンパク質は、中枢神経系の中に局在化されており、反応性Ｔ細胞は、多発性硬化症における自己免疫応答を刺激する要領でこのタンパク質を含有する鞘の破壊を開始させる。上述のＹｅｄｎｏｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，及び同時係属ＵＳＳＮ　０７／８７１，２２３を参照のこと。

（Ｖ．薬学組成物）

本発明は、活性治療薬すなわちヒト化２１．６抗体又はその結合フラグメント及びその他のさまざまな構成要素を含む。予防的又は治療的処置のために使用すべき薬学組成物を提供する。好ましい形態は、意図されている投与様式及び治療的利用分野に応じて異なる。組成物は又、望ましい製剤形態に応じて、動物又はヒトに対する投与のための薬学組成物を処方するのに一般に用いられるビヒクルとして定義づけられる薬学的に受容可能な非毒性担体又は希釈剤も内含している可能性がある。希釈剤は、組合せの生物活性に影響を及ぼさないように選択される。

【００５７】

このような希釈剤の例は、精製水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液及びハンクス溶液である。さらに、薬学組成物又は製剤はその他の担体、アジュバント又は非毒性、非治療性、非免疫原性の安定剤なども含んでいてよい。

（ＶＩ．診断方法）

ヒト化抗体及びその結合フラグメントは、ＶＬＡ－４レセプタを支持する細胞の存在を検出するために有用である。胚内でのこのような細胞の存在は、炎症性応答の診断となり、以下に論述する治療方法を開始する必要性を知らせてくれる。診断は、患者から細胞標本をとり出すことによって達成できる。標本の個々の細胞内の発現されたＶＬＡ－４抗原の量はこのとき、例えば、固定した細胞の免疫組織学的染色又はヒト化ＭＡｂ２１．６抗体又はその結合フラグメントでの細胞抽出物のウェスタンブロット法によって決定される。

【００５８】

診断は、標識付けされたヒト化ＭＡｂ２１．６（又は結合フラグメント）のインビボ投与及びインビボ画像による検定によっても達成できる。投与されるヒト化ＭＡｂ２１．６の濃度は、背景シグナルに比べて標的抗原をもつ細胞に対する結合が検出可能となるように充分なものでなくてはならない。診断試薬は、カメラ画像のためには放射性同位元素で、又磁気共鳴又は電子スピン共鳴画像のためには常磁性同位元素で標識づけすることができる。

【００５９】

臨床的に立証された正常レベルの範囲外にある、個体からの画像又は細胞標本内におけるＶＬＡ－４タンパク質のレベルの変化（標準的には増大）は、その標本を得た個体内の望ましくない炎症性応答反応の存在を表わし、かつ／又はこのような反応を発生させる（又は進行させる）その個体の疾病素質を表わす可能性がある。ＶＬＡ－４タンパク質は、或る種の系列及び発達起源の細胞を同定し型別するための分化マーカーとしても利用することができる。このような細胞型特異的検出は、望ましくない免疫応答の組織病理学的診断のために使用することができる。

（ＶＩＩ．治療方法）

本発明は同様に、ＶＬＡ－４レセプタのα４－依存性相互作用を遮断するヒト化ＭＡｂ２１．６の能力を活用する治療方法をも提供する。内皮細胞上のＶＣＡＭ－１リガンドとＶＬＡ－４レセプタのα４－依存性相互作用は、数多くの炎症性応答、特に中枢神経系の

応答における早期事象である。中枢神経系の炎症の結果としてもたらされる望ましくない疾病及び状態としては、卒中及びその他の胚外傷といった急性疾患及び多発性硬化症、胚膜炎及び胚炎といった慢性疾患がある。多発性硬化症は、米国で２５００００人から３５００００人の人が患っていると見積られている進行性神経系自己免疫疾患である。多発性硬化症は、或る種の白血球が、神経繊維を覆う絶縁鞘であるミエリンを攻撃しその破壊を開始させる特異的自己免疫反応の結果であると考えられている。多発性硬化症に関する動物モデルにおいて、４－ベーター１インテグリンに対して向けられたマウスモノクローナル抗体が内皮に対する白血球の付着を遮断し、かくして動物内の中枢神経系の炎症及びそれに続く麻痺を防ぐものであることが示されてきた。

【００６０】

本発明のヒト化ＭＡｂ２１．６抗体は、動物モデルにおいて有効であることがすでに示されてきたマウス抗体に比べていくつかの長所を提供する：すなわち、（１）ヒト免疫系は、ヒト化抗体のフレームワーク構造又は定常領域を外来性のものと認識するはずがなく、従ってこのような注射された抗体に対する抗体応答は、完全に外来性であるマウス抗体又は部分的に外来性であるキメラ抗体に対してよりも低いはずである。（２）ヒト化抗体のエフェクター部分はヒトのものであることから、これはヒト免疫系のその他の部分とより良く相互作用するかもしれない。（３）注射されたマウス抗体は、正常なヒト抗体の半減期よりもはるかに短かいヒトの循環内での半減期をもつものと報告されてきた（Ｓｈａｗ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３８：４５３４－４５３８（１９８７））。注射されたヒト化抗体は、天然のヒト抗体と基本的に等価の半減期をもち、量及び回数がより少なくてすむ。

【００６１】

上述の薬学組成物は、多発性硬化症又はその他の炎症性障害、特に中枢神経系のものの予防的及び／又は治療的処置のために投与することができる。治療的利用分野においては、多発性硬化症といった疾病の疑いのある又はすでにそれを患っている患者に対し、組成物が、疾病の症状及びその合併症を治ゆ又は少なくとも部分的に阻止するのに充分な量で投与される。これを達成するのに適切な量が、治療的又は薬学的に有効な用量と定義づけされる。

【００６２】

予防的利用分野においては、薬学組成物は、特定の疾病にかかりやすいか又はその他の形でそのリスクが高い患者に対して、疾病のリスクを削除又は低減するか又はその発症を遅らせるのに充分な量で投与される。このような量は、予防的に有効な用量として定義づけされる。軽快状態にある多発性硬化症を患う患者においては、リスクはＮＭＲ画像によって査定でき、場合によっては患者が観察した症候前の兆しによって査定できる。

【００６３】

薬学組成物は、非経口投与、局所投与、静脈内投与、経口投与又は皮下投与、エアゾルなどによる筋肉局所投与、又は経皮投与によって、予防的及び／又は治療的処置のために使用されることになる。薬学組成物は、投与方法に応じてさまざまな単位用量形態で投与できる。例えば、経口投与に適した単位用量形態には、粉末、錠剤、丸薬、カプセル及びトローチ剤か含まれる。

【００６４】

上述の状態の治療のための本発明の組成物の有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態及び投与されるその他の薬を含めた数多くの異なる要因によって左右されることになる。かくして治療用量は、安全性と効力を最適にするべく滴定することが必要になる。これらの組成物は、その他の治療薬に類似した要領ですなわち生理学的に受容可能な担体の中で、獣医学用途及び人間の臨床的用途のために、哺乳動物に投与することができる。一般に、投与用量は、宿主の体重１ｋｇにつき約０．０００１～１００ｍｇ、より普通には０．０１～０．５ｍｇの範囲となる。

（ＶＩＩＩ．その他の用途）

ヒト化抗体は同様に、ＶＬＡ－４レセプタの親和力精製のためにも有用である。抗体は

、固体支持体に不動化され、分散したタンパク質の溶液が、支持体全体に通される。ＶＬＡ－４は、支持体に結合し、かくしてその他のタンパク質から分離される。この方法によって利用可能になった精製ＶＬＡ－４又はそのフラグメントは、ワクチン又はさらなる抗体を産生するための免疫原として使用できる。

【００６５】

本発明のヒト化抗体は同様に、例えば、ヒト化抗体での動物の免疫化によりイディオタイプ抗体を生成するためにも有用である。ＶＬＡ－４又はそのフラグメントによりヒト抗体に対する結合が阻害される抗イディオタイプ抗体が選択される。抗イディオタイプ抗体及びＶＬＡ－４又はそのフラグメントの両方がヒト化免疫グロブリンに結合することから、抗イディオタイプ抗体はエピトープの「内的イメージ」を表わす可能性があり、かくしてＶＬＡ－４レセプタすなわちＶＣＡＭ－１のリガンドに置換することができる。

【実施例】

【００６６】

（例１：マウス２１．６可変領域のクローニング及び配列決定）

マウス抗－ＶＬＡ抗体２１．６については、同時係属出願ＵＳＳＮ　０７／８７１，２２３に記述されてきた。マウス２１．６抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、全ＲＮＡを分離した。キット（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｌｉｍｉｔｅｄ）を用いて第１ストランドのｃＤＮＡを合成した。可変領域についてコードする配列にフランキングする外部配列にハイブリッド形成しかくしてマウス２１．６抗体可変領域のための全コーディング配列のクローニングを可能にするように設計されたＰＣＲプライマを用いて、重鎖及び軽鎖可変領域を得た。４２のマウスカッパ軽鎖リーダー配列及び５５のマウス重鎖リーダー配列のデータベースに基づいて、マウスカッパ軽鎖リーダー配列及びマウス重鎖リーダー配列の５′－末端に対しハイブリッド形成するセンスＰＣＲプライマを設計した（Ｊｏｎｅｓ　＆　Ｂｅｎｄｉｇ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ９：８８－８９（１９９１）（あらゆる目的のため全体が参考として内含されている））。これらのプライマは、マウス定常領域（カッパ又はガンマ）の３′－末端にハイブリッド形成するアンチセンスＰＣＲプライマと結びつけて使用された。

【００６７】

標準的に１０ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ　８．３）、５０ｍＭのＫＣｌ、２００μＭのｄＮＴＰ、１．５ｍＭの$MgCl_2$、１単位のＡｍｐｌｉ　Ｔａｑ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｃｅｔｕｓ）ＤＮＡポリメラーゼ、１μｌのｃＤＮＡ鋳型、０．２５μＭのＭＫＶプライマ及び０．２５μＭのマウスカッパ軽鎖アンチセンスＰＣＲプライマ（図１）を含む５０μｌの反応の中で、マウス２１．６カッパV_L領域をＰＣＲ増幅させた。マウス２１．６V_H領域は、マウスＩｇＧ１重鎖定常領域に特異的なＭＨＶＨプライマ及びアンチセンスＰＣＲプライマが使用されたという点を除いて（図２）、上述のとおりにＰＣＲ増幅された。５分間９４℃での初期融解後に、１分間９４℃、１分間５５℃、２分間７２℃で、２５サイクルにわたり、各ＰＣＲ反応を循回させた。最後のサイクルの完了後に１０分間７２℃での最終的拡張が続いた。プライマアニーリングと拡張段階の間の傾斜時間は２．５分であった。ＰＣＲ増幅の後、各反応からの１０μｌのアリコートを臭化エチジウム染色された１．５％のアガロースゲル上で分析した。

【００６８】

「ＴＡクローニングシステム」（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を用いてＰＣＲ産物をクローニングした。適正なサイズのインサートを含むベクターを、２本鎖プラスミドＤＮＡをＳｅｑｕｅｎａｓｅ（Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を用いて配列決定した。ＰＣＲ増幅段階の間に導入されるかもしれないあらゆるエラーを避けるため、各々の可変領域について少なくとも２つの独立してＰＣＲ増幅されクローニングされたＤＮＡフラグメントを配列決定した。

【００６９】

ＰＣＲ産物の配列を、その他のマウス軽鎖及び重鎖可変領域と比較した（表１及び２を

参照）。この比較は、ＭＫＶ２及びＭＫＶ４プライマからのＰＣＲ産物が真正なマウス２１．６カッパ可変領域を表わし、ＭＨＶ１及びＭＨＶ２プライマからのものが真正マウスV_H領域を表わす、ということを示し、これらの産物の配列がマウス２１．６抗体可変領域のものであるという結論が下された。マウス２１．６のV_L及びV_H領域についてコードするｃＤＮＡのＤＮＡ及びアミノ酸配列は、図１及び２に示されている。

【００７０】

【表１】

表　1

他の軽鎖可変領域に対するマウス21.6の軽鎖可変領域の比較

マウス21.6V_L対：	類似性百分率[1]	同一性百分率
マウスカッパV_Lサブグループ５[2]のためのコンセンサス配列	84.0	72.6
ヒトカッパV_Lサブグループ１[2]のためのコンセンサス配列	84.0	69.8
ヒトカッパV_Lサブグループ２[2]のためのコンセンサス配列	65.1	52.8
ヒトカッパV_Lサブグループ３[2]のためのコンセンサス配列	72.6	57.5
ヒトカッパV_Lサブグループ４[2]のためのコンセンサス配列	72.6	58.5
ヒトREI[3]からのV_Lの配列（ヒトカッパV_Lサブグループ１の１員）	81.0	72.4

1. 類似性百分率はウイスコンシン大学遺伝学コンピュータグループの「GAP 」プログラムを用いて決定された。
2. コンセンサス配列は上述のコンセンサス配列からとった。
3. Palm et al., Hoppe-SeylerのZ.Physiol.Chem. 356: 167-191 (1975) により配列決定された通りの REI

【００７１】

【表２】

表　2

他の重鎖可変領域に対するマウス21.6の重鎖可変領域の比較

マウス21.6V_H 対：	類似性百分率[1]	同一性百分率
マウスV_H サブグループ２ｃ[2]のためのコンセンサス配列	94.3	91.1
ヒトV_H サブグループ１[2]のためのコンセンサス配列	78.0	65.0
ヒトV_H サブグループ２[2]のためのコンセンサス配列	70.5	53.3
ヒトV_H サブグループ３[2]のためのコンセンサス配列	67.5	52.8
ヒト21／28′ CL[3] からのV_H の配列（ヒトV_H サブグループ１の１員）	76.5	64.7

1. 類似性百分率は、ウイスコンシン大学遺伝学コンピュータグループの「GAP 」プログラムを用いて決定された。
2. コンセンサス配列は、上述のコンセンサス配列からとった。
3. Dersimonian et al., J.Immunol. 139：2496-2501（1987)によって配列決定された通りの21／28′ CL。

【００７２】

（例２：キメラ２１．６抗体の構築）

ヒト定常領域にマウス２１．６V_L 及びV_H 領域のＰＣＲクローニングされたｃＤＮＡを連鎖させることによって、キメラ軽鎖及び重鎖を構築した。特別に設計したＰＣＲプライマを用いてマウスｃＤＮＡ配列の５′及び３′末端を修正した。リーダー配列の初めについてコードするＤＮＡ配列にハイブリッド形成する５′－末端ＰＣＲプライマ（表３）を、効率の良い翻訳に不可欠なＤＮＡ配列を作成するように（Ｋｏｚａｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９４７－９５０（１９８７））、及び発現ベクターへのクローニングのためのＨｉｎｄＩＩＩ制限部位を作成するように設計した。Ｊ領域の終りについてコードするＤＮＡ配列に対しハイブリッド形成する３′末端プライマ（表３）は、定常領域に題するスプライシングに不可欠なＤＮＡ配列を作成するように、そして発現ベクター内へのクローニングのためのＢａｍＨＩ部位を作成するように設計した。ＰＣＲ増幅の産物をＨｉｎｄＩＩＩ及びＢａｍＨＩで消化し、ｐＵＣ１９ベクター内にクローニングし、ＰＣＲ増幅中にいかなるエラーも起こらなかったことを確認するべく配列決定した。適合されたマウス２１．６の可変領域を次に、ヒトカッパ又はガンマ－１定常領域のいずれかを含む哺乳動物細胞発現ベクターへとサブクローニングさせた（図３）。

【００７３】

【表３】

表　3

キメラ21.6抗体の構築のための PCRプライマ

Ａ．軽鎖可変領域

１．５′－末端（37mer）（配列番号18）の再構築のためのプライマ

５′ C AGA AAG CTT GCC GCC ACC ATG AGA CCG TCT ATT CAG 3′

HindⅢ Kozak M R P S I Q

コンセンサス配列

２．３′－末端（35mer）（配列番号19）の再構築のためのプライマ

５′ CC GAG GAT CCA CTC ACG TTT GAT TTC CAG CTT GGT 3′

BamHＩ　スプライス供与体部位

Ｂ．重鎖可変領域

１．５′－末端（37mer）（配列番号20）の再構築のためのプライマ

５′ C AGA AAG CTT GCC GCC ACC ATG AAA TGC AGC TGG GTC 3′

HindⅢ Kozak M K C S W V

コンセンサス配列

２．３′－末端（33mer）（配列番号21）の再構築のためのプライマ

５′ CC GAG GAT CCA CTC ACC TGA GGA GAC GGT GAC T 3′

BamHＩ　スプライス供与体部位

【００７４】

（例３：２１．６キメラ抗体の発現と分析）

キメラ２１．６軽鎖及び重鎖に対しコードする２つのプラスミドＤＮＡをＣｏｓ細胞内に同時トランスフェクションした。２日又は３日後、Ｃｏｓ細胞からの培地をＥＬＩＳＡにより、（１）ヒトＩｇＧ様抗体の産生について、及び（２）表面上にヒトα４β１インテグリンを発現するＬ細胞に結合するこのヒト様抗体の能力について、分析した。図４及び１２は、精製されたマウス２１．６抗体対照と比較した、ヒトα４β１インテグリンに対する結合についてのキメラ２１．６抗体の未精製標本及びプロテインＡで精製された標本の分析を示している。これらの図は、キメラ２１．６抗体が抗原に充分結合したことを示しており、適正なマウス２１．６のV_L及びV_H領域がクローニングされたことを確認している。

【００７５】

（例４：マウス２１．６可変領域の構造のモデリング）

マウス２１．６抗体のV_L及びV_H領域の分子モデルを構築した。モデルは、ＵＮＩＸ（登録商標）オペレーティングシステムの下で作動するシリコングラフィクスＩＲＩＳ４Ｄワークステーション上で分子モデリングパッケージＱＵＡＮＴＡ（Ｐｏｌｙｇｅｎ Ｃｏｒｐ．，ＵＳＡ）を用いて構築された。マウス２１．６のV_L領域のＦＲの構造はヒトベンスージョーンズ免疫グロブリンＲＥＩ（Ｅｐｐ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １４：４９４３－４９５２（１９７５））の解明済みの構造に基づいていた。

【００７６】
マウス２１．６のV_H領域のＦＲの構造は、マウス抗体Ｇｌｏｏｐ２の解明済みの構造に基づいていた。ＦＲ内の同一の残基が保持された；同一でない残基は、ＱＵＡＮＴＡ内の機能を用いて置換された。マウス２１．６のV_L領域のＣＤＲ１及びＣＤＲ２は、それぞれ正準構造グループ２及び１に属するものとして同定された（上述のＣｈｏｔｈｌａｅｔ　ａｌ．，）。ＲＥＩのＣＤＲ１及びＣＤＲ２は同じ正準グループに属することから、マウス２１．６のV_L領域のＣＤＲ１及びＣＤＲ２は、ＲＥＩのＣＤＲ１及びＣＤＲ２の構造を基にモデリングされた。

【００７７】
マウス２１．６V_L領域のＣＤＲ３は、V_L領域のＣＤＲ３についての正準構造グループのうちのいずれにも対応しないと思われた。しかしながらデータベースでの探索により、マウス２１．６V_L領域内のＣＤＲ３がマウスＨｙＨＥＬ－５V_L領域内のＣＤＲ３と類似していることが明らかになった（Ｓｈｅｒｉｆｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８４：８０７５－８０７９（１９８７））。

【００７８】
かくして、マウス２１．６V_L領域のＣＤＲ３はマウスＨｙＨＥＬ－５のV_L領域内のＣＤＲ３の構造を基にモデリングされた。マウス２１．６のV_H領域のＣＤＲ１及びＣＤＲ２は、それぞれ正準構造グループ１及び２に属するものとして同定された。マウス２１．６V_H領域のＣＤＲ１は、V_H領域のＣＤＲ１についての正準グループ１の構成員に密に類似しているＧｌｏｏｐ２V_H領域のＣＤＲ１を基にモデリングされた。マウス２１．６のV_H領域のＣＤＲ２は、同様にV_H領域のためのＣＤＲ２についての正準グループ２の構成員であるマウスＨｙＨＥＬ－５（上述のＳｈｅｒｉｆｆ　ｅｔ　ａｌ）のＣＤＲ２を基にモデリングされた。V_H領域のＣＤＲ３については、正準構造は全く存在しない。

【００７９】
しかしながら、マウス２１．６のV_H領域内のＣＤＲ３は、マウスＲ１９．９V_H領域内のＣＤＲ３と類似し（Ｌａｓｃｏｍｂｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：６０７～６１１（１９８９））、マウスＲ１９．９のV_H領域のＣＤＲ３ループの頂端に存在する余分なセリン残基を除去し、アニールし、間隙を洗錬することによって、このＣＤＲ３を基にモデリングされた。このモデルは最後に、不利な原子接触を軽減しファンデルワールス及び静電相互作用を最適化するべく、ＱＵＡＮＴＡ内で実行されるとおり、ＣＨＡＲＭＭ電位（Ｂｒｏｏｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｏｍｐ．Ｃｈｅｍ．４：１８７－２１７（１９８３））を用いて、最も急な下降及び共役勾配エネルギー最小化に付された。

【００８０】
マウス２１．６可変領域の構造モデルの一覧は、図５に示されている。モデルは、ヒト化２１．６抗体可変領域の設計を洗錬する上での補助として用いられた。

【００８１】
（例５：再構成されたヒト２１．６可変領域の設計）
（１）フレームワーク構造配列のための相同ヒト抗体の選択
マウス２１．６のＦＲに対する高い率の同一性を示すＦＲをもつヒト可変領域をアミノ酸配列の比較により同定した。巻末に記載した表４及び表５は、全ての既知のマウス可変領域に対してマウス２１．６可変領域を比較し、次に全ての既知のヒト可変領域に対してこれを比較している。マウス２１．６のV_L領域は、上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，によって定義づけされるように、マウスカッパV_L領域サブグループ５に属するものとして同定された。マウス２１．６カッパV_L領域と９３．４％という高い同一性百分率をもつ個々のマウスカッパV_L領域が同定された（３８Ｃ１３Ｖ′ＣＬ及びＰＣ６１３′ＣＬ）。

【００８２】
マウス２１．６V_L領域は、上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，によって定義づけられているようにサブグループ１のヒトカッパV_L領域に最も類似していた。マウス２１．６

カッパV_L領域に対する７２．４％という高い同一性をもつ個々のヒトカッパV_L領域が同定された。最も類似したヒト可変領域ＲＥＩの１つからのフレームワーク構造領域（ＦＲ）は、再構成されたヒト２１．６V_L領域の設計において使用された。

【００８３】

上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，により定義づけされているようなマウスV_H領域サブグループ２ｃに属するものとしてマウス２１．６V_H領域が同定された。マウス２１．６V_H領域に対する９３．３％という高い同一性をもつ個々のマウス重鎖可変領域が同定された（１７．２．２５′ＣＬ及び８７．９２．６′ＣＬ）。マウス２１．６V_H領域は、上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．により定義づけされる通り、サブグループ１のヒトV_H領域に最も類似していた。マウス２１．６V_H領域に対し６４．７％という同一性をもつ個々のヒトV_H領域が同定された。再構成されたヒト２１．６V_H領域の設計において、最も類似したヒト可変領域、２１／２８′ＣＬの１つからのＦＲを使用した。

（２）フレームワーク構造領域内のアミノ酸の置換

（ａ）軽鎖

再構成ヒト２１．６V_L領域のための設計プロセスの中の次の段階は、マウス２１．６V_L領域からのＣＤＲをヒトＲＥＩからのＦＲに連結させることであった（上述のＰａｌｍ　ｅｔ　ａｌ．，）。再構成ヒト２１．６V_L領域の第１のバージョン（Ｌａ）においては、ヒトＦＲ内で７個の変更が行なわれた（表４、図６）。

【００８４】

ＦＲ４中の位置１０４，１０５及び１０７において、ＲＥ１からのアミノ酸は、もう１つのヒトカッパ軽鎖からのより標準的なヒトＪ領域アミノ酸で置換された（Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２７（１９８８））。

【００８５】

ＦＲ２の位置４５では、ＲＥＩ内に通常存在するリシンは、マウス２１．６V_L領域内のその位置に見られるようにアルギニンに変更された。この位置のアミノ酸残基は、マウス２１．６V_L領域のＣＤＲループを支持する上で重要であると考えられた。

【００８６】

ＦＲ２の位置４９では、通常ＲＥＩ内に存在するチロシンは、マウスV_L領域内のこの位置に見られるようなヒスチジンに変更された。マウス２１．６V_L領域内のこの位置にあるヒスチジンは、結合部位の中央に位置づけされているものとしてモデル内で観察され、抗体－抗原結合の間に抗原と直接接触できる可能性があった。

【００８７】

ＦＲ３内の位置５８では、ＲＥＩ内に通常存在するバリンは、マウス２１．６V_L領域内のその位置に見出されるようなイソロイシンに変更された。この位置にあるアミノ酸残基は、マウス２１．６V_L領域のＣＤＲ２ループを支持する上で重要であると考えられた。

【００８８】

ＦＲ３の位置６９では、ＲＥＩ内に通常存在するトレオニンは、マウス２１．６V_L領域内のその位置で見出されるようにアルギニンに変更された。マウス２１．６V_L領域内のこの位置にあるアルギニンは、マウス２１．６V_L領域のＣＤＲ１ループに隣接して位置づけられているものとして観察され、抗体－抗原結合中抗原と直接接触できる可能性があった。

【００８９】

ＲＥＩのＦＲ２内の位置４９でいかなる変更もなされなかったという点を除いて上述のものと同じ置換を含む再構成されたヒト２１．６V_L領域の第２のバージョン（Ｌｂと呼ばれる）が設計された（図６）。

（ｂ）重鎖

再構成ヒト２１．６V_H領域のための設計プロセスにおける次のステップは、マウス２１．６V_H領域からのＣＤＲを２１／２８′ＣＬからのＦＲに連結させることであった（Ｄｅｒｓｉｍｏｎｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９：２４９６－２５

０１（１９８７））。再構成ヒト２１．６Ｖ領域の第１のバージョン（Ｈａ）においては、ヒトフレームワーク構造領域内で５つの変更がなされた（表５、図７）。ヒトＦＲ内の５つの変更は、位置２７，２８，２９，３０及び７１においてであった。

【００９０】

ＦＲ１内の位置２７，２８，２９及び３０においては、ヒト２１／２８'ＣＬ内に存在するアミノ酸は、マウス２１．６V_H領域内のこれらの位置で見られるアミノ酸に変更された。これらの位置はＦＲ１内にあるものとして指定されているものの（上述のｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，）、位置２６～３０は、V_H領域のＣＤＲ１ループを形成する構造ループの一部である。従ってこれらの位置にあるアミノ酸が抗原に対する結合に直接関与している確率が高い。実際、位置２７～３０は、上述のＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，により定義づけされているようにV_H領域のＣＤＲ１のための正準構造の一部である。

【００９１】

ＦＲ３の位置７１では、ヒト２１／２８'ＣＬ内に存在するアルギニンは、マウス２１．６V_H領域内のその位置に見られる通りのアラニンに変更された。位置７１は、上述のＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，により定義づけされているようにV_H領域のＣＤＲ２のための正準構造の一部である。マウス２１．６可変領域のモデルから、位置７１にあるアラニンが、V_H領域のＣＤＲ２ループを支持する上で重要であると思われる。この位置におけるアラニンに代ってのアルギニンの置換が、ＣＤＲ２ループの配置を分断する確率がきわめて高い。

【００９２】

再構成ヒト２１．６V_H領域の第２のバージョン（Ｈｂ）は、バージョンＨａについて上述した５つの変更に加えてＦＲ２におけるもう１つの変形を含んでいる。

【００９３】

ＦＲ２内の位置４４では、ヒト２１／２８'ＣＬ内に存在するアルギニンは、マウス２１．６V_H領域内の該当する位置に見られるようなグリシンへと変更された。V_L－V_H領域のパッキング及びマウス２１．６可変領域のモデルについての公表された情報に基づいて、位置４４にあるアミノ酸残基がV_L－V_H領域のパッキングにおいて重要であるかもしれないということが考えられた（上述のＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，）（図５）。

【００９４】

再構成ヒト２１．６Ｖ領域バージョンＨｃは、ＣＤＲ３ループをヒトＶＣＡＭ－１にさらに類似して見えるようにするべく設計された。マウス２１．６抗体及びヒトＶＣＡＭ－１の両方共がα４β１インテグリンに結合する。抗体のV_H領域のＣＤＲ３ループは、６つのＣＤＲループのうち最も多様であり、一般に抗体－抗原相互作用における抗体の最も重要な単一の構成要素である（上述のＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　＆　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１－３８８（１９９２）；Ｂａｒｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：４４５７－４４６１（１９９２））。

【００９５】

マウス２１．６V_H領域のＣＤＲ３とヒトＶＣＡＭ－１のアミノ酸８６～９４の間、特にＣＤＲ３ループ内のＹＧＮ（チロシン－グリシン－アスパラギン）配列とＶＣＡＭ－１内のＦＧＮ（フェニルアラニン－グリシン－アスパラギン）配列の間で、幾分かの配列類似性が同定された。これらの配列は、さまざまな細胞付着事象において重要であるＲＧＤ（アルギニン－グリシン－アスパラギン酸）配列に関係するものと考えられる（Ｍａｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　７１；６７１－６７８（１９９２））。

【００９６】

従って、ＣＤＲ３の位置９８において、マウス２１．６V_H領域内に存在するチロシンは、ヒトＶＣＡＭ－１の配列中に発見されるようなフェニルアラニンへと変更された。ＦＲ２内の位置３６において可能な置換も考慮された。マウス２１．６ＶＨ鎖は、ＦＲ２内の位置３６に普通でないシステイン残基を含んでいる。ＦＲ２内のこの位置は、関連す

るマウス及びヒト配列内では、通常トリプトファンである（表５）。システイン残基は往々にして抗体のコンホメーションにとって重要であるものの、マウス２１．６可変領域のモデルは、このシステイン残基が直接的又は間接的に抗原結合に関与していることを示さず、従って、ヒト化２１．６抗体の３つのバージョン全てにおいて、ヒト２１／２８′ＣＬV_H領域のＦＲ２内に存在するトリプトファンは未置換のままに残された。

【００９７】

（例６：再構成ヒト２１．６抗体の構築）

再構成ヒト２１．６V_L領域の第１のバージョン（ｒｅｓｈ２１．６ＶＬａ）は、本質的にＤａｕｇｈｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：２４７１～２４７６（１９９１）により記述されているように重複するＰＣＲフラグメントから構築された（図８参照）。例２に記述されたとおりに適合されｐＵＣ１９に挿入されたマウス２１．６V_L領域が、鋳型として用いられた。４対のプライマ、すなわちＡＰＣＲ１－ｖｌａ１，ｖｌａ２－ｖｌａ３，ｖｌａ４－ｖｌａ５及びｖｌａ６－ｖｌａ７が合成された（表６及び図８）。隣接する対は、少なくとも２１塩基だけ重複した。ＡＰＣＲ１プライマはｐＵＣ１９ベクターに相補的である。１０ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、５０ｍＭのＫＣｌ、２００μＭのｄＮＴＰ及び１．５ｍＭの$MgCl_2$を含む５０μｌのＰＣＲ緩衝液中の１単位のＡｍｐｌｉ Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ Ｃｅｔｕｓ）及び１０ｎｇの鋳型ＤＮＡと、適当なプライマ対（０．２μｍｏｌｅｓ）を組み合わせた。

【００９８】

各々の反応は、２５サイクル行なった。５分間９４°での最初の融解後、反応を１分間９４℃、１分間５５℃、そして２分間７２℃で循回させ、最後にさらに１０分間７２℃でインキュベートさせた。プライマアニーリングと拡張段階の間の傾斜時間は２．５分であった。第１ラウンドのＰＣＲ反応からの４つの反応（Ａ，Ｂ，Ｃ、及びＤ）の産物をフェノールで抽出し、エタノールで沈降させた。

【００９９】

【表４】

表　6

再構成ヒト21.6可変領域の構築のための PCRプライマ

Ａ．軽鎖可変領域

１．バージョン「ａ」の合成のためのプライマ

21.6VLa1 (39mer) (配列番号：22) :
5′ GAT GGT GAC TCT ATC TCC TAC AGA TGC AGA CAG TGA GGA 3′

21.6VLa2 (32mer) (配列番号：23) :
5′ CTG TAG GAG ATA GAG TCA CCA TCA CTT GCA AG 3′

21.6VLa3 (39mer) (配列番号：24) :
5′ AGG AGC TTT TCC AGG TGT CTG TTG GTA CCA AGC CAT ATA 3′

21.6VLa4 (41mer) (配列番号：25) :
5′ ACC AAC AGA CAC CTG GAA AAG CTC CTA GGC TGC TCA TAC AT
3′

21.6VLa5 (40mer) (配列番号：26) :
5′ GCA GGC TGC TGA TGG TGA AAG TAT AAT CTC TCC CAG ACC C
3′

21.6VLa6 (42mer) (配列番号：27) :
5′ ACT TTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT
3′

21.6VLa7 (59mer) (配列番号：28) :
5′ CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTG GTG CCT TGA
CCG AAC GTC CAC AGA TT 3′

２．バージョン「ｂ」の合成のためのプライマ

21.6VLb1 (33mer) (配列番号：29) ：H-49をY-49へ変更，
5′ GGA AAA GCT CCT AGG CTG CTC ATA TAT TAC ACA 3′

21.6VLb2 (38mer) (配列番号：30) ： StyⅠ部位を破壊するため
ACC-101を ACA-101に変更
5′ CCG AGG ATC CAC TCA CGT TTG ATT TCC ACC TTT GTG CC 3′

【０１００】

【表５】
Ｂ．重鎖可変領域

１．バージョン「ａ」の合成のためのプライマ

21.6VHa1（51mer）（配列番号：31）：
５′ AAC CCA GTG TAT ATA GGT GTC TTT AAT GTT GAA ACC GCT AGC TTT ACA GCT ３′

21.6VHa2（67mer）（配列番号：32）：
５′ AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT GGC CAA AGG CTG GAG TGG ATG GGA AGG ATT G ３′

21.6VHa3（26mer）（配列番号：33）：
５′ GAC CCG GCC CTG GAA CTT CGG GTC AT ３′

21.6VHa4（66mer）（配列番号：34）：
５′ GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GCA GAC ACC TCT GCC AGC ACC GCC TAC ATG GAA ３′

21.6VHa5（64mer）（配列番号：35）：
５′ CCA TAG CAT AGA CCC CGT AGT TAC CAT AAT ATC CCT CTC TGG CGC AGT AGT AGA CTG CAG TGT C ３′

21.6VHa6（63mer）（配列番号：36）：
５′ GGT AAC TAC GGG GTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA ３′

２．バージョン「ｂ」の合成のためのプライマ

21.6VHb(37mer)（配列番号：37）：R-44′をG-44に変更
５′ CCA GGG CCG GGT CAC CAT CAC CAG AGA CAC CTC TGC C ３′

３．バージョン「ｃ」の合成のためのプライマ

21.6VHc(27mer)（配列番号：38）：Y-98をF-98に変更
５′ CAG GCC CCT GGC CAA GGG CTG GAG TGG ３′

Ｃ．軽鎖及び重鎖の両方の可変領域

フランキング pUC19ベクター DNAに対しハイブリッド形成するプライマ

APCR1（17mer（配列番号：39）、センスプライマ）
５′ TAC GCA AAC CGC CTC TC ３′

APCR4（18mer（配列番号：40）、アンチセンスプライマ）
５′ GAG TGC ACC ATA TGC GGT ３′

【０１０１】
ＰＣＲ産物Ａ及びＢ、及びＣ及びＤを第２ラウンドのＰＣＲ反応において連結させた。アニーリング温度が６０℃まで上昇させられたという点を除いて、上述のとおりに、ＰＣＲ産物Ａ及びＢ及びＣ及びＤ（各々５０ｎｇ）を５０μｌのＰＣＲ反応に付加し２０サイクルを通して増幅させた。これらの反応の産物をＥ及びＦと呼ぶ。使用されたＰＣＲプライマの対は、それぞれＡＰＣＲ１－ｖｌａ３及びｖｌａ４－ｖｌａ７であった。ＰＣＲ産物Ｅ及びＦをフェノールで抽出し、エタノールで沈降させ、次に第３ラウンドのＰＣＲ反応において、末端プライマとしてＡＰＣＲ１及びｖｌａ７を用いて上述のものに類似した２段階ＰＣＲ反応でそれ自体の相補性によって組み立てた。リーダー配列を含む完全に再形成されたヒト２１．６V_L領域を表わす充分に組立てられたフラグメントをＨｉｎｄＩＩＩ及びＢａｍＨＩで消化させ、配列決定のためｐＵＣ１９内へクローニングさせた。適正な配列をもつクローンがｒｅｓｈ２１．６ＶＬａと呼称された。

【０１０２】
Ｋａｍｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１７：５４０４（１９８９）の方法により、再構成ヒト２１．６V_L領域の第１のバージョン（Ｌａ）内でわずかな修正を加えるためにＰＣＲプライマを用いて、再構成ヒト２１．６V_L領域の第２のバージョン（Ｌｂ）を構築した。２組のプライマを合成した（表６）。各々のＰＣＲ反応は、本質的に上述のものと同じ条件下で実施された。第１のＰＣＲ反応においては、ＳｔｙＩ部位（Ｔｈｒ－ＡＣＣ－９７～Ｔｈｒ－ＡＣＡ－９７）を破壊するため突然変異誘発プライマ２１．６ＶＬｂ２を用い、ｒｅｓｈ２１．６ＶＬａ２を生成した。次に、第２のＰＣＲ反応においては、鋳型ＤＮＡとしてのｐＵＣ－ｒｅｓｈ２１．６ＶＬａ２と共に突然変異誘発性プライマ２１．６ＶＬｂ１（Ｈｉｓ－４９～Ｔｙｒ－４９）を使用した。ＰＣＲ産物をＳｔｙＩ及びＢａｍＨＩでカットし、同じ制限酵素で分割した状態で、ｐＵＣ－ｒｅｓｈ２１．６ＶＬａ２内にサブクローニングした。適正な配列をもつクローンがｐＵＣ－ｒｅｓｈ２１．６ＶＬｂと呼称された。
再構成ヒト２１．６V_H領域のバージョン「ａ」は、再構成ヒト２１．６V_L領域のバージョン「ａ」の構築について記述されているものと同じＰＣＲ方法を用いて構築された（表６及び図９）。再構成ヒト４２５V_H領域のバージョン「ｇ」（上述のＫｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，）及び再構成ヒトＡＵＫ１２－２０V_H領域のバージョン「ｂ」についてコードするＨｉｎｄＩＩＩ－ＢａｍＨＩＤＮＡフラグメントを、それぞれｐＵＣ－ｒｅｓｈ４２５ｇ及びｐＵＣ－ｒｅｓｈＡＵＫ１２－２０ｂを生成するｐＵＣ１９ベクターにサブクローニングさせた（ＡＵＫ１２－２０のバージョン「ｂ」は上述のＫｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，によって記述されたフラグメントV_{Ha}４２５のＰＣＲ突然変異により誘導され、アミノ酸配列（配列番号：４１）をコードする：すなわち
【０１０３】
【表６】
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT SYYIH WVRQAPGQGLEWVG

YIDPFNGGTSYNQKFKG KVTMTVDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GGN-RFAY WGQGTLVTVSS

【０１０４】
（スペースがＦＲとＣＤＲ領域を分離している））。
【０１０５】
プラスミドｐＵＣ－ｒｅｓｈ４２５ｇ及びｐＵＣ－ｒｅｓｈＡＵＫ１２－２０ｂならびに、キメラ２１．６重鎖（ｐＵＣ－ｃｈｉｍ２１．６ＶＨ）の構築において使用するため修正されたとおりのマウス２１．６V_H領域を含むｐＵＣベクターを、次に続くＰＣＲ反応において、鋳型ＤＮＡとして使用した。再構成ヒト２１．６V_H領域のバージョン「ａ」の構成のため、ＰＣＲプライマを設計し合成した（表６）。ＤＮＡ鋳型としてｐＵＣ－ｒｅｓｈＡＵＫ１２－２０ｂを又ＰＣＲプライマ対としてＡＰＣＲ１－ｖｈａ１用いて、ＰＣＲ産物Ａ（図９）を得た。ＤＮＡ鋳型としてｐＵＣ－ｃｈｉｍ２１．６ＶＨを又ＰＣＲプライマ対としてｖｈａ２－ｖｈａ３及びｖｈａ６－ＡＰＣＲ４を用いて、ＰＣＲ産物Ｂ及びＤを得た。最終的に、ＤＮＡ鋳型としてｐＵＣ－ｒｅｓｈ４２５ｇを又ＰＣＲプライマ対としてｖｌａ４－ｖｌａ５を用いて、ＰＣＲ産物Ｃを得た。ＤＮＡ配列決定のためのＨｉｎｄＩＩＩ－ＢａｍＨＩフラグメントとしてｐＵＣ１９へと、最終ＰＣＲ産物をサブクローニングした。適正なＤＮＡ配列をもつクローンが、ｐＵＣ－ｒｅｓｈ２１．６ＶＨａと呼称された。再構成２１．６可変領域の第１のバージョンのＤＮＡ及びアミノ酸配列は、図１０に示されている。
【０１０６】
再構成ヒト２１．６V_H領域の残りのバージョンは、本質的に、再構成ヒト２１．６V_L領域のバージョン「ｂ」の構築について上述した通りに構築された。２組のプライマが合成された（表６）。第２（Ｈｂ）及び第３（Ｈｃ）のバージョンについては、それぞれ突然変異誘発性プライマ２１．６ＶＨｂ（Ａｒｇ－４４～Ｇｌｙ－４４）及び２１．６Ｖ

Ｈｃ（Ｔｙｒ－９８～Ｐｈｅ－９８）がそれぞれ、鋳型ＤＮＡとしてのｐＵＣ－ｒｅｓｈ２１．６ＶＨａと共にＰＣＲ反応の中で使用された。ＰＣＲ産物ＶＨｂ及びＶＨｃは、制限酵素で切断され、それぞれＭｓｃＩ－ＢａｍＨＩ及びＰｓｔＩ－ＢａｍＨＩフラグメントとしてｐＵＣベクターｐＵＣ－ｒｅｓｈ２１．６ＶＨａへとサブクローニングされ、ｐＵＣ－ｒｅｓｈ２１．６ＶＨｂ及びｐＵＣ－ｒｅｓｈ２１．６ＶＨｃを生成した。

【０１０７】

再構成ヒト２１．６V_H領域（Ｈａ）の第１のバージョンは、再構成ヒト２１．６V_L領域（Ｌａ）の第１のバージョンの構築のために用いられたものと類似の要領で構築された。しかしながらこの場合、ＰＣＲプライマが、３つの異なる鋳型ＤＮＡすなわち、キメラ２１．６重鎖の発現のためにすでに適合されたマウス２１．６V_H領域、ヒト化４２５V_H領域バージョン「ｇ」（上述のＫｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ　ｅｔ　ａｌ．）及びヒト化ＡＵＫ１２－２０バージョン「ｂ」V_H領域（表６、図９）と共に用いられた。ヒト化２１．６重鎖可変領域の第１のバージョンのＤＮＡ及びアミノ酸配列は図１１に示されている。ヒト化２１．６V_H領域の第２及び第３のバージョン（Ｈｂ及びＨｃ）は、ヒト化２１．６V_H領域の第１のバージョン（Ｈａ）内でわずかな修正を加えるべくＰＣＲプライマを用いて構築された（前述の表６）。

【０１０８】

（例７：ヒト化抗体の発現及び分析）

１．発現ベクター内の定常領域に対する可変領域の連鎖

キメラ及び再構成２１．６V_L及びV_H領域についてコードするＤＮＡフラグメントを、哺乳動物細胞内でヒトカッパ軽鎖又はヒトガンマ－１重鎖のいずれかを発現するように設計されたＨＣＭＶベクターへとサブクローニングさせた（図３及びＭａｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ａｎｔｉｂｏｄ．Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ２：１２４－１３４（１９９１）を参照のこと）。両方のベクターは共に免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の高レベル転写のためのヒトサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）プロモータ及びエンハンサーを含んでいる。軽鎖発現ベクターは、上述のＭａｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，に記述されているものと全く同じであり、ヒトカッパ定常領域についてコードするゲノミックＤＮＡを含有する（Ｒａｂｂｉｔｔｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１３：１６６－１７１　（１９８４））。重鎖発現ベクターは本質的に上述のＭａｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，に記述されている通りであるが、ヒトガンマ－１定常領域についてコードするゲノミックＤＮＡはｃＤＮＡで置換された。ヒトガンマ－１定常領域についてコードするｃＤＮＡを、ＰＣＲによりヒトガンマ－１抗体を分泌したヒト細胞系統からクローニングした。発現ベクターへのサブクローニングを適切なものとするため、ｃＤＮＡの各末端にＢａｍＨＩ部位を作成した。

【０１０９】

さらに、ｃＤＮＡ配列の５′末端で、スプライス受容体部位及び６５ｂｐ介在配列を生成した。ヒトガンマ－１ｃＤＮＡスプライス受容体部位及び介在配列を含むＢａｍＨＩフラグメント（１１７６ｂｐ）を、既存の重鎖ベクターの中でＢａｍＨＩフラグメント（約２．０ｋｂ）と置換させた（上述のＭａｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．，）。その後、ヒトガンマ－１定常領域の３′－側までのＢａｍＨＩ部位をクレノウポリメラーゼで除去した。

【０１１０】

２．発現ベクターのトランスフェクション

Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ装置（ＢｉｏＲａｄ）を用いて電気穿孔法によりＣｏｓ細胞内に発現ベクターを導入した。ＰＢＳ中の1×10^7細胞／ｍｌの０．８ｍｌのアリコートに対しＤＮＡ（各ベクター１０μｇずつ）を付加した。１９００ボルト、２５μＦのキャパシタンスでパルスを送り出した。大気温で１０分の回復期間の後、５％の熱不活性化されたガンマグロブリンを含まないウシ胎児血清を含有する８ｍｌのＤＭＥＭ（ＧＩＢＣＯ）に、電気穿孔を受けた細胞を付加した。７２時間のインキュベーションの後、培地を収集し、遠心分離して細胞細片を除去し、短期間の場合は４℃で又長期間の場合は－２０℃で無菌条件下で保存した。

【０１１１】

３．ヒト化抗体の精製

Ｃｏｓ細胞トランスフェクションからの上清をプールし、不動化したプロテインＡ上で精製した（Ｉｍｍｕｎｏ　Ｐｕｒｅ　ＩｇＧ精製キット、Ｐｉｅｒｃｅ）。上清を０．２２μｍのフィルターを通してのろ過によって殺菌した。同量のＩｍｍｕｎｏ　Ｐｕｒｅ　ＩｇＧ結合緩衝液（ｐＨ　８．０）と混合した後、１ｍｌのプロテインＡカラムに対して希釈した標本を加え、完全にゲル内へ流れ込ませた。１５ｍｌのＩｍｍｕｎｏ　Ｐｕｒｅ　ＩｇＧ結合緩衝液で洗浄した後、５ｍｌのＩｍｍｕｎｏ　Ｐｕｒｅ　ＩｇＧ溶出緩衝液（ｐＨ　２．８）で結合した抗体を溶出させ、１ｍｌの分画を収集した。第１及び第２の分画のｐＨは約８．０であった。第３の分画のｐＨを、Ｉｍｍｕｎｏ　Ｐｕｒｅ結合緩衝液１００μｌを添加することによって生理的ｐＨに調整させた。その後、各分画内に存在するヒトＩｇＧ抗体の量を決定するためＥＬＩＳＡにより、プロテインＡで精製された抗体を含む５つの１ｍｌ分画を検定した。ヤギアルカリ性リン酸接合抗ヒトＩｇＧ（全分子、Ｓｉｇｍａ）を用いて、抗体を検出した。

【０１１２】

４．結合親和力の測定

α４β１インテグリンに対する再構成ヒト２１．６抗体の結合を、マウス及びキメラ抗体と比較してＥＬＩＳＡによって検定した。簡単に言うと、細胞表面上でα４β１インテグリンを発現するべく形質転換されたＬ細胞を平板固定し、９６ウェルの組織培養プレート内にて集密性に至るまで成長させた。テストすべき標本（粗製上清又はプロテインＡで精製されたもの）を連続希釈し、各ウェルに添加した。１時間氷上でインキュベートし非常に穏やかに洗浄した後、ヤギ抗マウス又は抗－ヒト（ガンマ鎖特異的）ペルオキシダーゼ接合体（Ｓｉｇｍａ）を添加した。さらに氷上で１時間インキュベートし非常に穏やかに洗浄した後、基質（ｏ－フェニレンジアミンジヒドロクロリド、シグマ）を添加した。

【０１１３】

室温で３０分間インキュベートした後、１ＭのH_2SO_4を添加することによって反応を停止させ、A_{490}を測定した。再構成ヒト２１．６重鎖のバージョンＨａと組合せた形で再構成ヒト２１．６軽鎖の２つのバージョン（Ｌａ及びＬｂ）の粗製上清を分析した結果、再構成ヒト２１．６V_L領域のＬａバージョンがバージョンＬｂよりもわずかに優れた抗原に対する結合を提供することがわかった。従ってその後の実験では、Ｌａバージョンが用いられた。

【０１１４】

ヒト化２１．６軽鎖のバージョンＬａと組合わせた形でのヒト化２１．６重鎖（Ｈａ及びＨｂ）の粗製上清の分析の結果、再構成ヒトV_H領域の２つのバージョン（Ｈａ及びＨｂ）の間には著しい差が全くないことがわかった。バージョンＨａは、ヒトＨｂにおける６つの変更と比べてヒトＦＲ内に５つしか変更を含んでいないことから、さらなる実験で使用するべく選択された。

【０１１５】

図１２は、キメラ２１．６抗体と、ヒト化２１．６抗体（Ｌａ＋Ｈａ）の結合を比較している。データは、再構成ヒト２１．６抗体（Ｌａ＋Ｈａ）が、キメラ２１．６抗体と同じ位、そして恐らくはそれよりもわずかに良く、抗原に結合したということを表わしている。キメラ２１．６抗体は、無傷のマウス２１．６可変領域を含んでいることから、その抗原結合特性においてマウス２１．６抗体と等価であると予想される。再構成ヒト２１．６抗体（Ｌａ＋Ｈａ）は同様に、もとのマウス２１．６抗体及びキメラ抗体に比較できる効率でヒトα４β１インテグリンに対する結合を遮断することが示されてきた。

【０１１６】

従って、再構成ヒト２１．６抗体（Ｌａ＋Ｈａ）がマウス抗体のものと本質的に等しい特異的結合親和力を有するという結論が下される。さらに、ヒト可変領域内のマウス２１．６抗体の抗原結合部位を再度作成するのにヒトＦＲ内のわずかな修正しか必要でなかったことから、再構成ヒト２１．６抗体は、真正のヒト抗体のように挙動すると予測される

。
再構成ヒト２１．６ＶＬ領域のバージョンＬａと再構成ヒト２１．６ＶＨ領域のバージョンＨｃを含有する再構成ヒト２１．６抗体は同様に、キメラ２１．６抗体と並行して表面上でヒトα４β１インテグリンを発現するＬ細胞に対する結合についてもテストされた。結果は、再構成ヒト２１．６抗体（Ｌａ＋Ｈｃ）が抗原に対しうまく結合することを示している。V_H領域のＣＤＲ３内の変性は、抗原に対する結合を損なわなかった。実際、ＣＤＲ３内の変性が抗原に対する結合をわずかに改善したかもしれないという兆候が幾分か存在している（図１２）。この改善は、機能的遮断検定においてさらに顕著であるかもしれないということが考えられる。

【０１１７】

（例８：Ｍｕ２１．６抗体の特性の遮断）

Ｌ２５と呼ばれるα_4インテグリンに対するもう１つの抗体と、Ｍｕ２１．６を比較した。Ｌ２５はＢｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎから市販されており、文献中で$\alpha_4\beta_1$インテグリン付着機能の優れた阻害物質であることが報告されている。図１３（図版Ａ）に示されているように、Ｍｕ２１．６及びＬ２５は両方共、Mn^{+2}の不在下での精製されたＶＣＡＭ－１に対するヒト単球細胞のα４β１インテグリン依存性付着を完全に阻害した。しかしながら、Mn^{+2}（１ｍＭ）（α４β１インテグリンのいくつかの活性化物質の１つ）の存在下では、Ｌ２５はもはや有効な阻害物質ではなかった。α４β１インテグリンがその他の刺激によって活性化された時にも、類似の結果が観察された。活性化されたα４β１インテグリンを遮断する能力は、多発性硬化性といった炎症性疾患を治療する上で貴重であると思われる。

【０１１８】

ｍｕ２１．６とＬ２５の間のさらなる比較として、増大する量のＶＣＡＭ－１に対するヒトＴ細胞付着を阻害する抗体の能力を決定した。この実験では、増大する量のＶＣＡＭ－１が９６ウェルの検定プレートのプラスチックプレート上にコーティングされ、ヒトＴ細胞系統ジャーカット（これは高レベルの$\alpha_4\beta_1$インテグリンを発現する）のコーティングされたウェルに対する結合能力が測定された。Ｙ軸上の値は、ウェルを４回洗浄した後結合した状態にとどまった各ウェルに当初添加されたジャーカット細胞の百分率を表わしている（図１３（図版Ｂ））。

【０１１９】

この実験は、低レベルのＶＣＡＭ－１と遭遇したときＬ２５は細胞付着の優れた阻害物質であるが、より高いＶＣＡＭ－１レベルでは完全に効力を失う、ということを立証している。一方Ｍｕ２１．６は、存在するＶＣＡＭ－１の量の如何にかかわらず、細胞付着を完全に阻害する。高いＶＣＡＭ－１濃度での遮断能力は、炎症部位におけるＶＣＡＭ－１のアップレギュレーションのため、治療的利用分野にとっては望ましいものである。

【０１２０】

（例９：動物モデルにおけるヒト化２１．６抗体の効力）

この例は、ヒトの多発性硬化症をシミュレートする動物モデルにおけるＥＡＥの予防的及び治療的処置におけるヒト化２１．６抗体の効力を立証している。

（ａ）方法

（１）ＥＡＥの誘発

CO_2麻酔により安楽死させた５匹のモルモットの各々から脳と脊髄を取り出した。組織は、秤量してＰＢＳ１ｍｌにつき１グラムの組織という濃度で均質化されるまで、氷上でＰＢＳ内に保っておいた。電動式ハンディタイプのホモジナイザーを用いて組織を完全に均質化させ、その後同量のフロイント完全アジュバント（ＦＣＡ）と混合した。１０ｍｌのフロイント不完全アジュバント（Ｓｉｇｍａ，Ｆ－５５０６）に対し１００ｍｇのｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ　Ｈ３７ＲＡ（ＤＩＦＣＯ，３１１４－３３－８）を添加することによりＦＣＡを作った。２方ストップコックによって連結された２本の注射器の間に溶液を通過させることによってマヨネーズのコンシステンシーになるまで混合物を乳化させた。各々のモルモットを、３つの投与部位の間で分割した

６００μｌのエマルジョンで免疫化した。

【０１２１】

（２）病気の症状についての動物の評点

病気の症状は各動物を歩くよう促し、次のような一般的に受入れられている基準により動物に１つの評点を割り当てることによって査定した：

０　病気無し

１　後脚衰弱

２　後脚完全麻痺

３　後脚完全麻痺及び前脚部分的麻痺

４　瀕死又は死亡

（３）血清及び組織の収集

メトキシフルランで麻酔したモルモットから、心臓穿刺により標本を収集した。約３００～４００μｌの血液を収集し、マイクロティナー血清分離器の中に入れて、室温で２０～３０分間凝固させた。次に室温で５分間、管を回転させた。エッペンドルフ管の中に血清を引き出し、螢光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）により抗体力価をひき続き分析するため－２０℃で保存した。

【０１２２】

血液学的分析のため、血液をエチレンジアミン四酢酸でコーティングされたマイクロティナー管の中に収集した。アクリジンでコーティングしたヘマトクリット管の中に１００μｌのアリコートを吸引した。管にフタをし、１５分間管を穏やかに逆転させることにより、アクリジンオレンジと血液を混合した。ヘマトクリット管内にフロートを入れ、５分間標本を遠心分離した。定量軟膜分析用に設計された、予め較正済みのＩｄｅｘｘ　ＱＢｃ　Ｖｅｔ自動読取り装置の中に、ヘマトクリット管を入れた。ウマ較正システム下で値を読み取り、予め定められた換算率を用いて、モルモット当量に調整した。

【０１２３】

実験の終りで、CO_2麻酔によりモルモットを屠殺し、脳と脊髄を取り出した。全てのモルモットからの脳及び脊髄の半分を、ドライアイス上の２メチルブタン内で急速凍結させた（－２０～－４０℃）。この組織を切断し、色原体としてのジアミノベンチジン及びアピジン連鎖ペルオキシダーゼ検定（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）を用いてパンマクロファージマーカー（Ｓｅｒｏｔｅｃ　ＭＣＡ－５１８）及びＴ－リンパ球マーカー（Ｓｅｒｏｔｅｃ　ＭＣＡ－７５１）で免疫染色した。以下の評点システムに従って、細胞浸潤について組織を評点した：

０　浸潤細胞無し。

０．５　染色はほとんどない。人工的であるかもしれない。通常は血管と結びついている。

１　通常は血管の近くにある、わずかな細胞（１５個未満）の染色。

２　通常は１本の血管から外へ放射している多くの細胞（２０～５０）の染色。

３　組織全体を通して散乱した多くの細胞（＞５０）の染色。カフのついた（ｃｕｆｆｅｄ）多くの血管。

（ｂ）予防的処置

この実験は、臨床的症状の開始を遅らせる上でのヒト化２１．６抗体の効力を評価するように設計された。前のデータにより、ＥＡＥモルモットの脳及び脊髄の中への白血球の内向きフラックスが標準的に７日目と８日目の間で始まるということが立証された。マウスとヒト化２１．６抗体を比較するため、抗体各々を等しい用量（３．０，０．３０及び０．０３ｍｇ／ｋｇ）で投与した。予備薬物速度論研究により、マウス２１．６抗体の飽和血液レベルが皮下投与から２４時間以内に達成され、最高４８時間高い状態にとどまるということが明らかになった。

【０１２４】

１１日目に、抗体の第２の用量から２４時間後に、各グループ内の無作為に選択した３匹の動物から血液標本を採取した。各々の処置グループについて、各々のモルモットが１

の臨床的評点に達する日数の平均を計算した（表７）。この実験におけるＰＢＳ処置されたグループの平均値は、免疫化の１１日後であった（これは前の結果に典型的なものである）。ヒト化抗体及びマウス抗体の最高用量での処置は、それぞれ４．６日（ｐ＝０．０００）及び３日（ｐ＝０．００７）の著しい疾病遅延という結果をもたらした。抗体のさらに低い用量では、疾病の経過に対する効果は全くなかった。

【０１２５】

【表７】

表　7

１という臨床的評点に達するまでの免疫化後の時間に対するマウス又はヒト化21.6抗体の効果

グループ	1	2	3	4	5	6	7
mg／kg	0.03M #	3.0H @	3.0H	3.0M	0.03H	PBS	0.3M
	8	9	13	10	8	9	9
	9	10	15	12	10	9	9
	9	10	15	14	10	11	11
	9	11	16	14	11	11	12
	11	11	16	14	12	11	12
	12	11	16	15	12	12	13
	12	12	17	15	12	12	13
		13	17	18	12	13	
平均 ± SD	10.0 ± 1.6	10.9 ± 1.2	**15.6 ± 1.3	*14.0 ± 2.3	10.9 ± 1.5	11.0 ± 1.4	11.6 ± 1.4

@ Ｈはヒト化抗体を、# Ｍはマウスを示す。 PBSに比較して

**ｐ＝0.000 及び *ｐ＝0.007 。

【０１２６】

モルモットの日々の体重は、ヒト化及びマウス抗体の高い用量の類似した効果を反映していた（図１４）。これらの処置グループ内の動物は、着実に体重を増やしていった。その他の全ての処置グループ内のモルモットは、病気の発症の日の直前から体重を減らし始めた。

【０１２７】

１１日目に、２回目の処置からおよそ２４時間後に心臓穿刺により各グループから無作為に選択した３匹の動物において、抗体の血清力価を測定した。ヒト化抗体及びマウス抗体の両方の最高用量が注射された全ての動物の循環中に約２０μｇ／ｍｌの血清抗体が存在していた。この濃度は、インビトロでＶＬＡ－４部位を飽和させるのに必要とされる２１．６抗体の濃度と同じ規模のものである。これとは対照的に、その他全てのグループからの動物は、検出可能な血清抗体をほとんど乃至は全く有していなかった。

（ｃ）進行中の病気の逆転

約６０匹のモルモットを免疫化し、ＥＡＥの臨床的症状を発生させた。１３日目に、１という臨床的評点に達した全てのモルモットを無作為に処置グループに割当てた。図１５は、３ｍｇ／ｋｇのヒト化抗体での処置を受けた動物が、処置から４８時間以内に後脚機

能を回復し始めたことを示している。第２の用量から１日後及び２日後である１７日目及び１８日目で、８匹の動物全てが病気から治癒していた。各々の処置グループについての曲線値の下の部域のＡＮＯＶＡは、３ｍｇ／ｋｇのヒト化抗体で処置されたグループの値のみがＰＢＳ対照グループ（ｐ＝０．０４２）よりも統計的に低いものであることを明らかにした。これらの動物は、１９日目に実験が終了するまで、第１回の投与後２４時間以内で漸進的に体重を増やしていった（図１６）。

【０１２８】

最初の注射（１４日目）から２４時間後と屠殺時点（１９日目）で採取された試料についてのＦＡＣＳ分析によって抗体血清力価を測定した。

【０１２９】

マウス２１．６抗体での処置は、ヒト化２１．６抗体での処置に比べわずかに低い血清抗体力価を結果としてもたらした（９．１対１２．６μｇ／ｍｌ）。この差は、２回目の投与から3日目後である１９日目にはさらに大きくなり、この時点で、１９日目のヒト化抗体のレベルは飽和以下まで低下したもののなおも測定可能であった（６．１μｇ／ｍｌ）のに対し、検出可能な血清マウス抗体はきわめてわずかしかなかった。これらのデータは、抗体の血漿レベルと生理学的効力の間の相関関係を実証しており、有効な循環する抗体のレベルがモルモットにおいて１０～２０μｇ／ｍｌの範囲内にあることを示唆している。

【０１３０】

脳及び脊髄内への白血球の浸潤を、９日目に屠殺した動物からの組織内で評価した。表８は、抗体処置の関数として浸潤度の有意な差を示している。脳及び脊髄内へのＴ細胞の浸潤及び脊髄内へのマクロファージの浸潤は、３ｍｇ／ｋｇでの処置後に有意なものであった。それ以下の用量は浸潤を低下させる傾向をもっていたが、有意性に達しはしなかった。いかなる用量においても、脊髄内へのマクロファージの細胞浸潤物には有意な差は全くなかった。マクロファージを評価するために使用された免疫組織化学技術は、常在性細胞と侵入細胞を識別しないことから、マクロファージに対する効果の欠如は、常在性マクロファージ及び小グリア細胞の持続的存在を表わしていると思われる。

【０１３１】

病気の定着後の抗体投与による脳組織内のＴ細胞及び単球の減少は、細胞の移動が累積的プロセスでなく、ＣＮＳ組織内外への細胞の動的運動であることを示唆している。重要なことに、データは、実質組織内への白血球の進入の中断により、ＣＮＳが侵入する病的要素から脱却できることになるということを示唆している。

【０１３２】

【表８】

表　8

129日目の脳及び脊髄内へのＴ細胞及びマクロファージ浸潤の有意な差異

	脳		脊　髄	
PBSグループ	Ｔ細胞	マクロファージ	Ｔ細胞	マクロファージ
3 mg／kg @ H	p＝0.001	p＝0.005	p＝0.007	NS
3 mg／kg # M	p＝0.001	p＝0.005	p＝0.008	NS
1 mg／kg H	NS	NS	NS	NS
0.3mg／kg H	NS	NS	NS	NS

NS＝有意性なし。

【０１３３】

血液学データは、マウス又はヒト化２１．６抗体での処置が全白血球計数値、単核細胞及び顆粒球の数又は赤血球計数値の差を全くもたらさないことを明らかにした。高用量のマウス又はヒト化抗体は、ＰＢＳ処置された動物に比較して血小板計数値の著しい増大を結果としてもたらした（表９）。正常なモルモットでは、血小板計数値は７５５±１０３細胞／ｍｌで、これはＰＢＳ処置されたＥＡＥ動物のものの約２倍である。かくして、病気を有効に逆転させたマウス及びヒト化抗体の用量での処置は、血小板計数値をも正常まで回復させた。

【０１３４】

【表９】

表　9

EAE動物の血小板計数値に対する抗体の効果

処　　置	血小板×10^{-6}細胞／ML
++非 EAEモルモット	755±103　(9)
PBS	373.7±167.5(7)
3 mg／kg @ H	622.2±97.0 (6)**
3 mg／kg * M	587.5±57.8 (6)
1 mg／kg H	578.3±123.2(6)
0.3mg／kg H	492.5±168.6(6)

++ 非 EAEモルモットにおける血小板計数値は、別の実験にて決定された。

* ｐ＝0.05対PBS

【０１３５】

結論としては、ヒト化及びマウス２１．６抗体は両方共、ヒトにおける多発性硬化症を

シミュレートする動物モデルにおいて、臨床的症状を遅延及び逆転させるのに有効である。ヒト化抗体は、症状を逆転させる上で同用量のマウス抗体よりもさらに有効である。

【０１３６】

上述の発明は、理解を明確にするため詳細に記述されてきたが、添付クレームの範囲内でいくつかの修正を加えることもできるということは明白である。以上に引用した全ての刊行物及び特許文書は、その各々が個別に示された場合と同じレベルで全ての目的のためにその全体が参考として本書に内含されるものである。

【０１３７】

【表１０】

表 4

再成形ヒト21.6軽鎖可変領域の設計に導くアミノ酸配列のアラインメント

Kabat	#	FR or CDR	マウス 21.6	マウス カッパ 5(配列番号42)	ヒト カッパ 1(配列番号43)	ヒト REI	RH V_L 21.6	コメント
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2		I	I	I	I	I*	
3	3		Q	Q	Q	Q	Q	
4	4		M	M	M	M	M	
5	5		T	T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	P	
9	9		S	S	S	S	S	
10	10		S	S	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	L	
12	12		S	S	S	S	S	
13	13		A	A	A	A	A	
14	14		S	S	S	S	S	
15	15		L	L	V	V	V	
16	16		G	G	G	G	G	
17	17		G	D	D	D	D	
18	18		K	R	R	R	R	
19	19		V	V	V	V	V	
20	20		T	T	T	T	T	
21	21		I	I	I	I	I	

【０１３８】

【表１１】

22	22		T	T	T	T	T	
23	23	FR1	C	C	C	C	C	
24	24	CDR1	K	R	R	Q	K	
25	25		T	A	A	A	T*	
26	26		S	S	S	S	S*	
27	27		Q	Q	Q	Q	Q*	
27A			−	D	S	−	−	
27B			−	−	L	−	−	
27C			−	−	V	−	−	
27D			−	−	X	−	−	
27E			−	−	X	−	−	
27F			−	−	−	−	−	
28	28		D	D	S	D	D*	
29	29		I	I	I	I	I*	
30	30		N	S	S	I	N*	
31	31		K	N	N	K	K*	
32	32		Y	Y	Y	Y	Y*	
33	33		M	L	L	L	M*	
34	34	CDR1	A	N	A	N	A	
35	35	FR2	W	W	W	W	W	
36	36		Y	Y	Y	Y	Y	
37	37		Q	Q	Q	Q	Q	
38	38		H	Q	Q	Q	Q	
39	39		K	K	K	T	T	CAMPATH-1H内のK
40	40		P	P	P	P	P	

【０１３９】

【表１２】

41	41		G	G	G	G	G	
42	42		K	G	K	K	K	
43	43		R	S	A	A	A	その他のバージョンでのRを考慮すること
44	44		P	P	P	P	P	
45	45		R	K	K	K	R	L2 ループを支持、その他のバージョンでのKを考慮すること
46	46		L	L	L	L	L	
47	47		L	L	L	L	L	
48	48		I	I	I	I	I*	
49	49	FR2	H	Y	Y	Y	H	抗原と作用する可能性のある、結合部位の中央において、その他のバージョンでのYを考慮すること
50	50	CDR2	Y	Y	A	E	Y*	
51	51		T	A	A	A	T*	
52	52		S	S	S	S	S*	
53	53		A	R	S	N	A	
54	54		L	L	L	L	L	
55	55		Q	H	E	Q	Q	
56	56	CDR2	P	S	S	A	P	
57	57	FR3	G	G	G	G	G	
58	58		I	V	V	V	I	L2を支持しているかもしれない、その他のバージョンでのVを考慮すること

【０１４０】

【表１３】

59	59		P	P	P	P	P	
60	60		S	S	S	S	S	
61	61		R	R	R	R	R	
62	62		F	F	F	F	F	
63	63		S	S	S	S	S	
64	64		G	G	G	G	G*	
65	65		S	S	S	S	S	
66	66		G	G	G	G	G	
67	67		S	S	S	S	S	
68	68		G	G	G	G	G	
69	69		R	T	T	T	R	結合部位近くの表面上で、L1に隣接
70	70		D	D	D	D	D	
71	71		Y	Y	F	Y	Y*	CAMPATH-1H内のF
72	72		S	S	T	T	T	
73	73		F	L	L	F	F	
74	74		N	T	T	T	T	
75	75		I	I	I	I	I	
76	76		S	S	S	S	S	
77	77		N	N	S	S	S	
78	78		L	L	L	L	L	
79	79		E	E	Q	Q	Q	
80	80		P	Q	P	P	P	
81	81		E	E	E	E	E	
82	82		D	D	D	D	D	
83	83		I	I	F	I	I	

【０１４１】

【表１４】

84	84		A	A	A	A	A	
85	85		T	T	T	T	T	
86	86		Y	Y	Y	Y	Y	
87	87		Y	F	Y	Y	Y	
88	88	FR3	C	C	C	C	C	
89	89	CDR3	L	Q	Q	Q	L	
90	90		Q	Q	Q	Q	Q*	
91	91		Y	G	Y	Y	Y*	
92	92		D	N	N	Q	D*	
93	93		N	T	S	S	N*	
94	94		L	L	L	L	L*	
95			–	P	P	P	–	
95A			–	P	E	–	–	
95B			–	–	–	–	–	
95C			–	–	–	–	–	
95D			–	–	–	–	–	
95E			–	–	–	–	–	
95F			–	–	–	–	–	
96	95		W	R	W	Y	W*	
97	96	CDR3	T	T	T	T	T	
98	97	FR4	F	F	F	F	F	
99	98		G	G	G	G	G	
100	99		G	G	Q	Q	Q	
101	100		G	G	G	G	G	
102	101		T	T	T	T	T	

【０１４２】

【表１５】

103	102		K	K	K	K	K	
104	103		L	L	V	L	V	CAMPATH-1Hの場合と同様
105	104		E	E	E	Q	E	CAMPATH-1Hの場合と同様
106	105		I	I	I	I	I	
106A			–	–	–	–	–	
107	106	FR4	K	K	K	T	K	CAMPATH-1Hの場合と同様

【０１４３】

凡例：（Ｋａｂａｔ）上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，に従った番号付け；（＃）分子モデリング内で使用されている通りの通し番号，（マウス２１．６）マウス２１．６抗体からのV_L領域のアミノ酸配列；（マウスカッパ５）サブグループ５からのマウスカッパV_L領域のコンセンサス配列（上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，）；（ヒトカッパ１）サブグループ１からのヒトV_L領域のコンセンサス配列（上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．）；（ヒトＲＥＩ）ヒトV_L領域のアミノ酸配列（上述のＰａｌｍ　ｅｔ　ａｌ．（１９７５））；（ＲＨ　V_L２１．６）再成形ヒト２１．６V_L領域のバージョンＬ１のアミノ酸配列；（*）ＣＤＲループのための正準構造の１部である残基（上述のＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．）；（下線部分）アミノ酸残基が変更されたヒトＦＲ内の残基。

【０１４４】

【表１６】

表 5

再成形ヒト21.6重鎖可変領域の設計に導くアミノ酸配列のアラインメント

Kabat	#	FR又は CDR	マウス 21.6	マウス 2c (配列番号44)	ヒト1 (配列番号45)	ヒト 21／28' CL	RH V_H 21.6	コメント
1	1	FR1	E	E	Q	Q	Q	
2	2		V	V	V	V	V	
3	3		Q	Q	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L	L	L	
5	5		Q	Q	V	V	V	
6	6		Q	Q	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	G	
9	9		A	A	A	A	A	
10	10		E	E	E	E	E	
11	11		L	L	V	V	V	
12	12		V	V	K	K	K	
13	13		K	K	K	K	K	
14	14		P	P	P	P	P	
15	15		G	G	G	G	G	
16	16		A	A	A	A	A	
17	17		S	S	S	S	S	
18	18		V	V	V	V	V	
19	19		K	K	K	K	K	
20	20		L	L	V	V	V	
21	21		S	S	S	S	S	

【０１４５】

【表１７】

22	22		C	C	C	C	C	
23	23		T	T	K	K	K	
24	24		A	A	A	A	A	
25	25		S	S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	G*	
27	27		F	F	Y	Y	F*	H1正準構造、その他のバージョンでのYを考慮すること
28	28		N	N	T	T	N*	表面上のH1正準構造
29	29		I	I	F	F	I*	H1正準構造、その他のバージョンでのFを考慮すること
30	30	FR1	K	K	T	T	K*	表面上の正準構造
31	31	CDR1	D	D	S	S	D*	
32	32		T	T	Y	Y	T*	
33	33		Y	Y	A	A	Y	
34	34		I	M	I	M	I*	
35	35		H	H	S	H	H	
35A			−	−	−	−	−	
35B		CDR1	−	−	−	−	−	
36	36	FR2	C	W	W	W	W	埋没残基、Cのための明白な特別な役割はない
37	37		V	V	V	V	V	
38	38		K	K	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q	Q	Q	

【０１４６】

【表１８】

40	40		R	R	A	A	A	
41	41		P	P	P	P	P	
42	42		E	E	G	G	G	
43	43		Q	Q	Q	Q	Q	
44	44		G	G	G	R	R	$V_L - V_H$ パッキング、その他のバージョンでのGを考慮すること
45	45		L	L	L	L	L	
46	46		E	E	E	E	E	
47	47		W	W	W	W	W	
48	48		I	I	M	M	M	
49	49	FR2	G	G	G	G	G	
50	50	CDR2	R	R	W	W	R	
51	51		I	I	I	I	I	
52	52		D	D	N	N	D	
52A	53		P	P	P	A	P*	
52B			−	−	Y	−	−	
52C			−	−	−	−	−	
53	54		A	A	G	G	A*	
54	55		N	N	N	N	N*	
55	56		G	G	G	G	G*	
56	57		Y	N	D	N	Y	
57	58		T	T	T	T	T	
58	59		K	K	N	K	K	
59	60		Y	Y	Y	Y	Y	

【０１４７】

【表１９】

60	61		D	D	A	S	D	
61	62		P	P	Q	Q	P	
62	63		K	K	K	K	K	
63	64		F	F	F	F	F	
64	65		Q	Q	Q	Q	Q	
65	66	CDR2	G	G	G	G	G	
66	67	FR3	K	K	R	R	R	
67	68		A	A	V	V	V	
68	69		T	T	T	T	T	
69	70		I	I	I	I	I	
70	71		T	T	T	T	T	
71	72		A	A	A	R	A*	H2を支持するH2正準構造
72	73		D	D	D	D	D	
73	74		T	T	T	T	T	
74	75		S	S	S	S	S	
75	76		S	S	T	A	A	
76	77		N	N	S	S	S	
77	78		T	T	T	T	T	
78	70		A	A	A	A	A	
79	80		Y	Y	Y	Y	Y	
80	81		L	L	M	M	M	
81	82		Q	Q	E	E	E	
82	83		L	L	L	L	L	
82A	84		S	S	S	S	S	
82B	85		S	S	S	S	S	

【０１４８】

【表２０】

82C	86		L	L	L	L	L	
83	87		T	T	R	R	R	
84	88		S	S	S	S	S	
85	89		E	E	E	E	E	
86	90		D	D	D	D	D	
87	91		T	T	T	T	T	
88	92		A	A	A	A	A	
89	93		V	V	V	V	V	
90	94		Y	Y	Y	Y	Y	
91	95		F	Y	Y	Y	Y	
92	96		C	C	C	C	C	
93	97		A	A	A	A	A	
94	98	FR3	R	R	R	R	R*	
95	99	CDR3	E	G	A	G	E	
96	100		G	Y	P	G	G	
97	101		Y	Y	G	Y	Y	
98	102		Y	Y	Y	Y	Y	
99	103		G	Y	G	G	G	
100	104		N	D	S	S	N	
100A	105		Y	S	G	G	Y	
100B	106		G	X	G	S	G	
100C	107		V	V	G	−	V	
100D	108		Y	G	C	−	Y	
100E	109		A	Y	Y	−	A	
100F	110		M	Y	R	−	M	

【０１４９】

【表２１】

100G			－	A	G	－	－	
100H			－	M	D	－	－	
100I			－	－	Y	－	－	
100J			－	－	X	－	－	
100K			－	－	F	－	－	
101	111		D	D	D	N	D	
102	112	CDR3	Y	Y	Y	Y	Y	
103	113	FR4	W	W	W	W	W	
104	114		G	G	G	G	G	
105	115		Q	Q	Q	Q	Q	
106	116		G	G	G	G	G	
107	117		T	T	T	T	T	
108	118		S	X	L	L	L	
109	119		V	V	V	V	V	
110	120		T	T	T	T	T	
111	121		V	V	V	V	V	
112	122		S	S	S	S	S	
113	123	FR4	S	S	S	S	S	

【０１５０】

凡例：（Ｋａｂａｔ）上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，に従った番号付け；（＃）分子モデリング内で使用されている通りの通し番号；（マウス２１．６）マウス２１．６抗体からのV_H領域のアミノ酸配列；（マウス２ｃ）サブグループ２ｃからのマウスV_H領域のコンセンサス配列（上述のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，）；（ヒト２１／２８'ＣＬ）ヒトV_H領域のアミノ酸配列（上述のＤｅｒｓｉｍｏｎｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７））；（ＲＨ　V_H　２１．６）再構成ヒト２１．６V_H領域のバージョンＨ１のアミノ酸配列；（*）　ＣＤＲループのための正準構造の一部である残基（上述のＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．）；（下線部分）アミノ酸残基が変更されたヒトＦＲ内の残基。

【産業上の利用可能性】

【０１５１】

ＶＬＡ－４リガンドに対して特異的に結合するヒト化免疫グロブリンが提供される。このヒト化免疫グロブリンは、多発性硬化症の治療のために特に有用である。

【図面の簡単な説明】

【０１５２】

【図１－１】マウス２１．６軽鎖可変領域のＤＮＡ（配列番号１）及びアミノ酸（配列番号２）配列を示す図である。

【図１－２】マウス２１．６軽鎖可変領域のＤＮＡ（配列番号１）及びアミノ酸（配列番号２）配列を示す図である。

【図２－１】マウス２１．６重鎖可変領域のＤＮＡ（配列番号３）及びアミノ酸（配列番

号４）配列を示す図である。
【図２－２】マウス２１．６重鎖可変領域のＤＮＡ（配列番号３）及びアミノ酸（配列番号４）配列を示す図である。
【図３】、哺乳動物細胞内でヒトカッパ軽鎖及びヒトガンマ－１重鎖を伴うキメラ及び再構成ヒト抗体を産生するために使用される軽鎖（Ａ）及び重鎖（Ｂ）発現ベクターを示す図である。
【図４】表面上でヒトα４β１インテグリンを発現するＬ細胞に結合するキメラ及びマウス２１．６抗体のＥＬＩＳＡ比較を示す図である。
【図５】マウス２１．６抗体の可変領域の分子モデルを示す図である。特に有利な残基が標識付けされている。
【図６】マウス及び再構成ヒト２１．６（配列番号５）軽鎖可変領域のアミノ酸配列の比較を示す図である。ＣＤＲループ構造のためのＣｈｏｔｈｉａ正準配列の一部であるアミノ酸残基は星印でマークされている。ＲＥＩ（配列番号６）は、ヒトＲＥＩ軽鎖のV_L領域からのＦＲ及びＣＤＲを示す。Ｌａ（配列番号７）及びＬｂ（配列番号８）は、再構成されたヒト２１．６V_L領域の２つのバージョンである。ＲＥＩ配列内のものとは異なるＬａのＦＲ内の残基には下線がほどこされている。Ｌｂ内では、ＲＥＩのものと異なるフレームワーク構造領域内の残基のみが示されている。
【図７】マウス及び再構成ヒト２１．６（配列番号９）重鎖可変領域のアミノ酸配列の比較を示す図である。Ｃｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲループ構造のための正準配列の一部であるアミノ酸残基には星印がついている。２＊ＣＬ（配列番号１０）は、ヒト２１／２８′ＣＬ抗体のＶＨ領域からのＦＲ及びＣＤＲを示す。Ｈａ（配列番号１１）、Ｈｂ（配列番号１２）及びＨｃ（配列番号１３）は、再構成ヒト２１．６V_H領域の３つのバージョンである。２１／２８′ＣＬ配列内のものと異なるＨａのＦＲ内の残基には下線が施されている。Ｈｂ及びＨｃにおいては、２１／２８′ＣＬのものとは異なるフレームワーク構造領域内の残基のみが示されている。
【図８】再構成ヒト２１．６軽鎖可変領域のバージョン「ａ」のＰＣＲに基づく構築を示す図である。破線は、プライマの間の少なくとも２１個の塩基の相補的配列を表わす。
【図９】再構成ヒト２１．６重鎖可変領域のバージョン「ａ」のＰＣＲに基づく構築を示す図である。
【図１０－１】再構成ヒト２１．６軽鎖可変領域の第１のバージョン（「ａ」）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列（配列番号：１４及び１５）を示す図である。
【図１０－２】再構成ヒト２１．６軽鎖可変領域の第１のバージョン（「ａ」）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列（配列番号：１４及び１５）を示す図である。
【図１１－１】再構成ヒト２１．６重鎖可変領域の第１のバージョン（「ａ」）のＤＮＡ及びアミノ酸配列（配列番号１６及び１７）を示す図である。
【図１１－２】再構成ヒト２１．６重鎖可変領域の第１のバージョン（「ａ」）のＤＮＡ及びアミノ酸配列（配列番号１６及び１７）を示す図である。
【図１２】表面上でヒトα４β１インテグリンを発現するＬ細胞に結合するキメラ及び再構成ヒト２１．６抗体のＥＬＩＳＡ比較を示す図である。
【図１３】異なる抗－ＶＬＡ－４抗体Ｌ２５とマウス２１．６抗体の比較を示す図である。図版Ａは、Mn^{2+}の存在下及び不在下での精製されたＶＣＡ－１に対するＵ９３７単球細胞の結合を遮断する抗体の能力を比較している。図版Ｂは、増大する濃度のＶＣＡＭ－１に対するジャーカット細胞の結合を遮断する抗体の能力を比較する。
【図１４】マウス又はヒト２１．６抗体で治療された動物における体重喪失の遅延を示す図である。
【図１５】マウス又はヒト２１．６抗体での治療を受けた動物における臨床的症状の逆転を示す図である。
【図１６】マウス又はヒト２１．６抗体での治療を受けた動物における体重喪失の逆転を示す図である。（配列表）
【０１５３】

【数１－１】

配　列　表

（２）配列番号：１の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：　483塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：二本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：cDNA

（ix）特　徴：

（Ａ）NAME／KEY　：　CDS

（Ｂ）位置：53..430

（xi）配列の記載：配列番号：１：

```
ATGAGGGCCC CTGCTCAGAT TTTTGGATTC TTGGTCAGGA GACGTTGTAG AA ATG          55
                                                          Met
                                                            1

AGA CCG TCT ATT CAG TTC CTG GGG CTC TTG TTG TTC TGG CTT CAT GGT        103
Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His Gly
              5                  10                  15

GCT CAG TGT GAC ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA        151
Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
         20                  25                  30

TCT CTG GGA GGC AAA GTC ACC ATC ACT TGC AAG ACA AGC CAA GAC ATT        199
Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp Ile
     35                  40                  45

AAC AAG TAT ATG GCT TGG TAC CAA CAC AAG CCT GGA AAA CGT CCT AGG        247
Asn Lys Tyr Met Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Arg Pro Arg
 50                  55                  60                  65

CTG CTC ATA CAT TAC ACA TCT GCA TTA CAG CCA GGC ATC CCA TCA AGG        295
Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg
                 70                  75                  80

TTC AGT GGA AGT GGG TCT GGG AGA GAT TAT TCC TTC AAC ATC AGC AAC        343
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Asn Ile Ser Asn
             85                  90                  95

CTG GAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT TAT TAT TGT CTA CAG TAT GAT AAT        391
Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn
        100                 105                 110
```

【０１５４】

【数１－２】

```
CTG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGGGCTGATG        440
Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
    115                 120                 125

CTGCACCAAC TGTATCCATC TTCCCACCAT CCACCCGGGA TCC                       483
```

（２）配列番号：２の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：126アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：２：

```
Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Trp Leu His
 1               5                  10                  15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp
        35                  40                  45

Ile Asn Lys Tyr Met Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Arg Pro
    50                  55                  60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Asn Ile Ser
                85                  90                  95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
            100                 105                 110

Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

（２）配列番号：３の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：470塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：二本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

【０１５５】

【数１－３】
（ii）分子の型：cDNA

（ix）特　徴：

（A）NAME／KEY：CDS

（B）位置：1..420

（xi）配列の記載：配列番号：3：

```
ATG AAA TGC AGC TGG GTC ATG TTC TTC CTG ATG GCA GTG GTT ACA GGG        48
Met Lys Cys Ser Trp Val Met Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
  1               5                  10                  15

GTC AAT TCA GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AAG        96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
             20                  25                  30

CCA GGG GCC TCA GTC AAG TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT       144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
         35                  40                  45

AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGT GTG AAG CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG       192
Lys Asp Thr Tyr Ile His Cys Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
     50                  55                  60

GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG AAT GGT TAT ACT AAA TAT GAC       240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp
 65                  70                  75                  80

CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATA ACA GCT GAC ACA TCC TCC AAC       288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
                 85                  90                  95

ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACT GCC GTC       336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

TAT TTC TGT GCT AGA GAG GGA TAT TAT GGT AAC TAC GGG GTC TAT GCT       384
Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala
        115                 120                 125

ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCCTCAGCCA            430
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
    130                 135                 140

AAACGACACC CCCATCTGTC TATCCACTGG CCCGGGATCC                           470
```

（2）配列番号：4の情報：

（i）配列の特徴：

（A）長さ　：140アミノ酸

（B）型　　：アミノ酸

（D）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

【０１５６】

【数１－４】
（xi）配列の記載：配列番号：４：

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

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
        35                  40                  45

Lys Asp Thr Tyr Ile His Cys Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp
65                  70                  75                  80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
                85                  90                  95

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala
        115                 120                 125

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
    130                 135                 140
```

（２）配列番号：５の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：106アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：５：

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

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
            20                  25                  30

Met Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Arg Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

【０１５７】

【数１－５】

```
Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Asn Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

（２）配列番号：６の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：107アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：６：

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
            100                 105
```

（２）配列番号：７の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：106アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

【０１５８】

【数１－６】
（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：７：

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
            20                  25                  30

Met Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

（２）配列番号：８の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：107アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：８：

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ala Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

【０１５９】

【数１－７】

```
Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr
            100                 105
```

（２）配列番号：９の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：123アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：９：

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala Met Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

（２）配列番号：10の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：119アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

【０１６０】

【数１－８】
（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：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

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
```

（２）配列番号：11の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：123アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：11：

```
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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
```

【０１６１】

【数１－９】

```
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala 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 Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala Met Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

（２）配列番号：12の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：119アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：12：

```
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 Phe Asn Ile Lys Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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 Ala 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
```

（２）配列番号：13の情報：

【０１６２】

【数１－１０】
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：119アミノ酸
（Ｂ）型　　：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：蛋白質
（xi）配列の記載：配列番号：13：

```
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 Phe Asn Ile Lys Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

（２）配列番号：14の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：406塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：二本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：cDNA
（ix）特　徴：
（Ａ）NAME／KEY：CDS
【０１６３】

【数１－１１】
（Ｂ）位置：16..393

（xi）配列の記載：配列番号：14：

```
AAGCTTGCCG CCACC ATG AGA CCG TCT ATT CAG TTC CTG GGG CTC TTG TTG        51
                 Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu
                   1               5                  10

TTC TGG CTT CAT GGT GCT CAG TGT GAC ATC CAG ATG ACA CAG TCT CCA        99
Phe Trp Leu His Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
          15                  20                  25

TCC TCA CTG TCT GCA TCT CTG GGA GGC AAA GTC ACC ATC ACT TGC AAG       147
Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys
     30                  35                  40

ACA AGC CAA GAC ATT AAC AAG TAT ATG GCT TGG TAC CAA CAC AAG CCT       195
Thr Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Met Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro
 45                  50                  55                  60

GGA AAA CGT CCT AGG CTG CTC ATA CAT TAC ACA TCT GCA TTA CAG CCA       243
Gly Lys Arg Pro Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro
                 65                  70                  75

GGC ATC CCA TCA AGG TTC AGT GGA AGT GGG TCT GGG AGA GAT TAT TCC       291
Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser
             80                  85                  90

TTC AAC ATC AGC AAC CTG GAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT TAT TAT TGT       339
Phe Asn Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
         95                  100                 105

CTA CAG TAT GAT AAT CTG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA       387
Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
    110                 115                 120

ATC AAA CGTGAGTGGA TCC                                                406
Ile Lys
125
```

（２）配列番号：15の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：126アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：15：

```
Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
  1               5                  10                  15
```

【０１６４】

【数１－１２】

```
Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp
        35                  40                  45

Ile Asn Lys Tyr Met Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Arg Pro
    50                  55                  60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Asn Ile Ser
                85                  90                  95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
            100                 105                 110

Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

（２）配列番号：16の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：　454塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：cDNA

（ix）特　徴：

（Ａ）NAME／KEY　：　CDS

（Ｂ）位置：16..441

（xi）配列の記載：配列番号：16：

```
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC        51
                 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala
                   1               5                  10

GTG GCT CCT GGG GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC        99
Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
        15                  20                  25

GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA GCT AGC       147
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
    30                  35                  40
```

【０１６５】

【数１－１３】

```
GGT TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCT       195
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 45                  50                  55                  60

GGC CAA AGG CTG GAG TGG ATG GGA AGG ATT GAT CCT GCG AAT GGT TAT       243
Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr
                 65                  70                  75

ACT AAA TAT GAC CCG AAG TTC CAG GGC CGG GTC ACC ATC ACC GCA GAC       291
Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
             80                  85                  90

ACC TCT GCC AGC ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG       339
Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
         95                  100                 105

GAC ACT GCA GTC TAC TAC TGC GCC AGA GAG GGA TAT TAT GGT AAC TAC       387
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr
    110                 115                 120

GGG GTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC CTT GTC ACC GTC       435
Gly Val Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
125                 130                 135                 140

TCC TCA GGTGAGTGGA TCC                                               454
Ser Ser
```

（２）配列番号：17の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：142アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：17：

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
  1               5                  10                  15

Ala 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 Ala Ser Gly Phe Asn Ile
         35                  40                  45

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
     50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp
 65                  70                  75                  80

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

【０１６６】

【数１－１４】

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala
        115                 120                 125

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

（２）配列番号：18の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：37塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：18：

CAGAAAGCTT GCCGCCACCA TGAGACCGTC TATTCAG　37

（２）配列番号：19の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：35塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：19：

CCGAGGATCC ACTCACGTTT GATTTCCAGC TTGGT　35

（２）配列番号：20の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：37塩基対

【０１６７】

【数１－１５】
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
（xi）配列の記載：配列番号：20：

CAGAAAGCTT GCCGCCACCA TGAAATGCAG CTGGGTC　37

（２）配列番号：21の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：33塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
（xi）配列の記載：配列番号：21：

CCGAGGATCC ACTCACCTGA GGAGACGGTG ACT　33

（２）配列番号：22の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：39塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
（xi）配列の記載：配列番号：22：

GATGGTGACT CTATCTCCTA CAGATGCAGA CAGTGAGGA　39

【０１６８】

【数１－１６】
（２）配列番号：23の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：32塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
（xi）配列の記載：配列番号：23：

CTGTAGGAGA TAGAGTCACC ATCACTTGCA AG　32

（２）配列番号：24の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：39塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
（xi）配列の記載：配列番号：24：

AGGAGCTTTT CCAGGTGTCT GTTGGTACCA AGCCATATA　39

（２）配列番号：25の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：41塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
【０１６９】

【数１－１７】
（xi）配列の記載：配列番号：25：

ACCAACAGAC ACCTGGAAAA GCTCCTAGGC TGCTCATACA T 41

（２）配列番号：26の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：40塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA（primer）
（xi）配列の記載：配列番号：26：

GCAGGCTGCT GATGGTGAAA GTATAATCTC TCCCAGACCC 40

（２）配列番号：27の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：42塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA（primer）
（xi）配列の記載：配列番号：27：

ACTTTCACCA TCAGCAGCCT GCAGCCTGAA GATATTGCAA CT 42

（２）配列番号：28の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：59塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
【０１７０】

【数１－１８】

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：28：

CCGAGGATCC ACTCACGTTT GATTTCCACC TTGGTGCCTT GACCGAACGT CCACAGATT 59

（２）配列番号：29の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：33塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：29：

GGAAAAGCTC CTAGGCTGCT CATATATTAC ACA 33

（２）配列番号：30の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：38塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：30：

CCGAGGATCC ACTCACGTTT GATTTCCACC TTTGTGCC 38

（２）配列番号：31の情報：

【０１７１】

【数１－１９】
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：51塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
（xi）配列の記載：配列番号：31：

AACCCAGTGT ATATAGGTGT CTTTAATGTT GAAACCGCTA GCTTTACAGC T　51

（２）配列番号：32の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：67塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
（xi）配列の記載：配列番号：32：

AAAGACACCT ATATACACTG GGTTAGACAG GCCCCTGGCC AAAGGCTGGA GTGGATGGGA　60
AGGATTG　67

（２）配列番号：33の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：26塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA (primer)
（xi）配列の記載：配列番号：33：
【０１７２】

【数１－２０】
GACCCGGCCC TGGAACTTCG GGTCAT 26

（２）配列番号：34の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：66塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：34：

GACCCGAAGT TCCAGGGCAG GGTCACCATC ACCGCAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC 60
ATGGAA 66

（２）配列番号：35の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：64塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：35：

CCATAGCATA GACCCCGTAG TTACCATAAT ATCCCTCTCT GGCGCAGTAG TAGACTGCAG 60
TGTC 64

（２）配列番号：36の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：63塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

【０１７３】

【数１－２１】
（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：36：

GGTAACTACG GGGTCTATGC TATGGACTAC TGGGGTCAAG GAACCCTTGT CACCGTCTCC 60

TCA 63

（２）配列番号：37の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：37塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：37：

CCAGGGCCGG GTCACCATCA CCAGAGACAC CTCTGCC 37

（２）配列番号：38の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：27塩基対

（Ｂ）型　　：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：DNA (primer)

（xi）配列の記載：配列番号：38：

CAGGCCCCTG GCCAAGGGCT GGAGTGG 27

（２）配列番号：39の情報：

（ｉ）配列の特徴：

【０１７４】

【数１－２２】
（Ａ）長さ　：17塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA（primer）
（xi）配列の記載：配列番号：39：

TACGCAAACC GCCTCTC 17

（２）配列番号：40の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：18塩基対
（Ｂ）型　　：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：DNA（primer）
（xi）配列の記載：配列番号：40：

GAGTGCACCA TATGCGGT 18

（２）配列番号：41の情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ　：116アミノ酸
（Ｂ）型　　：アミノ酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）分子の型：蛋白質
（xi）配列の記載：配列番号：41：

【０１７５】

【数１－２３】

```
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 Ser Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

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

Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Asn 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 Asn Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

（２）配列番号：42の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：109アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：42：

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Asp Ile Ser Asn
            20                  25                  30

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

Ile Tyr Tyr Ala Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

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

Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
                85                  90                  95

Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

【０１７６】

【数１－２４】
（２）配列番号：43の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：114アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：43：

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

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

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
                85                  90                  95

Tyr Asn Ser Leu Pro Glu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
            100                 105                 110
Ile Lys
```

（２）配列番号：44の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：125アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：44：

【０１７７】

【数１－２５】

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Xaa Val Gly Tyr Tyr Ala Met
            100                 105                 110

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

（２）配列番号：45の情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ　：129アミノ酸

（Ｂ）型　　：アミノ酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）分子の型：蛋白質

（xi）配列の記載：配列番号：45：

```
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

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
```

【０１７８】

【数１－２６】

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

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

【図１－１】

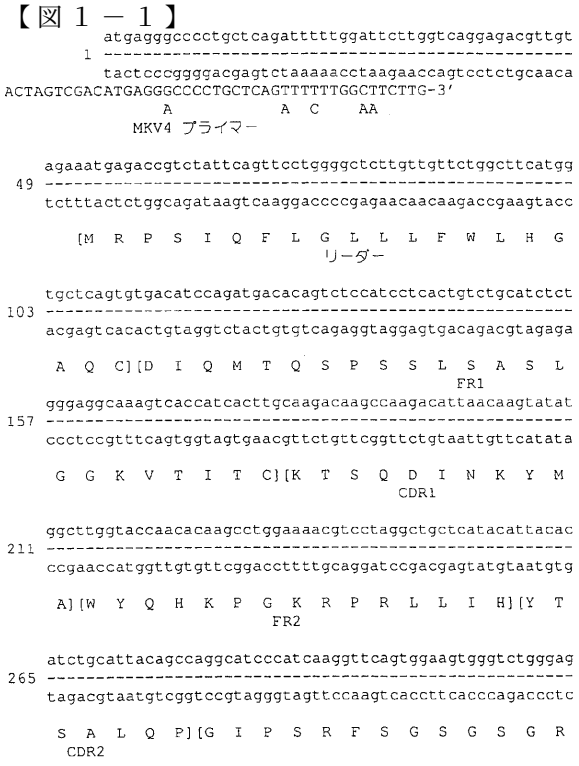

FIG. 1-1.

【図１－２】

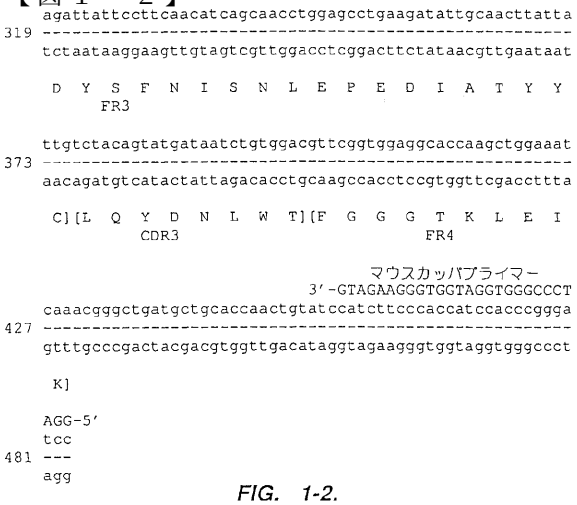

FIG. 1-2.

【図２－１】

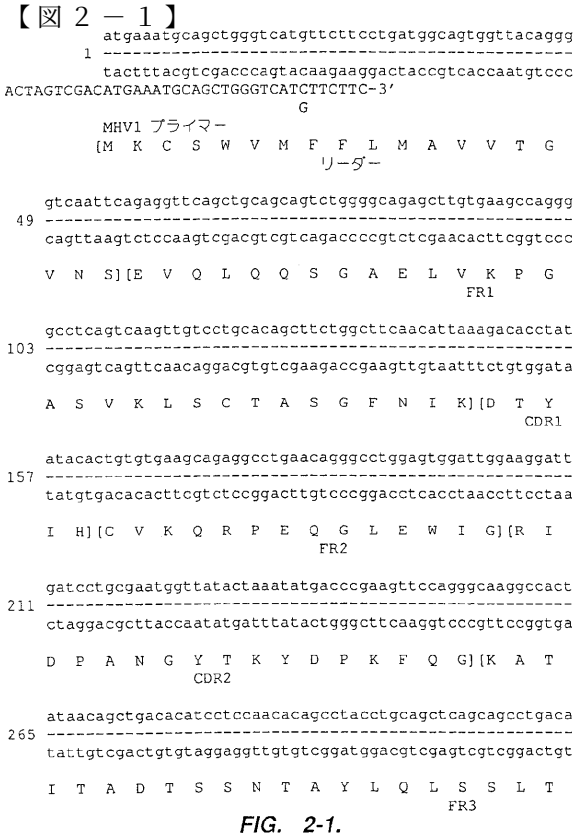

FIG. 2-1.

【図２－２】

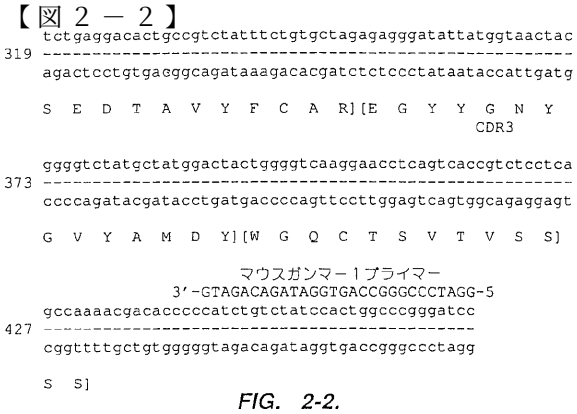

FIG. 2-2.

【図３】

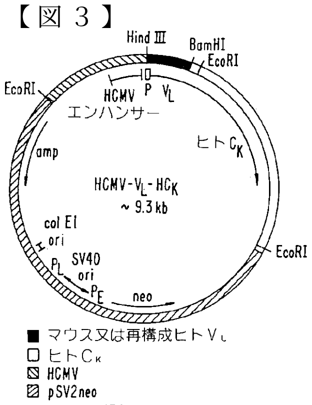

FIG. 3A.

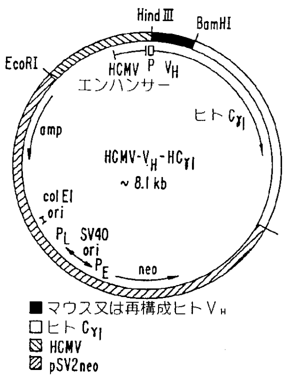

FIG. 3B.

【図４】

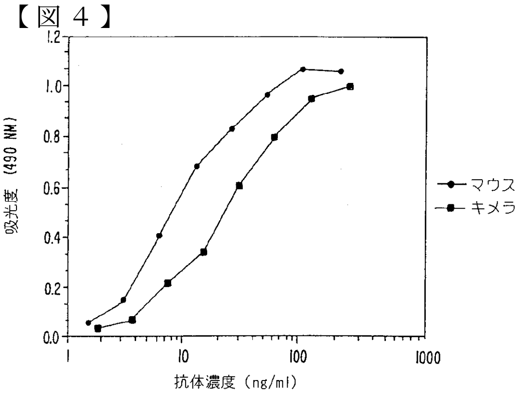

FIG. 4.

【図５】

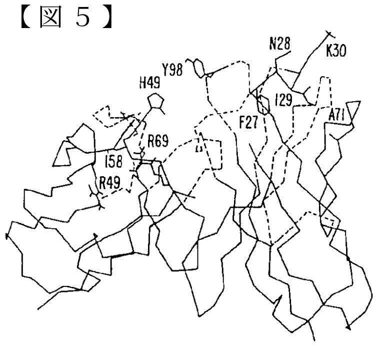

FIG. 5.

【図６】

```
                FR1                         CDR1            FR2              CDR2
         1         2          3          4          5
     12345678901234567890123 45678901234 567890123456789 0123456
      *                      *********   *               ***
21.6 DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITC KTSQDINKYMA WYQHKPGKRPRLLIH YTSALQP
REI  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDIIKYLN WYQQTPGKAPKLLIY EASNLQA
La   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KTSQDINKYMA WYQQTPGKAPRLLIH YTSALQP
Lb   ----------------------- ----------- ----------R---- -------

                  FR3                        CDR3      FR4
      6         7         8          9          10
     78901234567890123456789012345678 901234567 8901234567
          *         *                  *******
21.6 GIPSRFSGSGSGRDYSFNISNLEPEDIATYYC LQYDNL-WT FGGGTKLEIK
REI  GVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYC QQYQSLPYT FGQGTKLQIT
La   GIPSRFSGSGSGRDYTFTISSLQPEDIATYYC LQYDNL-WT FGQGTKVEIK
Lb   -I----------R------------------- --------- ------VE-K
```

FIG. 6.

【図７】

```
                FR1                    CDR1      FR2             CDR2
         1         2         3             4          5          6
     123456789012345678901234567890 12345 67890123456789 012A3456789012345
                              ***** ** *                    ****
21.6 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK DTYIH CVKQRPEQGLEWIG RIDPANGYTKYDPKFQG
2*CL QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYAMH WVRQAPGQRLEWMG WINAGNGNTKYSQKFQG
Ha   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIK DTYIH WVRQAPGQRLEWMB RIDPANGYTKYDPKFQG
Hb   --------------------------FNIK ----- --------G----- -----------------
Hc   --------------------------FNIK ----- -------------- -----------------

                  FR3                     CDR3          FR4
      7         8           9          10             11
     67890123456789012ABC345678901234 567890ABCDEF12 34567890123
      *                            *
21.6 KATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCAR EGYYGNYGVYAMDY WGQGTSVTVSS
2*CL RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR GGYYGSGS----NY WGQGTLVTVSS
Ha   RVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR EGYYGNYGVYAMDY WGQGTLVTVSS
Hb   -----A-------------------------- -------------- -----------
Hc   -----A-------------------------- --F----------- -----------
```

FIG. 7.

【図８】

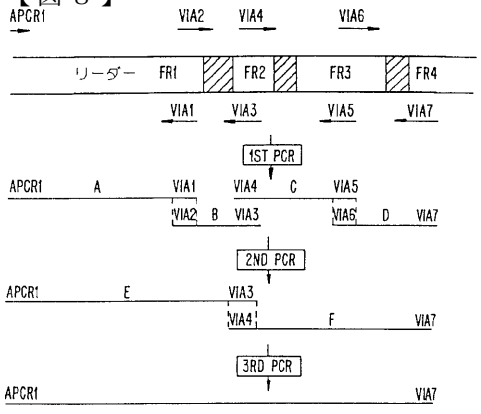

FIG. 8.

【図９】

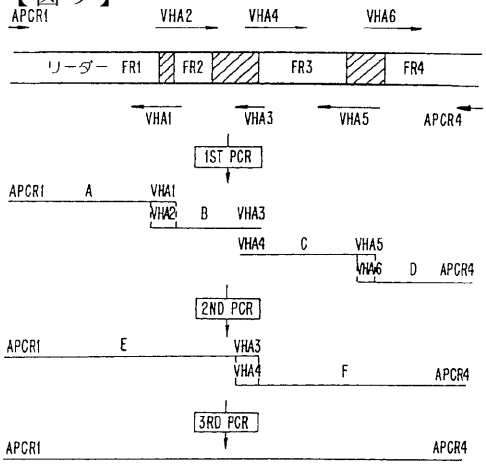

FIG. 9.

【図１０－１】

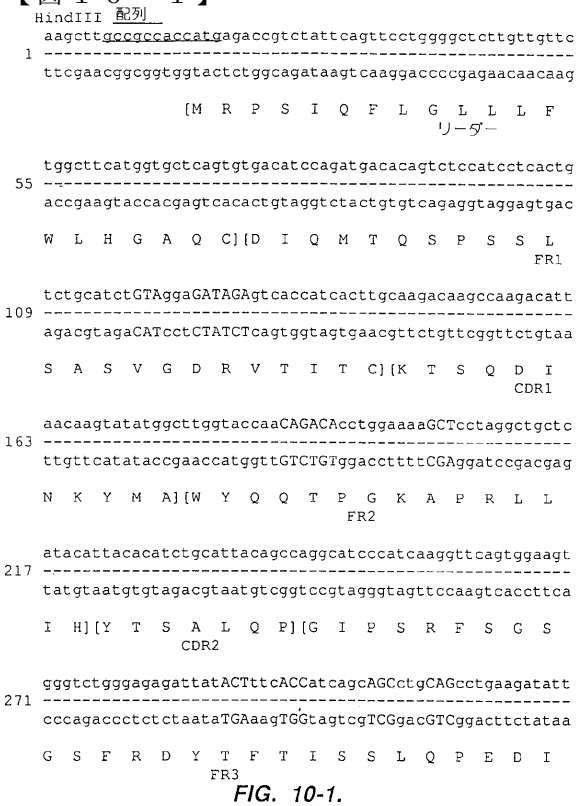

FIG. 10-1.

【図１０－２】

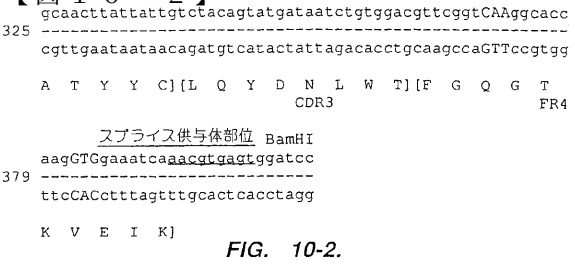

FIG. 10-2.

【図１１－１】

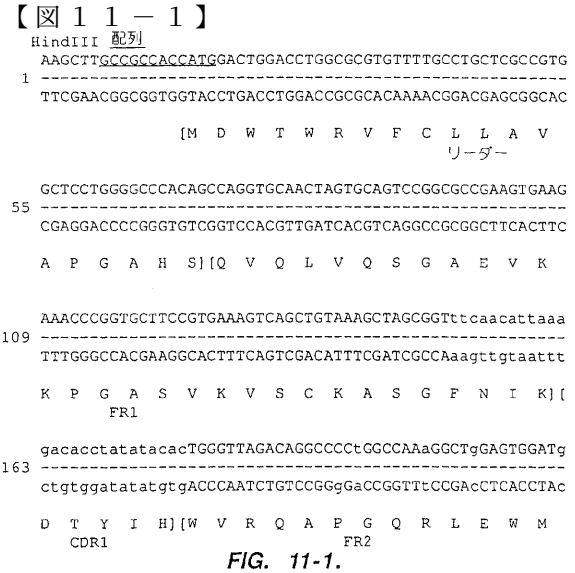

FIG. 11-1.

【図１１－２】

```
    GGaaggattgatcctgcgaatggttatactaaatatgacccgaagttccagggc
217 ----------------------------------------------------------
    CCttcctaactaggacgcttaccaatatgatttatactgggcttcaaggtcccg

    G][R  I  D  P  A  N  G  Y  T  K  Y  D  P  K  F  Q  G][
                              CDR2

    cgggtcACCatcACCgcaGACACCTCTgccagcACCGCCTACATGGAACTGTCC
271 ----------------------------------------------------------
    gcccagTGGtagTGGcgtCTGTGGAGAcggtcgTGGCGGATGTACCTTGACAGG

    R  V  T  I  T  A  D  T  S  A  S  T  A  Y  M  E  L  S
                                                   FR3

    AGCCTGCGCTCCGAGGACACTGCAGTCTACTACTGCGCCagagagggatattat
325 ----------------------------------------------------------
    TCGGACGCGAGGCTCCTGTGACGTCAGATGATGACGCGGtctctccctataata

    S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R][E  G  Y  Y

    ggtaactacggggtctatgctatgGACTAcTGGGGtCAaGGaACCCTTGTCACC
379 ----------------------------------------------------------
    ccattgatgccccagatacgatacCTGATgACCCCaGTtCCtTGGGAACAGTGG

    G  N  Y  G  V  Y  A  M  D  Y][W  G  Q  G  T  L  V  T
          CDR3                                      FR4

    スプライス供与体部位 BamHI
    GTCtccTCAGGTGAGTGGATCC
433 ----------------------
    CAGaggAGTCCACTCACCTAGG

    V  S  S]
```

FIG. 11-2.

【図１２】

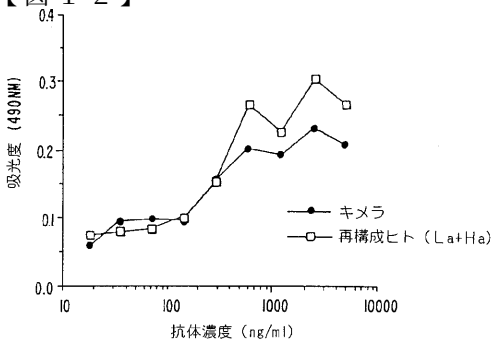

FIG. 12A.

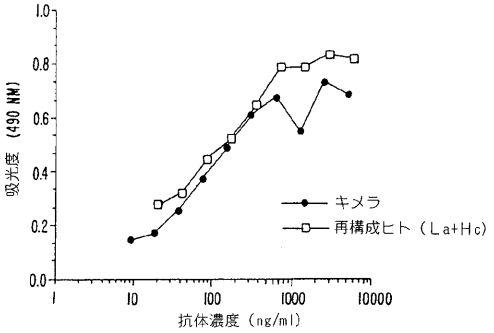

FIG. 12B.

【図１３】

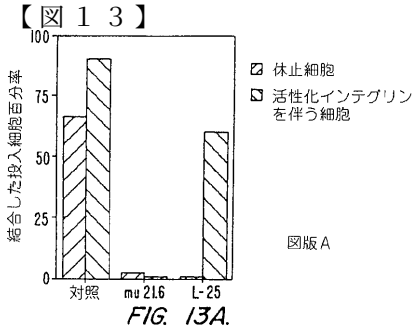

FIG. 13A.

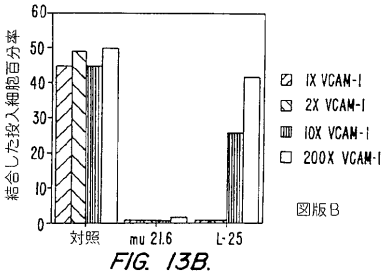

FIG. 13B.

【図１４】

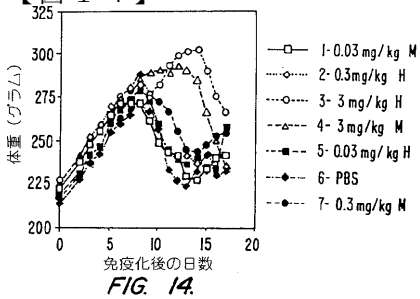

FIG. 14.

【図１５】

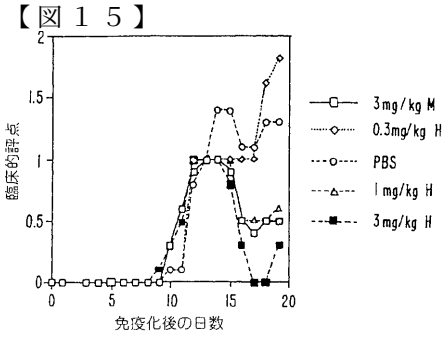

FIG. 15.

【図１６】

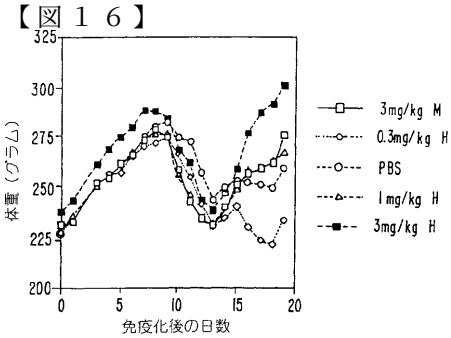

FIG. 16.

フロントページの続き

(72)発明者　オリビエ　ジェイ．レジェ
イギリス国，ハートフォードシャー　イーエヌ５　５ティーエス，バーネット，モクソン　ストリート　２４
(72)発明者　ジョゼ　サルダンハ
イギリス国，ミドルセックス　イーエヌ１　１ティーイー，エンフィールド，リンカーン　ウェイ　２２エー
(72)発明者　タラン　エス．ジョーンズ
イギリス国，ハートフォードシャー　ダブリュディー７　８エイチエー，ラドレット，ザ　クロース　１０

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA07 DA06 EA04 GA11 HA01 HA12
HA15
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA86 EA22 EA31 EA50
EA54 FA74

专利名称(译)	抗白细胞粘附分子vla-4的人源化抗体		
公开(公告)号	JP2006045237A	公开(公告)日	2006-02-16
申请号	JP2005228930	申请日	2005-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	伊兰制药公司		
申请(专利权)人(译)	伊兰制药公司		
[标]发明人	メアリーエムベディング オリビエジェイレジェ ジョゼサルダンハ タランエスジョーンズ		
发明人	メアリー エム.ベディング オリビエ ジェイ.レジェ ジョゼ サルダンハ タラン エス.ジョーンズ		
IPC分类号	C07K16/46 C12N15/09 G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61P7/00 A61P29/00 A61P37/00 C07H21/04 C07K C07K16/18 C07K16/28 C12N5/00 C12N5/10 C12N15/13 C12P21/08 C12R1/91		
CPC分类号	A61K38/00 A61P7/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/00 C07K16/2839 C07K16/2842 C07K2317/24 C07K2319/00		
FI分类号	C07K16/46.ZNA C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/EA54 4H045/FA74		
优先权	08/186269 1994-01-25 US		
其他公开文献	JP2006045237A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供对VLA-4受体显示强结合亲和力但没有免疫原性的人源化抗体。 来自人κ轻链可变区框架结构序列的结构和三个互补决定区，其具有来自特定鼠类21.6免疫球蛋白轻链可变域的相应互补决定区的氨基酸序列。 并且选自由L45，L49，L58和L69组成的第一组中的至少一个位置（根据Kabat编号规则）等同于小鼠21.6免疫球蛋白轻链可变区框架结构。 人源化免疫球蛋白，其包含人源化轻链，其包含被存在于其中的相同氨基酸残基占据的结构。 [选择图]无

グループ	1	2	3	4	5	6	7
mg／kg	0.03M *	3.0H @	3.0H	3.0M	0.03H	PBS	0.3M
	8	9	13	10	8	9	9
	9	10	15	12	10	9	9
	9	10	15	14	10	11	11
	9	11	16	14	11	11	12
	11	11	16	14	12	11	12
	12	11	16	15	12	12	13
	12	12	17	15	12	12	13
		13	17	18	12	13	
平均±SD	10.0±1.6	10.9±1.2	**15.6±1.3	*14.0±2.3	10.9±1.5	11.0±1.4	11.6±1.4

@ Hはヒト化抗体を、* Mはマウスを示す。 PBSに比較して