

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-528589

(P2010-528589A)

(43) 公表日 平成22年8月26日 (2010. 8. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-509535 (P2010-509535)
 (86) (22) 出願日 平成20年5月21日 (2008. 5. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年1月25日 (2010. 1. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/064421
 (87) 国際公開番号 W02008/144757
 (87) 国際公開日 平成20年11月27日 (2008. 11. 27)
 (31) 優先権主張番号 60/924, 550
 (32) 優先日 平成19年5月21日 (2007. 5. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/924, 551
 (32) 優先日 平成19年5月21日 (2007. 5. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 11/802, 235
 (32) 優先日 平成19年5月21日 (2007. 5. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508343375
 アルダー・バイオファーマシューティカル
 ズ・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国ワシントン州98011,
 ボーセル, ノース・クリーク・パークウェ
 イ・サウス 11804
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

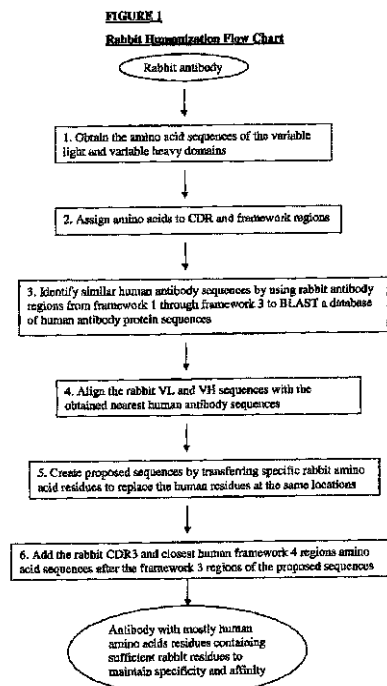
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規のウサギ抗体ヒト化方法及びヒト化ウサギ抗体

(57) 【要約】

本発明は、ウサギの重鎖及び軽鎖可変領域をヒト化するための新規で改善された方法を提供する。得られるヒト化ウサギ重鎖及び軽鎖と抗体、並びに含有する抗体断片は、それらが親抗体の抗原結合親和性を保持するので、免疫療法及び免疫診断における使用に十分適していて、ヒト抗体配列に対するそのきわめて高いレベルの配列同一性に基づけば、ヒトにおいて本質的には非免疫原性であるはずである。本発明は、治療用のヒト化抗ヒトTNF-α及び抗ヒトIL-6抗体の製造のためのプロトコルを例示する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含有するヒト化抗体又は抗体断片であって、ここで軽鎖ポリペプチドは、少なくとも以下：(i) F R 1 から F R 3 に至る中で選択されるアミノ酸残基の、所望の抗原への特異性を有するヒト化される親ウサギ抗体の軽鎖の対応するアミノ酸残基に対する（ヒト生殖細胞系配列のライブラリー中の他のヒト生殖細胞系配列に比した）そのより大きな相同性（配列同一性パーセント）に基づいて該ライブラリーより選択されるヒト軽鎖生殖細胞系配列の C D R 1 及び C D R 2 領域が含まれる、F R 1 の第一残基から F R 3 の末端に至るアミノ酸残基；及び (i i) さらにここで、同じ親ウサギ抗体の軽鎖中の「選択性決定残基」に対応する C D R 1 及び C D R 2 中の C D R 残基は、対応するウサギ選択性決定残基で置き換えられている；(i i i) 同じ親ウサギ抗体の全 C D R 3 領域が含まれるアミノ酸残基；(i v) 同じ親ウサギ抗体の軽鎖に含まれる対応する F R 4 領域に対するそのより大きな相同性（配列同一性）に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーから導かれる抗体軽鎖の全 F R 4 領域が含まれるアミノ酸残基；及び (v) ここで、選択される相同的なヒト F R 領域中のヒト F R 1、F R 2、F R 3、及び F R 4 領域の F R 残基の中で、対応するウサギ F R 残基で置換されているものは、ほとんど又はまったくなく；を含有するヒト化軽鎖ポリペプチドである、前記ヒト化抗体又は抗体断片。

10

【請求項 2】

親ウサギ抗体が、ヒト、ウイルス、又は細菌の抗原に特異的である、請求項 1 のヒト化抗体。

20

【請求項 3】

ヒト抗原が、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、又は癌抗原である、請求項 2 のヒト化抗体。

【請求項 4】

I L - 6、ヘプシジン、肝細胞増殖因子、又は T N F ポリペプチドに特異的である、請求項 1 のヒト化抗体。

【請求項 5】

請求項 1、2、3、又は 4 のいずれかに引用されるヒト化抗体に含まれるヒト化抗体軽鎖をコードする核酸配列。

30

【請求項 6】

請求項 5 に記載の核酸配列を含有するベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターを含有する細胞。

【請求項 8】

酵母、細菌、及び哺乳動物の細胞より選択される、請求項 7 の細胞。

【請求項 9】

二倍体の酵母細胞である、請求項 8 の細胞。

【請求項 10】

ピキア属 (Pichia) 又は他のメタノール資化性二倍体酵母である、請求項 9 の細胞。

40

【請求項 11】

少なくとも 1 つの重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含有するヒト化抗体又は抗体断片であって、ここで重鎖は、少なくとも以下：(i) F R 1 から F R 3 に至る中で選択されるアミノ酸残基の、所望の抗原への特異性を有するヒト化される親ウサギ抗体の重鎖の対応するアミノ酸残基に対する（ヒト生殖細胞系配列のライブラリー中の他のヒト生殖細胞系配列に比した）そのより大きな相同性（配列同一性パーセント）に基づいて該ライブラリーより選択されるヒト生殖細胞系配列によりコードされる C D R 1 及び C D R 2 領域が含まれる、F R 1 の第一残基から F R 3 の末端に至るアミノ酸残基；及び (i i) さらにここで、同じ親ウサギ抗体の重鎖の C D R 1 及び C D R 2 領域中の「選択性決定残基」に対応するヒト重鎖の C D R 1 及び C D R 2 中の C D R 残基は、ウサギ重鎖の C D R 1 及び C D R

50

2 領域に含まれる対応する重鎖選択性決定残基で置き換えられている；(i i i) 同じ親ウサギ抗体の全 C D R 3 領域が含まれるアミノ酸残基；(i v) 同じ親ウサギ抗体の重鎖に含まれる対応する F R 4 領域に対するそのより大きな相同性（配列同一性）に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーから導かれる F R 4 領域；及び(v) ここでヒト重鎖 F R 1 領域の最終の 1～3 のアミノ酸は、対応するウサギ重鎖 F R 1 残基の末端の 1～3 のアミノ酸で置き換えられていてもよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク 2 領域の末端アミノ酸は、ウサギ重鎖フレームワーク 2 の対応する末端アミノ酸残基で置き換えられていてもよい；及び／又は、ウサギ重鎖 C D R 2 の末端から 4 番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）は、対応するヒト C D R 2 残基（典型的には、セリン）で置き換えられていてもよい；及び(v i) ここで、選択される相同的なヒト F R 領域の残る F R 残基の中で、対応するウサギ F R 残基で置換されているものは、ほとんど又はまったくないこと；を含有するヒト化重鎖ポリペプチドである、前記ヒト化抗体又は抗体断片。

10

【請求項 1 2】

親ウサギ抗体が、ヒト、ウイルス、又は細菌の抗原に特異的である、請求項 1 1 のヒト化抗体。

【請求項 1 3】

ヒト抗原が、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、又は癌抗原である、請求項 1 2 のヒト化抗体。

【請求項 1 4】

I L-6、ヘプシジン、肝細胞増殖因子、又は T N F ポリペプチドに特異的である、請求項 1 1 のヒト化抗体。

20

【請求項 1 5】

請求項 1 1、1 2、1 3、又は 1 4 のいずれかに引用されるヒト化抗体に含まれるヒト化抗体重鎖をコードする核酸配列。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の核酸配列を含有するベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のベクターを含有する細胞。

【請求項 1 8】

酵母、細菌、及び哺乳動物の細胞より選択される、請求項 1 7 の細胞。

30

【請求項 1 9】

二倍体の酵母細胞である、請求項 1 8 の細胞。

【請求項 2 0】

ピキア属 (Pichia) 又は他のメタノール資化性二倍体酵母である、請求項 1 9 の細胞。

【請求項 2 1】

少なくとも 1 つのヒト化軽鎖ポリペプチドを含有し、そしてさらに少なくとも 1 つの重鎖ポリペプチドを含んでなる請求項 1 のヒト化抗体であって、ここで少なくとも 1 つの重鎖は、少なくとも以下：(i) F R 1 から F R 3 に至る中で選択されるアミノ酸残基の、所望の抗原への特異性を有するヒト化される親ウサギ抗体の重鎖の対応するアミノ酸残基に対する（ヒト生殖細胞系配列のライブラリー中の他のヒト生殖細胞系配列に比べた）そのより大きな相同性（配列同一性パーセント）に基づいて該ライブラリーより選択されるヒト生殖細胞系配列によりコードされる C D R 1 及び C D R 2 領域が含まれる、F R 1 の第一残基から F R 3 の末端に至るアミノ酸残基；及び(i i) さらにここで、同じ親ウサギ抗体の重鎖の C D R 1 及び C D R 2 領域中の「選択性決定残基」に対応するヒト重鎖の C D R 1 及び C D R 2 中の C D R 残基は、ウサギ重鎖の C D R 1 及び C D R 2 領域に含まれる対応する重鎖選択性決定残基で置き換えられている；(i i i) 同じ親ウサギ抗体の全 C D R 3 領域が含まれるアミノ酸残基；(i v) 同じ親ウサギ抗体の重鎖に含まれる対応する F R 4 領域に対するそのより大きな相同性（配列同一性）に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーから導かれる F R 4 領域；及び(v) ここでヒト重鎖 F R 1 領域の最終の 1～3 のアミノ酸は、対応するウサギ重鎖 F R 1 残基の末端の 1～3 のアミノ酸で

40

50

置き換えられていてもよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク 2 領域の末端アミノ酸は、ウサギ重鎖フレームワーク 2 の対応する末端アミノ酸残基で置き換えられていてもよい；及び／又は、ウサギ重鎖 C D R 2 の末端から 4 番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）は、対応するヒト C D R 2 残基（典型的には、セリン）で置き換えられていてもよい；及び（v i）ここで、選択される相同的なヒト F R 領域の残る F R 残基の中で、対応するウサギ F R 残基で置換されているものは、ほとんど又はまったくないこと；を含有するヒト化重鎖ポリペプチドである、前記ヒト化抗体。

【請求項 2 2】

I L-6、ヘプシジン、肝細胞増殖因子、又は T N F ポリペプチドに特異的である、請求項 2 1 のヒト化抗体。

【請求項 2 3】

以下の工程：

（i）所望の抗原へ特異的に結合するウサギ抗体からのウサギ軽鎖抗体配列をコードする D N A を入手して、フレームワーク 1（F R 1）の始まりからフレームワーク 3（F R 3）の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

（i i）F R 1 の始まりから F R 3 配列の終わりに至る前記ウサギ軽鎖抗体アミノ酸配列を用いて、ヒト軽鎖抗体配列を含有するライブラリーに対する相同性検索を実行して、他のヒト生殖細胞系抗体軽鎖配列に比べてそれに対する実質的な配列相同性を示すヒト軽鎖抗体配列を同定する工程；

（i i i）ウサギとヒトの両方の軽鎖配列において、F R 1、F R 2、F R 3、C D R 1、C D R 2 の領域に対応する配置とその特異的残基（specific residues）を同定して、ウサギのこれらの離散領域と選択されるヒト抗体軽鎖を並置する工程；

（i v）選択される相同的なヒト軽鎖配列の C D R 1 及び C D R 2 領域が、ウサギ軽鎖配列の C D R 1 及び C D R 2 領域に含まれる対応する選択性決定残基によって置換されている D N A 又はアミノ酸配列を構築する工程；

（v）工程（i v）によって得られる D N A 又はアミノ酸配列へ、ウサギ C D R 3 軽鎖抗体配列の対応するアミノ酸残基をコードする D N A 配列又はそれを含有するポリペプチドをさらに付ける工程；

（v i）ウサギ軽鎖に含まれる F R 4 に相同的であり、好ましくは、多くても 2～4 のアミノ酸残基だけそれから異なるヒト軽鎖フレームワーク 4 領域（F R 4）をさらに選択して、前記ヒト F R 4 をコードする D N A 配列又は前記ヒト F R 4 の対応するアミノ酸残基を、工程（v）の後で得られる D N A 又はアミノ酸配列の上へ付ける工程；並びに

（v i i）工程（i）～（v i）より得られるヒト化ウサギ軽鎖配列をコードするか又は含有する D N A 又はアミノ酸配列を合成する工程を含んでなる、ヒト化軽鎖抗体配列を産生するためのヒト化戦略。

【請求項 2 4】

F R 1 を始めるアミノ酸がウサギ軽鎖シグナル配列の後で最初のアミノ酸である、請求項 2 3 のヒト化戦略。

【請求項 2 5】

シグナル配列が約 2 0～2 2 のアミノ酸残基を含む、請求項 2 3 のヒト化戦略。

【請求項 2 6】

ヒト軽鎖配列がヒト生殖細胞系可変軽鎖配列を含有するライブラリーより同定される、請求項 2 3 のヒト化戦略。

【請求項 2 7】

ウサギ配列中の F R 1、F R 2、F R 3、及び C D R 1、及び C D R 2 領域が、ウサギ F R 1、F R 2、F R 3、及び C D R 1、及び C D R 2 領域に対応するヒト軽鎖 F R 1、F R 2、F R 3、C D R 1、及び C D R 2 領域と並置することによって同定される、請求項 2 3 のヒト化戦略

【請求項 2 8】

ウサギ C D R 3 領域が 9～1 5 のアミノ酸残基を含む、請求項 2 3 のヒト化戦略。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

ウサギ軽鎖FR4領域が11のアミノ酸残基を含む、請求項23のヒト化戦略。

【請求項 30】

FR3がYYCで終わる、請求項23のヒト化戦略。

【請求項 31】

ウサギ軽鎖中のFR4がFGGGGで始まる、請求項23のヒト化戦略。

【請求項 32】

前記ウサギFR4領域がVVKRアミノ酸配列で始まる、請求項31のヒト化戦略。

【請求項 33】

選択されるヒトFR4軽鎖配列がFGGGTKVEIKRを含む、請求項23のヒト化戦略。 10

【請求項 34】

得られるヒト化ウサギ軽鎖を所望の抗原へ結合するヒト化抗体又はヒト化抗体断片の製造に使用する、請求項23のヒト化戦略。

【請求項 35】

請求項23～34のいずれか1項に従って産生される、ヒト化ウサギ軽鎖可変アミノ酸配列又はそれをコードするDNA。

【請求項 36】

微生物抗原、ヒト抗原、ウイルス抗原、及びアレルゲンより選択される抗原に特異的である、請求項35のヒト化ウサギ軽鎖可変アミノ酸配列又はDNA配列。 20

【請求項 37】

ヒト抗原が、ヒトの自己抗原、サイトカイン、受容体タンパク質、酵素、ホルモン、受容体リガンド、ステロイド、増殖因子、及び癌遺伝子より選択される、請求項36のヒト化ウサギ軽鎖可変アミノ酸又はDNA配列。

【請求項 38】

請求項23～34のいずれか1項に従って産生されるヒト化ウサギ軽鎖可変配列を含有する抗体又は抗体断片。

【請求項 39】

請求項23～34のいずれか1項に従って産生される、エフェクター部分へ付くヒト化ウサギ軽鎖又はそれを含有する抗体。 30

【請求項 40】

エフェクター部分が、薬物、毒素、酵素、放射性核種、フルオロフォア、サイトカイン、アフィニティー標識、及び転座型ポリペプチドより選択される、請求項39のヒト化ウサギ軽鎖ポリペプチド。

【請求項 41】

請求項23～34のいずれか1項に従って産生される、サイトカイン、増殖因子、又は腫瘍特異的ポリペプチドへ特異的に結合するウサギ抗体から導かれる、ヒト化ウサギ軽鎖ポリペプチド又はそれを含有する抗体又はそれらをコードするDNA。

【請求項 42】

IL-6、TNF、VEGF、IL-12、ヘプシジン、又は肝細胞増殖因子へ特異的に結合するウサギ抗体から導かれる、請求項41のヒト化ウサギ軽鎖ポリペプチド又は含有する抗体。 40

【請求項 43】

以下の工程：

(i) 所望の抗原へ特異的に結合するウサギ抗体からウサギ重鎖抗体配列を入手して、フレームワーク1 (FR1) の始まりからフレームワーク3 (FR3) の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

(ii) FR1の始まりからFR3配列の終わりに至る前記ウサギ重鎖抗体アミノ酸配列を使用する相同性検索を（例えば、ヒト生殖細胞系抗体配列含有ライブラリーのBLAST検索によって）実行して、それに対して相同的である、即ち、好ましくは、それに対 50

してアミノ酸レベルで少なくとも80%～90%の同一性を保有するヒト重鎖抗体配列を同定する工程；

(i i i) ウサギとヒトの両方の重鎖配列において、FR 1、FR 2、FR 3、CDR 1、CDR 2の領域に対応する配置とその特異的残基を同定して、ウサギのこれらの離散領域を選択される相同的なヒト抗体重鎖の対応領域に対して並置する工程；

(i v) 選択される相同的なヒト重鎖配列のCDR 1及びCDR 2領域中の残基が、ウサギ重鎖配列の対応するCDR 1及びCDR 2領域に含まれる選択性決定残基によって置換されているDNA又はアミノ酸配列を構築して、ヒト重鎖FR 1領域の末端の1～3のアミノ酸をウサギ重鎖FR 1の対応する末端の1～3のアミノ酸で置き換えてもよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク2領域の末端アミノ酸をウサギ重鎖フレームワーク2の対応する末端アミノ酸残基で置き換えてもよい；及び／又は、ウサギ重鎖CDR 2の末端から4番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）を対応するヒトCDR 2残基（典型的には、セリン）で置き換えてもよい工程；

(v) 工程(i v)によって得られるDNA又はアミノ酸配列へ、同じウサギ重鎖抗体配列に含まれるウサギ重鎖CDR 3の対応するアミノ酸残基をコードするDNA配列又はそれを有するポリペプチドをさらに付ける工程；

(v i) それに相同的である（好ましくは、ヒト化ウサギ抗体重鎖配列に含まれるFR 4より、多くても4つのアミノ酸残基だけ異なる）ヒト重鎖フレームワーク4領域（FR 4）をさらに選択して、前記選択された相同的なヒトFR 4をコードするDNA配列又は前記ヒトFR 4の対応するアミノ酸残基を、工程(v)の後で得られるDNA又はアミノ酸配列の上へ付ける工程；並びに

(v i i) 工程(i)～(v i)より得られるヒト化ウサギ重鎖配列をコードするか又は含有するDNA又はアミノ酸配列を合成する工程を含んでなる、ヒト化重鎖抗体配列をウサギ重鎖抗体配列より產生するためのヒト化戦略。

【請求項44】

FR 1を始めるアミノ酸がウサギ重鎖シグナル配列の後で最初のアミノ酸である、請求項43のヒト化戦略。

【請求項45】

FR 3の終わりがFR 1の第一残基の後の約95～100番目のアミノ酸残基である、請求項43のヒト化戦略。

【請求項46】

シグナル配列が19以下のアミノ酸残基を含む、請求項43のヒト化戦略。

【請求項47】

相同的なヒト重鎖配列が抗体成熟化に先立って得られるヒト生殖細胞系配列のBLAST検索によって同定される、請求項43のヒト化戦略。

【請求項48】

選択される相同的なヒト重鎖がウサギ重鎖の対応領域に対して少なくとも90～95%の配列同一性を保有する、請求項43のヒト化戦略

【請求項49】

ウサギ重鎖配列中のFR 1、FR 2、FR 3、及びCDR 1、及びCDR 2領域がウサギFR 1、FR 2、FR 3、及びCDR 1、及びCDR 2領域を対応するヒト重鎖FR 1、FR 2、FR 3、CDR 1、及びCDR 2領域と並置することによって同定される、請求項43のヒト化戦略。

【請求項50】

ヒトFR 1の最終の3つのアミノ酸残基をウサギFR 1の対応する3つの残基で置き換える、請求項43のヒト化戦略。

【請求項51】

ウサギFR 1中の前記3つの残基にs e r - g l yが先行する、請求項50のヒト化戦略。

【請求項52】

ヒト F R 2 の末端アミノ酸残基をウサギ F R 2 の対応する末端アミノ酸残基で置き換える工程をさらに含む、請求項 4 3 のヒト化戦略。

【請求項 5 3】

末端のウサギ F R 2 残基がイソロイシン残基に先行される場合もあるグリシンを含む、請求項 5 2 のヒト化戦略。

【請求項 5 4】

ウサギ C D R 2 の終わりより約 4 残基に位置するトリプトファン残基をセリン残基に変える工程をさらに含む、請求項 4 3 のヒト化戦略。

【請求項 5 5】

ウサギ C D R 3 が 5 ～ 1 9 のアミノ酸残基を含む、請求項 4 3 の方法。

10

【請求項 5 6】

ウサギ C D R 3 に残基 W G 「X」 G が続き、ここで「X」は、好ましくは Q 又は P である、請求項 4 3 のヒト化戦略。

【請求項 5 7】

ウサギ F R 4 が 1 1 のアミノ酸残基を含む、請求項 4 3 のヒト化戦略。

【請求項 5 8】

ウサギ F R 4 が W G Q G T L V T V S S を含む、請求項 5 7 のヒト化戦略。

【請求項 5 9】

請求項 4 3 ～ 5 8 のいずれかにより産生される、微生物抗原、ヒト抗原、ウイルス抗原、及びアレルゲンより選択される抗原に特異的なウサギ抗体から導かれるヒト化ウサギ重鎖可変アミノ酸配列又は D N A 配列。

20

【請求項 6 0】

ヒト抗原に特異的である、請求項 5 9 のヒト化ウサギ重鎖可変アミノ酸配列又は D N A 配列。

【請求項 6 1】

ヒト抗原が、ヒトの自己抗原、サイトカイン、受容体タンパク質、酵素、ホルモン、受容体リガンド、ステロイド、増殖因子、及び癌遺伝子より選択される、請求項 5 9 のヒト化ウサギ重鎖可変アミノ酸配列又は D N A 配列。

【請求項 6 2】

請求項 4 3 ～ 5 8 のいずれか 1 項に従って産生されるヒト化ウサギ重鎖可変配列を含有する抗体又は抗体断片。

30

【請求項 6 3】

請求項 4 3 ～ 5 8 のいずれか 1 項に従って産生される、エフェクター部分へ付くヒト化ウサギ重鎖。

【請求項 6 4】

エフェクター部分が、薬物、毒素、酵素、放射性核種、フルオロフォア、サイトカイン、アフニティー標識、及び転座型ポリペプチドより選択される、請求項 6 3 のヒト化ウサギ重鎖ポリペプチド。

【請求項 6 5】

請求項 4 3 ～ 5 8 のいずれか 1 項に従って産生される、サイトカイン、増殖因子、又は腫瘍特異的ポリペプチドへ特異的に結合するウサギ抗体から導かれるヒト化ウサギ重鎖ポリペプチド又はそれをコードする D N A 。

40

【請求項 6 6】

I L - 6、T N F - α 、V E G F - α 、I L - 1 2、ヘプシジン、又は肝細胞増殖因子へ特異的に結合するウサギ抗体から導かれる、請求項 6 5 のヒト化ウサギ重鎖ポリペプチド。

【請求項 6 7】

非グリコシル化 (aglycosylated) されている、請求項 6 4 のヒト化ウサギ重鎖ポリペプチド。

【請求項 6 8】

50

請求項 23～34 の少なくとも 1 項に従って産生される少なくとも 1 つのヒト化ウサギ軽鎖と請求項 43～58 の 1 項に従って産生される少なくとも 1 つのヒト化ウサギ重鎖を含んでなるヒト化ウサギ抗体。

【請求項 69】

ヒトの定常ドメインを含む、請求項 68 のヒト化ウサギ抗体。

【請求項 70】

I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 より選択される、請求項 69 のヒト化ウサギ抗体。

【請求項 71】

ヒト抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、病原体、寄生虫、酵母抗原、及び真菌抗原より選択される抗原へ結合する、請求項 68 のヒト化ウサギ抗体。

10

【請求項 72】

ヒト化抗体の投与を含む免疫療法又は免疫診断の方法であって、ここで改善は、請求項 1～5、11～14、21、又は 22 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体又は抗体断片を投与することを含む、前記方法。

【請求項 73】

I L－6 又は T N F に関連した疾患又は障害の症状を改善又は抑制することを含む、請求項 72 の方法。

【請求項 74】

I L－6 又は T N F－ α に関連した前記疾患又は障害が癌又は炎症性状態である、請求項 73 の方法。

20

【請求項 75】

抗体が抗 I L－6 抗体であり、I L－6 関連の疲労、悪液質、又は関節炎を治療するか又はその予後を診断するために使用される、請求項 73 の方法。

【請求項 76】

I L－6 に関連した前記疾患又は障害が、全身疲労、運動誘発性疲労、癌関連疲労、炎症性疾患関連疲労、慢性疲労症候群、癌関連悪液質、心臓関連悪液質、呼吸関連悪液質、腎臓関連悪液質、加齢関連悪液質、慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡 (S L E)、全身型若年性特発性関節炎、乾癬、乾癬性関節症、強直性脊椎炎、炎症性腸疾患 (I B D)、リウマチ性多発性筋痛、巨細胞性動脈炎、自己免疫性脈管炎、移植片対宿主病 (G V H D)、シェーグレン症候群、成人発症型スティル病、慢性関節リウマチ、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、骨粗鬆症、骨ページェット病、骨関節炎、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前立腺癌、白血病、腎細胞癌、多中心型キャッスルマン病、卵巣癌、癌化学療法時の薬剤耐性、癌化学療法の毒性、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、糖尿病、喘息、多発性硬化症、アルツハイマー病、及び脳血管系疾患より選択される、請求項 73 の方法。

30

【請求項 77】

前記疾患又は障害が T N F に関連していて、全身疲労、運動誘発性疲労、癌関連疲労、炎症性疾患関連疲労、慢性疲労症候群、癌関連悪液質、心臓関連悪液質、呼吸関連悪液質、腎臓関連悪液質、加齢関連悪液質、慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡 (S L E)、全身型若年性特発性関節炎、乾癬、乾癬性関節症、強直性脊椎炎、炎症性腸疾患 (I B D)、リウマチ性多発性筋痛、巨細胞性動脈炎、自己免疫性脈管炎、移植片対宿主病 (G V H D)、シェーグレン症候群、成人発症型スティル病、慢性関節リウマチ、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、骨粗鬆症、骨ページェット病、骨関節炎、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前立腺癌、白血病、腎細胞癌、多中心型キャッスルマン病、卵巣癌、癌化学療法時の薬剤耐性、癌化学療法の毒性、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、糖尿病、喘息、多発性硬化症、アルツハイマー病、及び脳血管系疾患より選択される、請求項 73 の方法。

40

【請求項 78】

ヒト化抗体又は抗体断片が、少なくとも 10～25 m g / リットルの前記抗体を安定的

50

に発現して培養基へ分泌する倍数体酵母培養物において発現される請求項 7 2 の方法であって：

(i) プロモーター及びシグナル配列へ機能可能的に連結した前記ヒト化抗体又は断片をコードする 1 以上の異種ポリヌクレオチドを含有する少なくとも 1 つの発現ベクターを一倍体酵母細胞へ導入する工程；

(i i) 前記第一及び／又は第二の一倍体酵母細胞より、接合又はスフェロプラスト融合によって、倍数体酵母を産生する工程；

(i i i) 前記ヒト化抗体又は断片を安定的に発現する倍数体酵母細胞を選択する工程；及び

(i v) 少なくとも 1 0 ～ 2 5 m g / リットルの前記ヒト化抗体又は断片を培養基へ安定的に発現する前記倍数体酵母細胞より、安定した倍数体酵母培養物を産生する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 7 9】

前記酵母が以下の属：アルキシオザイマ (Arxiozyma)；アスコボトリオザイマ (Ascootryozyma)；シテロマイセス (Citeromyces)；デバリオマイセス (Debaryomyces)；デッケラ (Dekkera)；エレモセシウム (Eremothecium)；イサットヘンキア (Issatchenkia)；カザクスタニア (Kazachstania)；クルイベロマイセス (Kluyveromyces)；コダマエア (Kodamaea)；ロデロマイセス (Lodderomyces)；パチソレン (Pachysolen)；ピキア (Pichia)；サッカロマイセス (Saccharomyces)；サツニスボラ (Saturnispora)；テトラピシスポラ (Tetrapisispora)；トルラスボラ (Torulaspora)；ウィリオプシス (Williopsis)；及びザイゴサッカロマイセス (Zygosaccharomyces) より選択される、請求項 7 8 の方法。

【請求項 8 0】

前記酵母属がピキアである、請求項 7 9 の方法。

【請求項 8 1】

ピキアの種が、ピキア・パストリス (Pichia pastoris)、ピキア・メタノリカ (Pichia metanolica)、及びハンセヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha) (ピキア・アングスタ (Pichia angusta)) より選択される、請求項 8 0 の方法。

【請求項 8 2】

請求項 2 3 ～ 3 4 又は 4 3 ～ 5 8 のいずれか 1 項によって産生されるヒト化抗体ポリペプチドを含有するヒト化抗体又は抗体断片であって、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ 、 10^{-7} M^{-1} 、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ 、 10^{-8} M^{-1} 、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ 、 10^{-9} M^{-1} 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ 、 10^{-10} M^{-1} 、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$ 、 10^{-11} M^{-1} 、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}^{-1}$ 、 10^{-12} M^{-1} 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}^{-1}$ 、 10^{-13} M^{-1} 、又は $5 \times 10^{-14} \text{ M}^{-1}$ 以下の解離定数 (K_D) で抗原へ結合する、前記ヒト化抗体又は断片。

【請求項 8 3】

$5 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ 以下の解離定数 (K_D) で抗原へ結合する、請求項 8 2 のヒト化抗体。

【請求項 8 4】

10^{-4} S^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$ 、 10^{-5} S^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$ 、 10^{-6} S^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ S}^{-1}$ 、又は 10^{-7} S^{-1} 以下の解離速度 (K_{off}) で抗原へ結合する、請求項 8 2 のヒト化抗体。

【請求項 8 5】

親ウサギ抗体が 1 以上のウサギ B 細胞集団に由来する、請求項 8 2 のヒト化抗体。

【請求項 8 6】

IL-6 の IL-6 R との会合、又は TNF とその受容体との会合を阻害する、請求項 8 2 のヒト化抗体。

【請求項 8 7】

IL-6 R が可溶性 IL-6 R (s IL-6 R) である、請求項 8 6 のヒト化抗体。

【請求項 88】

TNF 受容体 (TNFR) が可溶性である、請求項 86 のヒト化抗体。

【請求項 89】

請求項 1～22 又は 82～88 のいずれか 1 項に記載のヒト化ウサギ抗体を発現するベクター。

【請求項 90】

請求項 89 のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 91】

ピキア属に属する酵母細胞である、請求項 90 の宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願

【0001】 本出願は、そのいずれも 2007 年 5 月 21 日に出願されて、その内容がその全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国仮特許出願番号 60/924, 550 及び 60/924, 551 と米国有用性特許出願番号 11/802, 235 に関連して、それらに対する優先権を主張する。加えて、本出願は、「IL-6 antibodies and Use Thereof (IL-6 抗体とその使用)」及び「TNH-Alpha Antibodies (TNF- α 抗体)」と題して 2008 年 3 月 21 日に出願されて、代理人ドケット番号 67858-701902 及び 67858-701802 で整理された PCT 出願に対する優先権を主張して、その全体を参照により本明細書に組み込む。

20

【0002】

技術分野

【0002】 本発明は、ウサギ抗体アミノ酸可変重鎖及び軽鎖ポリペプチド配列又は他のウサギ目の動物のような近縁種由来の抗体を修飾する（ヒト化する）ための新規で改善されたアミノ酸配列及び相同性ベースの方法を提供する。得られる修飾された抗体配列は、親抗体（例えば、ウサギ抗体）に比べて、ヒトにおいて免疫原性がより少ないか又は非免疫原性であり、修飾された（ヒト化）抗体配列が導かれる親抗体に比べて、同じ又は実質的に同じ結合親和性を保持する。

【0003】

30

【0003】 さらに本発明は、そのような方法によって産生される、ウサギ抗体から導かれるヒト化可変軽鎖及び可変重鎖を提供する。以下に示すように、本発明の方法は、再現可能に、元のウサギ抗体の抗原特異性及び親和性を保持するヒト化抗体を産生する。本発明の手順は、全般に、ウサギ抗体由来のウサギ抗体相補性決定領域 (CDR) に含まれる特異的アミノ酸残基（「選択性決定残基」）を相同的なヒト抗体可変重鎖及び軽鎖ポリペプチド配列の上へ移すことに依拠する。

【0004】

【0004】 本発明は、より具体的な態様において、本明細書に提供する新規のヒト化プロトコールを使用して産生された、インターロイキン-6 (IL-6) 又は腫瘍壊死因子 α (以下、「TNF- α 」) に対する結合特異性を有するヒト化抗体及びヒト化抗体断片とその変異体を例示する。しかしながら、本明細書に提供する新規のヒト化プロトコールは、どの所望の抗原へも特異的に結合するウサギ又は他のウサギ目の動物由来の抗体のヒト化に応用可能であることを理解されたい。これには、例を挙げれば、感染作用体（ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、等）由来の抗原、アレルゲン、酵素、ホルモン、自己抗原、増殖因子、サイトカイン、受容体、受容体リガンド、免疫調節及び免疫調整分子、等のようなヒト抗原に特異的な抗体が含まれる。

40

【0005】

【0005】 本発明はまた、本発明に従って産生されるヒト化抗体及び抗体断片を、治療薬として、そしてそのような抗原に関連した疾患及び障害を検出するための *in vitro* 及び *in vivo* スクリーニングアッセイのような診断目的に使用する方法に関する。例えば、

50

これには、IL-6 又は TNF- α に対する抗体を使用する in vivo 造影スクリーニング方法と、前記ヒト化抗体又はその断片を投与することによって TNF- α 又は IL-6 に関連した疾患又は障害を治療する方法が含まれる。

【背景技術】

【0006】

[0006] 抗体は、我々の免疫応答において不可欠な役割を担っている。それらは、ウイルス及び細菌の毒素を不活性化することができて、侵入する微生物や大きな寄生虫を殺すために補体系と様々な種類の白血球細胞を動員することに必須である。抗体は、専ら B リンパ球により合成されて、異なるアミノ酸配列と抗原への異なる結合部位をそれぞれ有する、数百万もの形態で産生される。抗体は、集合的に免疫グロブリン (Ig) と呼ばれ、血液中で最も豊富なタンパク成分である。Alberts et al. 「Molecular Biology of the Cell (細胞の分子生物学)」第 2 版 (1989)、Garland Publishing 社。

10

【0007】

[0007] 典型的な抗体は、2つの同一の重 (H) 鎖 (それぞれ約 440 のアミノ酸を含有する) と 2つの同一の軽 (L) 鎖 (それぞれ約 220 のアミノ酸を含有する) がある Y 形状の分子である。この 4つの鎖は、非共有及び共有 (ジスルフィド) 結合の組合せによって繋がっている。パパイン及びペプシンのようなタンパク分解酵素は、抗体分子を異なる特徴的な断片へ分離させることができる。パパインは、それぞれ 1つの抗原結合部位と 1つの Fc 断片がある、2つの分離した同一の Fab 断片を産生する。ペプシンは、1つの F(ab')₂ 断片を産生する。Alberts et al. 「Molecular Biology of the Cell (細胞の分子生物学)」第 2 版 (1989)、Garland Publishing 社。

20

【0008】

[0008] L 鎖と H 鎖は、ともにそのアミノ末端に可変配列を有するが、そのカルボキシル末端には定常配列を有する。L 鎖は、約 110 のアミノ酸の長さの定常領域と同じサイズの可変領域を有する。H 鎖も約 110 のアミノ酸の長さの可変領域を有するが、H 鎖の定常領域は、H 鎖のクラスに依存して、約 330 又は 440 のアミノ酸の長さである。Alberts et al. 「Molecular Biology of the Cell (細胞の分子生物学)」第 2 版 (1989)、Garland Publishing 社、1019頁。

【0009】

[0009] 可変領域の一部だけが抗原の結合に直接参画する。諸研究は、L 鎖と H 鎖の両方の可変領域における変異性が、各鎖中の 3つの小さな超可変領域 (相補性決定領域、又は CDR と呼ばれる) に大部分は制限されていることを示してきた。フレームワーク領域 (FR) として知られる可変領域の残りの部分は、相対的には一定している。Alberts et al. 「Molecular Biology of the Cell (細胞の分子生物学)」第 2 版 (1989)、Garland Publishing 社、1019-1020頁。

30

【0010】

[0010] 天然の免疫グロブリンは、アッセイ、診断に、そしてより限られた程度で、療法に使用されてきた。しかしながら、そのような使用は、特に療法においては、天然の免疫グロブリンのポリクローナルな性質によって妨げられてきた。明確な特異性のあるモノクローナル抗体の出現は、療法使用の機会を高めた。しかしながら、ほとんどのモノクローナル抗体は、齧歯動物の宿主動物を標的タンパク質で免疫化して、その後で目的の抗体を産生する齧歯動物の脾臓細胞を齧歯動物の骨髓腫細胞と融合することによって産生される。故に、それらは、本質的には齧歯動物のタンパク質であり、それ自体はヒトにおいて当然ながら免疫原性であり、HAM A (ヒト抗マウス抗体) 応答と呼ばれる望まれない免疫応答をしばしば生じる。

40

【0011】

[0011] 多くのグループが治療用抗体の免疫原性を減らすための技術を考案してきた。伝統的には、ドナー抗体に対する相同性の度合いによってヒトの鑄型を選択する、即ち、可変領域において非ヒト抗体に対して最も相同的なヒト抗体をヒト化の鑄型として使用するのである。この論拠は、フレームワーク配列が抗原との相互作用のために CDR をそ

50

の正しい空間配置に保つことに役立ち、そしてフレームワーク残基が時には抗原結合に参画することもできることにある。従って、選択されるヒトフレームワーク配列がドナーフレームワークの配列に最も似ているならば、それは、ヒト化抗体において親和性が保持される見込みを最大にすることになる。例えば、Winter（E P 番号：0 2 3 9 4 0 0）は、重鎖及び軽鎖可変領域のそれぞれ由来の3つの相補性決定領域（CDR 1、CDR 2、及びCDR 3）を移植するために、長いオリゴヌクレオチドを使用する部位特異的突然変異誘発によってヒト化抗体を産生することを提唱した。このアプローチは、奏効することが示されたが、それは、ドナーCDRを支える最良のヒト鋳型を選択することの可能性を制限するものである。

【0012】

10

[00012] ヒト化抗体は、ヒトにおいてその天然又はキメラの対応物より免疫原性ではないものの、多くのグループは、CDR移植ヒト化抗体が有意に減少した結合親和性を示す場合があることを見出している（例えば、Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327）。例えば、Reichmann と共同研究者は、CDR領域を移すだけでは、そのCDR移植産物において満足すべき抗原結合活性を提供するのに十分でないこと、そしてヒト配列の27位にあるセリン残基を対応するラットのフェニルアラニン残基へ変換することも必要であることを見出した。これらの結果は、CDR領域の外側にあるヒト配列の残基への変更が有効な抗原結合活性を得るのに必要であり得ることを示した。そうであっても、その結合親和性は、元のモノクローナル抗体のそれより依然として有意に低かった。

【0013】

20

[00013] 例えば、Queen et al（米国特許第5, 530, 101号）は、マウスのモノクローナル（抗Tac MA b）のCDRをヒト免疫グロブリンのフレームワーク及び定常領域と組み合わせることによる、インターロイキン-2受容体へ結合するヒト化抗体の製造について記載した。ヒトフレームワーク領域は、抗Tac MA b配列との相同性を最大化するように選択された。加えて、コンピュータモデリングを使用して、CDR又は抗原と相互作用する見込みのあるフレームワークアミノ酸残基を同定して、ヒト化抗体中のこれらの位置にマウスのアミノ酸を使用した。得られたこのヒト化抗Tac抗体は、インターロイキン-2受容体（p55）へ $3 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ の親和性を有すると報告されたが、これはそれでもマウスMA bのその約1/3にすぎなかった。

【0014】

30

[00014] 他のグループは、満足すべき結合親和性のあるCDR移植産物を入手することに残基のアミノ酸同一性が貢献する可能性がある、可変領域のフレームワークの内側（即ち、可変領域のCDR及び構造ループの外側）のさらなる位置を同定した。例えば、米国特許第6, 054, 297号及び5, 929, 212号を参照のこと。それでも、目的とする所与の抗体にとって、ある特別なCDR移植配置がどのくらい有効であるかを前もって知ることは、不可能である。

【0015】

[00015] Leung（米国特許出願公開公報番号：US 2003/0040606）は、フレームワークパッチングアプローチについて記載しているが、ここでは、免疫グロブリンの可変領域がFR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、及びFR 4へ区画化されて、個々のFR配列が非ヒト抗体とヒト抗体鋳型の間の最良の相同性によって選択される。しかしながら、このアプローチは労働集約的であり、最適なフレームワーク領域は、容易に同定されそうもない。

【0016】

[00016] より多くの治療用抗体が開発されていて、より有望な結果が期待されているので、投与される抗体によって誘発される身体の免疫応答を抑制するか又は消失させることが可能であることが重要である。従って、抗体をヒト様のものとする効率的で迅速な工学処理を可能にする、及び／又は抗体をヒト化する労働の低減を可能にする新しいアプローチは、大きな利益と医学的な価値を提供する。

【0017】

50

[00017] 本明細書の参考文献の引用又は考察は、そのようなものが本発明の先行技術であることの容認として解釈してはならない。

【発明の概要】

【0018】

[00018] 本発明は、ウサギ又は他のウサギ目の動物の抗体から導かれる、ヒト化可変重鎖及び／又は軽鎖領域とそのようなヒト化可変重鎖及び軽鎖領域を含有するヒト化抗体又は抗体断片を産生するための新しいヒト化戦略に一部基づく。好ましくは、ヒト化に使用されるこれらのウサギ又は他のウサギ目の動物由来の抗体は、免疫化したウサギより得られるクローンB細胞集団から導かれる。

【0019】

[00019] より具体的には、本発明は、適正な相同的なヒト軽鎖可変配列の選択とウサギ軽鎖CDRに含まれる特異的な選択性決定残基の保持にヒト化戦略の一部として依拠する、ウサギ又は別のウサギ目の動物の抗体から導かれる抗体可変軽鎖のヒト化のための新規なヒト化戦略を提供する。

【0020】

[00020] 「選択性決定残基」は、より詳しくは下記に定義するが、本質的には、ヒト化抗体を導くために使用するヒト生殖細胞系CDRに含まれる対応のアミノ酸残基と比較されるその構造及び／又は化学特性に基づいて、抗原認識及び／又は抗原結合に有意な効果を及ぼすと考えられる、ウサギCDR領域に含まれる特異的なアミノ酸残基に対応する。

【0021】

[00021] またより具体的には、本発明は、適正な相同的なヒト重鎖可変配列の選択と特異的な選択性決定残基の保持にヒト化戦略の一部として依拠する、ウサギ又は別のウサギ目の動物の抗体から導かれる抗体可変重鎖のヒト化のための新規な戦略を提供する。

【0022】

[00022] またより具体的には、本発明は、ウサギ又は別のウサギ目の動物の抗体可変重鎖及び軽鎖ポリペプチドから導かれるヒト化可変重鎖及び／又は軽鎖を含んでなるヒト化抗体及び抗体断片を産生するための新規なヒト化戦略を提供する。

【0023】

[00023] なおより具体的には、本発明は、以下の工程を含んでなる、ウサギ目の動物（ウサギ）の軽鎖抗体配列から導かれるヒト化軽鎖抗体配列を産生するためのヒト化戦略を提供する：

（i）所望の抗原へ特異的に結合するウサギ抗体からウサギ軽鎖抗体配列を入手して、フレームワーク1（FR1）の始まりからフレームワーク3（FR3）の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

（ii）FR1の始まりからFR3配列の終わりに至る前記ウサギ軽鎖抗体アミノ酸配列を用いて、ヒト軽鎖抗体可変配列を含有するライブラリーに対する相同性検索を実行して、それに対する実質的な配列相同性を示す、即ち、好ましくは、それに対する少なくとも80%～90%の同一性を保有する、及び／又はライブラリー中の他のヒト軽鎖抗体可変配列に比べてアミノ酸レベルで最大の配列同一性を示すヒト軽鎖抗体配列を同定する工程；

（iii）ウサギとヒトの両方の軽鎖可変配列において、FR1、FR2、FR3、CDR1、CDR2の領域に対応する配置とその特異的な残基を同定して、ウサギのこれらの離散領域と選択されるヒト抗体軽鎖を並置する工程；

（iv）ウサギ軽鎖CDR1及びCDR2中の対応する選択性決定残基より異なる、選択される相同的なヒト軽鎖配列のCDR1及びCDR2領域中の少なくともアミノ酸残基が、ウサギのCDR1及びCDR2領域中の対応する選択性決定残基で置換されているDNA又はアミノ酸配列を構築する工程；

（v）工程（iv）によって得られるDNA又はアミノ酸配列へ、ウサギCDR3軽鎖抗体配列の対応するアミノ酸残基をコードするDNA配列又はそれを含有するポリペプチドをさらに付ける工程；

10

20

30

40

50

(v i) ウサギ軽鎖に含まれる F R 4 に相同的であり、好ましくは、多くても 2 ～ 4 のアミノ酸残基だけそれから異なるヒト軽鎖フレームワーク 4 領域 (F R 4) をさらに選択して、前記ヒト F R 4 をコードする D N A 配列又は前記ヒト F R 4 の対応するアミノ酸残基を、工程 (v) の後で得られる D N A 又はアミノ酸配列の上へ付ける工程；並びに

(v i i) 工程 (i) ～ (v i) より得られるヒト化ウサギ軽鎖配列をコードするか又は含有する D N A 又はアミノ酸配列を合成する工程。

【0024】

[00024] またより具体的には、本発明は、以下の工程を含んでなる、ウサギの重鎖抗体配列からヒト化重鎖抗体配列を産生するためのヒト化戦略を提供する：

(i) 所望の抗原へ特異的に結合するウサギ抗体からウサギ重鎖抗体配列を入手して、フレームワーク 1 (F R 1) の始まりからフレームワーク 3 (F R 3) の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

(i i) F R 1 の始まりから F R 3 配列の終わりに至る前記ウサギ重鎖抗体アミノ酸配列を使用する相同性検索を（例えば、ヒト生殖細胞系抗体配列含有ライブラリーの B L A S T 検索によって）実行して、それに対して相同的である、即ち、好ましくは、それに対してアミノ酸レベルで少なくとも 80 % ～ 90 % の同一性を保有する、及び／又はライブラリー中の他のヒト重鎖抗体可変配列に比べてアミノ酸レベルで最大の配列同一性を示すヒト重鎖抗体配列を同定する工程；

(i i i) ウサギとヒトの両方の重鎖配列において、F R 1、F R 2、F R 3、C D R 1、C D R 2 の領域に対応する配置とその特異的残基を同定して、ウサギのこれらの離散領域を選択される相同的なヒト抗体重鎖の対応領域に対して並置する工程；

(i v) ウサギ重鎖 C D R 1 及び C D R 2 領域中の対応する選択性決定残基より異なる、選択される相同的なヒト重鎖配列の C D R 1 及び C D R 2 領域中の少なくともアミノ酸残基が、ウサギ重鎖配列の C D R 1 及び C D R 2 領域に含まれる対応する選択性決定残基によって置換されている D N A 又はアミノ酸配列を構築して、さらに、ヒト重鎖 F R 1 領域の末端の 1 ～ 3 のアミノ酸をウサギ重鎖 F R 1 の対応する末端の 1 ～ 3 のアミノ酸で置き換えてもよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク 2 領域の末端アミノ酸をウサギ重鎖フレームワーク 2 の対応する末端アミノ酸残基で置き換えてもよい；及び／又は、ウサギ重鎖 C D R 2 の末端から 4 番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）を対応するヒト C D R 2 残基（典型的には、セリン）で置き換えてもよい工程；

(v) 工程 (i v) によって得られる D N A 又はアミノ酸配列へ、同じウサギ重鎖抗体配列に含まれるウサギ重鎖 C D R 3 の対応するアミノ酸残基をコードするか又は有する D N A 配列をさらに付ける工程；そしてこのウサギ C D R 3 は、典型的には 5 ～ 19 のアミノ酸の長さである（そしてここで、前記 C D R 3 は、典型的には残基 W G X G に先行して、さらにここで X は、典型的には、Q 又は P である）；

(v i) それに相同的である（好ましくは、ヒト化ウサギ抗体重鎖配列に含まれる F R 4 より、多くても 4 つのアミノ酸残基だけ異なる）ヒト重鎖フレームワーク 4 領域 (F R 4) をさらに選択して、前記選択された相同的なヒト F R 4 をコードする D N A 配列又は前記ヒト F R 4 の対応するアミノ酸残基を、工程 (v) の後で得られる D N A 又はアミノ酸配列の上へ付ける工程（しばしば、このヒト F R 4 D N A 又はポリペプチド配列は、W G Q G T L V T V S S をコードするか又は含む）；並びに

(v i i) 工程 (i) ～ (v i) より得られるヒト化ウサギ重鎖配列をコードするか又は含有する D N A 又はアミノ酸配列を合成する工程。

【0025】

[00025] またより具体的には、本発明は、ウサギ軽鎖抗体配列から導かれる少なくとも 1 つのヒト化軽鎖抗体配列及び／又はウサギ抗体重鎖から導かれる少なくとも 1 つのヒト化重鎖配列を含有するヒト化抗体又は抗体断片を産生するためのヒト化戦略を提供し、ここでそのようなヒト化軽鎖及び／又は重鎖配列は、ウサギの重鎖及び軽鎖から以下の工程に従って導かれる：

(i) 所望の抗原に特異的なウサギ抗体からウサギ軽鎖抗体配列を入手して、フレーム

10

20

30

40

50

ワーク 1 (FR 1) の始まりからフレームワーク 3 (FR 3) の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

(i i) FR 1 の始まりから FR 3 配列の終わりに至る前記ウサギ軽鎖抗体アミノ酸配列を用いて、ヒト軽鎖抗体可変配列を含有するライブラリーに対する相同性検索を実行して、それに対して相同的である、即ち、好ましくは、それに対してアミノ酸レベルで少なくとも 80%~90% 同一である、及び／又はライブラリー中の他のヒト軽鎖抗体可変配列に比べてアミノ酸レベルで最大の配列同一性を示すヒト軽鎖抗体配列を同定する工程；

(i i i) ウサギとヒトの両方の軽鎖配列において、FR 1、FR 2、FR 3、CDR 1、CDR 2 の領域に対応する配置とその特異的残基を同定して、ウサギ軽鎖のこれらの離散領域を選択される相同的なヒト抗体軽鎖領域の対応領域と並置する工程；

(i v) ウサギ可変軽鎖 CDR 1 及び CDR 2 領域中の対応する選択性決定残基より異なる、選択される相同的なヒト軽鎖配列の CDR 1 及び CDR 2 領域中の少なくともアミノ酸残基が、ウサギ軽鎖配列のウサギ CDR 1 及び CDR 2 領域中の対応する選択性アミノ酸残基によって置換されている DNA 又はアミノ酸配列を構築する工程；

(v) 工程 (i v) によって得られる DNA 又はアミノ酸配列へ、ウサギ軽鎖抗体配列に含まれる CDR 3 の対応するアミノ酸残基をコードするか又は有する DNA 配列をさらに付ける工程；

(v i) 前記ウサギ抗体軽鎖に含まれる FR 4 に相同的であり、ヒト FR 4 がウサギ抗体軽鎖配列の FR 4 より、好ましくは多くても 2~4 のアミノ酸残基だけ異なるヒト軽鎖フレームワーク 4 領域 (FR 4) をさらに選択して、前記ヒト FR 4 をコードする DNA 配列又は前記ヒト FR 4 の対応するアミノ酸残基を、工程 (v) の後で得られる DNA 又はアミノ酸配列の上へ付ける工程；並びに

(v i i) 工程 (i) ~ (v i) より得られるヒト化ウサギ軽鎖配列をコードするか又は含有する DNA 又はアミノ酸配列を合成する工程；

及び／又は、以下の工程を含んでなる、ウサギ重鎖抗体配列よりヒト化重鎖抗体配列をさらに產生する工程；

(i) 所望の抗原へ特異的なウサギ抗体からウサギ重鎖抗体配列を入手して、フレームワーク 1 (FR 1) の始まりからフレームワーク 3 (FR 3) の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

(i i) FR 1 の始まりから FR 3 配列の終わりに至る前記ウサギ重鎖抗体アミノ酸配列を使用する相同性検索を（例えば、ヒト生殖細胞系抗体配列含有ライブラリーの BLAST 検索によって）実行して、それに対してアミノ酸レベルで少なくとも 85%~90% 同一である、及び／又はライブラリーに含まれる他のヒト重鎖抗体可変配列に比べてアミノ酸レベルで最大の配列同一性を示すヒト重鎖抗体配列を同定する工程；

(i i i) ウサギとヒトの両方の重鎖配列において、FR 1、FR 2、FR 3、CDR 1、CDR 2 の領域に対応する配置とその特異的残基を同定して、ウサギ抗体のこれらの離散領域を選択される相同的なヒト重鎖に対して並置する工程；

(i v) ウサギ可変重鎖 CDR 1 及び CDR 2 領域中の対応する選択性決定残基より異なる、選択される相同的なヒト重鎖配列の CDR 1 及び CDR 2 領域に含まれる少なくともアミノ酸残基が、ウサギ重鎖配列の CDR 1 及び CDR 2 領域の対応する選択性決定残基によって置換されている DNA 又はアミノ酸配列を構築する工程；及び／又は、ヒト重鎖 FR 1 領域の最終の 1~3 のアミノ酸をウサギ重鎖 FR 1 の末端の 1~3 のアミノ酸で置き換えてもよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク 2 領域の末端アミノ酸をウサギ重鎖フレームワーク 2 の末端アミノ酸残基で置き換えてもよい；及び／又は、ウサギ重鎖 CDR 2 の末端から 4 番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）を対応するヒト CDR 2 残基（典型的には、セリン）でさらに置き換えてもよい工程；

(v) 工程 (i v) によって得られる DNA 又はアミノ酸配列へ、同じウサギ重鎖抗体配列に含まれるウサギ重鎖 CDR 3 の対応するアミノ酸残基をコードするか又は有する DNA 配列をさらに付ける工程（この CDR 3 は、典型的には 5~19 のアミノ酸の長さであり、この CDR 3 は、さらに典型的には WG X G に先行する）；

10

20

30

40

50

(v i) それに相同的である（即ち、好ましくは、ヒト化ウサギ抗体重鎖配列に含まれるFR 4より、多くても2～4のアミノ酸残基だけ異なる）ヒト重鎖フレームワーク4領域（FR 4）をさらに選択して、前記選択された相同的なヒトFR 4をコードするDNA配列又は前記ヒトFR 4の対応するアミノ酸残基を、工程（v）の後で得られるDNA又はアミノ酸配列の上へ付ける工程（典型的には、このヒトFR 4 DNA又はポリペプチド配列は、WGQGT LVT VSSをコードするか又は含む）；並びに

(v i i) 工程（i）～（v i）より得られるヒト化ウサギ重鎖配列をコードするか又は含有するDNA又はアミノ酸配列を合成する工程；

そして、上記のように産生される、前記合成されたヒト化重鎖及び軽鎖のDNA又はアミノ酸配列を使用して、少なくとも1つのヒト化ウサギ軽鎖及び／又は少なくとも1つのヒト化ウサギ重鎖をコードするか又は含有するヒト化抗体又は断片又はDNA配列を産生する工程。

【0026】

[00026] 本発明はまた、本主題のヒト化方法によって産生される新規で改善されたヒト化抗体重鎖及び軽鎖と前記ヒト化重鎖及び軽鎖を含んでなる抗体と、療法及び診断の方法におけるそれらの使用を提供する。

【0027】

[00027] 特に、本発明は、以下を含有するヒト化抗体軽鎖を提供する：（i）FR 1からFR 3に至るアミノ酸残基の、所望の抗原への特異性を有するヒト化される親ウサギ抗体の軽鎖の対応するアミノ酸残基に対するアミノ酸レベルでのそのより大きな相同性（配列同一性）に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーより選択されるヒト軽鎖生殖細胞系配列（好ましくは、FR 1からFR 3に至るウサギ可変軽鎖中の前記領域に比べて、ライブラリー中の他のヒト軽鎖生殖細胞系配列に比べて、アミノ酸レベルで最大の配列同一性パーセントを保有する配列）のCDR 1及びCDR 2領域が含まれる、FR 1の第一残基からFR 3の末端に至るアミノ酸残基；及び（i i）さらにここで、同じ親ウサギ抗体の軽鎖中の「選択性決定残基」に対応するCDR 1及びCDR 2中のCDR残基は、対応するウサギ選択性決定残基で置き換えられている；（i i i）同じ親ウサギ抗体の全CDR 3領域が含まれるアミノ酸残基；（i v）同じ親ウサギ抗体の軽鎖に含まれる対応するFR 4領域に対するそのより大きな相同性（配列同一性）に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーから導かれる抗体軽鎖の全FR 4領域が含まれるアミノ酸残基；及び（v）さらにここで、選択される相同的なヒトFR領域中のヒトFR 1、FR 2、FR 3、及びFR 4領域のFR残基の中で、対応するウサギFR残基で置換されているものは、ほとんど又はまったくない（即ち、親ウサギ軽鎖抗体配列中の対応位置（複数）に存在する残基は、ヒト化されている）。

【0028】

[00028] 加えて、本発明は、少なくとも以下を含有するヒト化抗体重鎖を提供する：（i）FR 1からFR 3に至る中で選択されるアミノ酸残基の、所望の抗原への特異性を有するヒト化される親ウサギ抗体の重鎖の対応するアミノ酸残基に対する（ヒト生殖細胞系配列のライブラリー中の他のヒト生殖細胞系配列に比べて）そのより大きな相同性（アミノ酸レベルでの配列同一性パーセント）に基づいて、該ライブラリーより選択されるヒト生殖細胞系配列のCDR 1及びCDR 2領域が含まれる、FR 1の第一残基からFR 3の末端に至るアミノ酸残基；及び（i i）さらにここで、同じ親ウサギ抗体の重鎖のCDR 1及びCDR 2領域中の「選択性決定残基」に対応するヒト重鎖のCDR 1及びCDR 2領域中のCDR残基は、ウサギ重鎖のCDR 1及びCDR 2領域に含まれる対応する重鎖選択性決定残基で置き換えられている；（i i i）同じ親ウサギ抗体の全CDR 3領域が含まれるアミノ酸残基；（i v）同じ親ウサギ抗体の重鎖に含まれる対応するFR 4領域に対するそのより大きな相同性（配列同一性）に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーから導かれるFR 4領域；及び（v）ここでヒト重鎖FR 1領域の最終の1～3のアミノ酸は、対応するウサギ重鎖FR 1残基の末端の1～3のアミノ酸で置き換えられていてもよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク2領域の末端アミノ酸は、ウサギ重鎖

フレームワーク 2 の対応する末端アミノ酸残基で置き換えられていてもよい；及び／又は、ウサギ重鎖 C D R 2 の末端から 4 番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）は、対応するヒト C D R 2 残基（典型的には、セリン）で置き換えられていてもよい；及び（v i）ここで、選択される相同的なヒト F R 領域の残る F R 残基の中で、対応するウサギ F R 残基で置換されているものは、ほとんど又はまったくない（即ち、ウサギ抗体重鎖中の対応位置（複数）に存在する F R 残基は、ヒト化されている）。

【0029】

[00029] さらに、本発明は、上述のヒト化重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含有する新規で改善されたヒト化抗体と、前記ヒト化重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする核酸配列と前記ヒト化重鎖及び軽鎖を含有するヒト化抗体、並びにベクターと前記ベクター及び核酸配列を含有する宿主細胞と治療及び診断の方法におけるそれらの使用と組成物を提供する。

10

【0030】

[00030] 本発明は、前記ヒト化重鎖又は軽鎖 D N A 又はポリペプチド（複数）、又は所望の抗体定常ドメイン、好ましくはヒト抗体定常ドメインを含有するか又はコードする D N A 又はポリペプチド配列、及び／又はその抗体ポリペプチド又は核酸配列のカルボキシ又はアミノ末端にある（直接的又は間接的な）付加物を所望のエフェクター部分、例えば、毒素、薬物、放射性核種、フルオロフォア、酵素、サイトカイン、又はシグナルペプチドのような輸送配列と、親和性単離を促進するポリペプチドへ付けることをさらに考慮する。

20

【0031】

発明の簡略な要約

[00031] 考察するように、本発明は、ウサギ抗体から導かれるヒト化可変軽鎖及び可変重鎖を入手するための新規で改善された方法と、そのような方法によって產生されるヒト化重鎖及び／又は軽鎖ポリペプチドとコードする D N A を提供する。本発明の方法は、ヒトにおいて実質的には非免疫原性であるはずで、親ウサギ抗体の抗原特異性と実質的又は完全にその結合親和性を保持するヒト化抗体を再現可能的に產生する。本発明の手順は、全般に、ドナーウサギ抗体由来の特異的アミノ酸残基（特に、抗原認識及び結合において推定上役立つ選択性決定残基と、必要ならば少数のフレームワーク残基）を相同的なアクセプターヒト抗体可変重鎖及び軽鎖配列の上へ移すことに依拠する。

30

【0032】

[00032] より具体的には、本発明は、本明細書において「選択性決定残基」と呼ぶ離散数のウサギ軽鎖 C D R 残基と、任意選択的に皆無か又はごく少数のフレームワーク残基を相同的なヒト抗体軽鎖配列の上へ取込む、ウサギ抗体から導かれる抗体可変軽鎖のヒト化の新規なヒト化戦略へ向けられる。

【0033】

[00033] また、より具体的には、本発明は、皆無か又はごく少ない離散数のウサギ C D R を相同的なヒト重鎖配列の上へ取込む、ウサギ抗体から導かれる抗体可変重鎖のヒト化の新規戦略を提供する。

【0034】

[00034] さらにより具体的には、本発明は、ウサギ抗体可変重鎖及び軽鎖ポリペプチドから導かれるヒト化可変重鎖及び／又は軽鎖と適正な相同的なヒト抗体可変重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含んでなるヒト化抗体及びヒト化抗体断片を、ウサギ重鎖及び軽鎖 C D R （選択性決定残基）中の対応する選択性決定残基より異なるヒト重鎖及び軽鎖 C D R に含まれる少なくとも特異的残基がヒト化重鎖及び／又は軽鎖領域に保持されて、そしてここでヒト軽鎖中のごく少数か又は皆無のフレームワーク残基とヒト重鎖中のごく少数のフレームワーク残基が対応するウサギフレームワーク残基で置換されるように產生するための新規で改善されたヒト化戦略へ向けられる。

40

【0035】

[00035] なおより具体的には、本発明は、以下の工程を含んでなる、ドナーウサギ軽

50

鎖抗体配列とアクセプターヒト軽鎖抗体配列より導かれるヒト化軽鎖抗体配列を産生するためのヒト化戦略へ向けられる：

(i) 所望の抗原へ特異的に結合するウサギ抗体からウサギ軽鎖抗体配列を入手して、フレームワーク1 (FR1) の始まりからフレームワーク3 (FR3) の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

(ii) FR1 の始まりからFR3 配列の終わりに至る前記ウサギ軽鎖抗体アミノ酸配列を用いて、ヒト軽鎖抗体配列を含有するライブラリーに対する相同性検索を実行して、それに対する実質的な配列相同性を示す、即ち、それに対してアミノ酸レベルで少なくとも80%~90%の同一性を好ましくは保有する、及び／又はヒト軽鎖抗体配列を含有するライブラリー中の他の配列に比べてアミノ酸レベルで最大の配列同一性パーセントを好ましくは保有するヒト軽鎖抗体配列を同定する工程；

(iii) ウサギとヒトの両方の軽鎖配列において、FR1、FR2、FR3、CDR1、CDR2の領域に対応する配置とその特異的残基を同定して、ウサギのこれらの離散領域と選択されるヒト抗体軽鎖を並置する工程；

(iv) ウサギ軽鎖配列のCDR1及びCDR2領域に含まれる対応する選択性決定残基より異なる、選択される相同的なヒト軽鎖配列のCDR1及びCDR2領域中の少なくとも残基がウサギ軽鎖配列のCDR1及びCDR2領域に含まれる対応する選択性決定残基によって置換されているDNA又はアミノ酸配列を構築する工程；

(v) 工程(iv)によって得られるDNA又はアミノ酸配列へ、ウサギCDR3軽鎖抗体配列の対応するアミノ酸残基をコードするDNA配列又はそれを含有するポリペプチドをさらに付ける工程；

(vi) ウサギ軽鎖に含まれるFR4に相同的であり、好ましくは、それより多くても2~4のアミノ酸残基だけ異なるヒト軽鎖フレームワーク4領域(FR4)をさらに選択して、前記ヒトFR4をコードするDNA配列又は前記ヒトFR4の対応するアミノ酸残基を、工程(v)の後で得られるDNA又はアミノ酸配列の上へ付ける工程；並びに

(vii) 工程(i)~(vi)より得られるヒト化ウサギ軽鎖配列をコードするか又は含有するDNA又はアミノ酸配列を合成する工程。

【0036】

[00036] またより具体的には、本発明は、以下の工程を含んでなる、ウサギ重鎖抗体配列よりヒト化重鎖抗体配列を産生するためのヒト化戦略を提供する：

(i) 所望の抗原へ特異的に結合するウサギ抗体からウサギ重鎖抗体配列を入手して、フレームワーク1 (FR1) の始まりからフレームワーク3 (FR3) の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

(ii) FR1 の始まりからFR3 配列の終わりに至る前記ウサギ重鎖抗体アミノ酸配列を使用する相同性検索を(例えば、ヒト生殖細胞系抗体配列含有ライブラリーのBLAST検索によって)実行して、それに対して相同的である、即ち、アミノ酸レベルでそれに対して少なくとも85%~90%の同一性を好ましくは保有する、及び／又はヒト重鎖抗体配列を含有するライブラリー中の他の配列に比べてアミノ酸レベルで最大の配列同一性パーセントを好ましくは保有するヒト重鎖抗体配列を同定する工程；

(iii) ウサギとヒトの両方の重鎖配列において、FR1、FR2、FR3、CDR1、CDR2の領域に対応するその残基を同定して、ウサギのこれらの離散領域を選択される相同的なヒト抗体重鎖の対応領域に対して並置する工程；

(iv) ウサギ重鎖配列のCDR1及びCDR2領域中の対応する選択性決定残基より異なる、選択される相同的なヒト重鎖配列のCDR1及びCDR2領域に含まれる少なくともアミノ酸残基が、ウサギ重鎖配列のCDR1及びCDR2領域に含まれる対応する選択性決定残基によって置換されているDNA又はアミノ酸配列を構築して、ヒト重鎖FR1領域の末端の1~3のアミノ酸をウサギ重鎖FR1の対応する末端の1~3のアミノ酸で置き換えてもよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク2領域の末端アミノ酸をウサギ重鎖フレームワーク2の対応する末端アミノ酸残基で置き換えてもよい；及び／又は、ウサギ重鎖CDR2の末端から4番目のアミノ酸(典型的には、トリプトファン)を対応

10

20

30

40

50

するヒトCDR2残基（典型的には、セリン）で置き換えてもよい工程；

（v）工程（iv）によって得られるDNA又はアミノ酸配列へ、同じウサギ重鎖抗体配列に含まれるウサギ重鎖CDR3の対応するアミノ酸残基をコードするか又は有するDNA配列をさらに付ける工程（このウサギのCDR3は、典型的には5～19のアミノ酸の長さであり、このCDR3は、典型的には残基WGXGに先行する）；

（vi）それに相同的である（好ましくは、ヒト化ウサギ抗体重鎖配列に含まれるFR4より、多くても1～4のアミノ酸残基だけ異なる）ヒト重鎖フレームワーク4領域（FR4）をさらに選択して、前記選択された相同的なヒトFR4をコードするDNA配列又は前記ヒトFR4の対応するアミノ酸残基を、工程（v）の後で得られるDNA又はアミノ酸配列の上へ付ける工程（頻繁には、このヒトFR4 DNA又はポリペプチド配列は、WGQGTLLVTVSSをコードするか又は含む）；並びに

（vii）工程（i）～（vi）より得られるヒト化ウサギ重鎖配列をコードするか又は含有するDNA又はアミノ酸配列を合成する工程。

【0037】

[00037] またより具体的には、本発明は、ウサギ軽鎖抗体配列から導かれる少なくとも1つのヒト化軽鎖抗体配列、及び／又はウサギ抗体重鎖から導かれる少なくとも1つのヒト化重鎖配列（ここでそのようなヒト化軽鎖及び重鎖配列は、ウサギの重鎖及び軽鎖から導かれる）を含有するヒト化抗体又は抗体断片を以下の工程：

（i）所望の抗原へ特異的なウサギ抗体からウサギ軽鎖抗体配列を入手して、フレームワーク1（FR1）の始まりからフレームワーク3（FR3）の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

（ii）FR1の始まりからFR3配列の終わりに至る前記ウサギ軽鎖抗体アミノ酸配列を用いて、ヒト軽鎖抗体配列を含有するライブラリーに対する相同性検索を実行して、それに対して相同的である、即ち、好ましくはそれに対してアミノ酸レベルで少なくとも80%～90%同一である、及び／又はヒト軽鎖抗体配列を含有するライブラリー中の他の配列に比べてアミノ酸レベルで最大の配列同一性パーセントを好ましくは保有するヒト軽鎖抗体配列を同定する工程；

（iii）ウサギとヒトの両方の軽鎖配列において、FR1、FR2、FR3、CDR1、CDR2の領域に対応する配置とその特異的残基を同定して、ウサギ軽鎖のこれらの離散領域を選択される相同的なヒト軽鎖領域の対応領域と並置する工程；

（iv）ウサギのCDR1及びCDR2領域に含まれる対応する選択性決定残基より異なる、選択される相同的なヒト軽鎖配列のCDR1及びCDR2領域に含まれる少なくとも残基がウサギ軽鎖配列の対応するCDR1及びCDR2領域によって置換されているDNA又はアミノ酸配列を構築する工程；

（v）工程（iv）によって得られるDNA又はアミノ酸配列へ、ウサギ軽鎖抗体配列に含まれるCDR3の対応するアミノ酸残基をコードするか又は有するDNA配列をさらに付ける工程（このCDR3は、典型的には9～15のアミノ酸残基を含み、しばしばFGG残基に先行する）；

（vi）前記ウサギ抗体軽鎖に含まれるFR4に相同的であり、そのヒトFR4がウサギ抗体軽鎖配列のFR4より多くても2～4のアミノ酸残基だけ異なるヒト軽鎖フレームワーク4領域（FR4）をさらに選択して、前記ヒトFR4をコードするDNA配列又は前記ヒトFR4の対応するアミノ酸残基を、工程（v）の後で得られるDNA又はアミノ酸配列の上へ付ける工程；並びに

（vii）工程（i）～（vi）より得られるヒト化ウサギ軽鎖配列をコードするか又は含有するDNA又はアミノ酸配列を合成する工程に従って産生すること、及び／又は以下の工程：

（i）所望の抗原へ特異的なウサギ抗体からウサギ重鎖抗体配列を入手して、フレームワーク1（FR1）の始まりからフレームワーク3（FR3）の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

（ii）FR1の始まりからFR3配列の終わりに至る前記ウサギ重鎖抗体アミノ酸配

10

20

30

40

50

列を使用する相同性検索を（例えば、ヒト生殖細胞系抗体配列含有ライブラリーの B L A S T 検索によって）実行して、それに対してアミノ酸レベルで少なくとも 80%～90% 同一である、及び／又はヒト重鎖抗体配列を含有するライブラリー中の他の配列に比べてアミノ酸レベルで最大の配列同一性パーセントを好ましくは保有するヒト重鎖抗体配列を同定する工程；

（i i i）ウサギとヒトの両方の重鎖配列において、F R 1、F R 2、F R 3、C D R 1、C D R 2 の領域に対応するその残基を同定して、ウサギ抗体のこれらの離散領域を選択される相同的なヒト抗体重鎖に対して並置する工程；

（i v）ウサギ重鎖の C D R 1 及び C D R 2 領域に含まれる対応する選択性決定残基より異なる、選択される相同的なヒト重鎖配列の C D R 1 及び C D R 2 領域に含まれる少なくとも残基が、ウサギ重鎖配列の対応する C D R 1 及び C D R 2 領域によって置換されている D N A 又はアミノ酸配列を構築する工程；及び／又は、ヒト重鎖 F R 1 領域の最終の 1～3 のアミノ酸をウサギ重鎖 F R 1 の末端の 1～3 のアミノ酸で置き換えてもよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク 2 領域の末端アミノ酸をウサギ重鎖フレームワーク 2 の末端アミノ酸残基で置き換えてもよい；及び／又は、ウサギ重鎖 C D R 2 の末端から 4 番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）を対応するヒト C D R 2 残基（典型的には、セリン）でさらに置き換えてもよい工程；

（v）工程（i v）によって得られる D N A 又はアミノ酸配列へ、同じウサギ重鎖抗体配列に含まれるウサギ重鎖 C D R 3 の対応するアミノ酸残基をコードするか又は有する D N A 配列をさらに付ける工程（この C D R 3 は、典型的には 5～19 のアミノ酸の長さであり、典型的には残基 W G X G に先行する）；

（v i）それに相同的である（即ち、好ましくは、ヒト化ウサギ抗体重鎖配列に含まれる F R 4 より、多くても 2～4 のアミノ酸残基だけ異なる）ヒト重鎖フレームワーク 4 領域（F R 4）をさらに選択して、前記選択された相同的なヒト F R 4 をコードする D N A 配列又は前記ヒト F R 4 の対応するアミノ酸残基を、工程（v）の後で得られる D N A 又はアミノ酸配列の上へ付ける工程（頻繁には、このヒト F R 4 D N A 又はポリペプチド配列は、W G Q G T L V T V S S をコードするか又は含む）；並びに

（v i i）工程（i）～（v i）より得られるヒト化ウサギ重鎖配列をコードするか又は含有する D N A 又はアミノ酸配列を合成する工程；及び、前記ヒト化軽鎖及び重鎖の少なくとも 1 つを含有する核酸配列又はポリペプチドを産生する工程を含んでなる、ウサギ重鎖抗体配列よりヒト化重鎖抗体配列をさらに産生すること；そして

上記の工程に従って産生される少なくとも 1 つのヒト化軽鎖配列及び／又は少なくとも 1 つのヒト化重鎖をコードする D N A 又はそれを含有するポリペプチドを含有する、ヒト化抗体又は抗体断片をコードする D N A 又はヒト化抗体又は抗体断片を含んでなるポリペプチドを合成することのためのヒト化戦略を提供する。

【0038】

【00038】 本発明は、前記ヒト化抗体 D N A 又はポリペプチド、所望の定常ドメイン、好ましくはヒトの定常ドメイン及び／又は付加物（直接的又は間接的な）をカルボキシ又はアミノ末端で、所望のエフェクター部分、例えば、毒素、薬物、放射性核種、フルオロフォア、酵素、サイトカイン、シグナルペプチドのような輸送配列、及び親和性単離を促進するポリペプチドへ付けることをさらに考慮する。

【0039】

【00039】 本発明は、より具体的な態様において、T N F - α 又は I L - 6 への結合特異性を有する特異的なヒト化抗体とその断片、特に特定のエピトープ特異性及び／又は機能特性を有するヒト化抗体へ向けられる。

【0040】

【00040】 本発明の 1 つの態様には、I L - 6 又は T N F - α 及び／又は T N F - α / T N F R 又は I L - 6 / I L - 6 R 複合体へ結合することが可能な特異的なヒト化抗体とその断片が含まれる。

【0041】

10

20

30

40

50

【00041】 本発明の別の態様は、50ピコモル濃度未満の結合親和性 (K_{ds}) 及び／又は $10^{-4} S^{-1}$ 以下の K_{off} 値を保有するヒト化抗体に関する。

【00042】 本発明の好ましい態様において、上記のヒト化抗体及びヒト化抗体断片及びバージョンは、所望の抗原へ特異的なウサギ抗体を分泌するウサギ免疫細胞 (Bリンパ球) 又は (さほど好ましくはないが) ハイブリドーマから導かれるものである。加えて、ヒト化に使用されるウサギ抗体は、ヒト生殖細胞系抗体配列に対するその相同性 (配列同一性) に基づいてさらに選択されてよい。これらの抗体は、本主題のヒト化方法を使用するときはより少ないアミノ酸が修飾されるので、ヒト化の後で機能特性の保持をさらに促進する場合がある。

【0042】

10

【00043】 本発明のさらなる態様は、例えば、ウサギ免疫細胞によって分泌される抗体とそれをコードするポリヌクレオチドから導かれる、例えば、本発明に従って産生されるヒト化 V_H 、 V_L 、及び CDR ポリペプチドを含有する、例えば $IL-6$ 又は $TNF-\alpha$ に特異的な、本発明に従って産生されるヒト化抗体断片と、これらの抗体断片をそれらをコードするポリヌクレオチドの、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 及び／又は $TNF-\alpha/TNFR$ 又は $IL-6/IL-6R$ 複合体のような所望の抗原を認識することが可能な新規の抗体及びポリペプチド組成物の創製における使用へ向けられる。

【0043】

【00044】 本発明はまた、本主題のヒト化ウサギ抗体及び断片のコンジュゲート、例えば、1以上の機能性又は検出可能部分へコンジュゲートしたヒト化抗 $TNF-\alpha$ 又は抗 $IL-6$ 抗体とその結合断片を考慮する。本発明はまた、前記ヒト化抗 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、又は抗 $TNF-\alpha/TNFR$ 、又は抗 $IL-6/IL-6R$ 複合抗体とその結合断片を作製する方法を考慮する。1つの態様において、結合断片には、限定されないが、ヒト化 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、及び $scFv$ 断片が含まれる。

20

【0044】

【00045】 本発明の態様は、所望の抗原へ特異的な本主題のヒト化抗体、例えば、ヒト化抗 $TNF-\alpha$ 又は抗 $IL-6$ 抗体の、特別な抗原、例えば、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、又はそれらの異常な発現に関連した疾患及び障害の診断、評価、及び治療への使用にさらに関する。本発明はまた、本発明によるヒト化抗体断片、例えば、ヒト化抗 $TNF-\alpha$ 又は抗 $IL-6$ 抗体の、特別な抗原、例えば、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、又はそれらの異常な発現に関連した疾患及び障害の診断、評価、及び治療への使用を考慮する。

30

【0045】

【00046】 他の本発明の態様は、組換え宿主細胞、好ましくは、二倍体ピキア (*Pichia*) のような二倍体酵母や他の酵母株において、ウサギ抗体配列から導かれる新規で改善されたヒト化プロトコールに従って産生されるヒト化抗体及びヒト化抗体断片の産生に関する。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】 【00047】 図1は、本発明のウサギ抗体ヒト化プロトコールを概略的に図示するフローチャートを含む。

40

【図2】 【00048】 図2は、具体的に例示した可変軽鎖及び可変重鎖ポリペプチド配列、即ち抗原特異的なウサギ抗体可変軽鎖ポリペプチド及び可変重鎖ポリペプチド配列、並びにヒト生殖細胞系配列のライブラリーにおいて同定される相同的なヒト配列と本発明のヒト化プロトコールを使用して産生される最終のヒト化配列のアライメントを含有する。ここではフレームワーク領域を $FR1 \sim FR4$ として同定する。相補性決定領域 (CDR) は、 $CDR1 \sim CDR3$ として同定される。アミノ酸残基は、図に示すように番号付けて、 $Kabat$ 番号付与体系に従う。最初のウサギ配列を、図と上記において、ウサギ可変軽鎖及び可変重鎖ポリペプチド配列についてそれぞれ $RbtVL$ 及び $RbtVh$ と呼ぶ。ヒト生殖細胞系配列のライブラリーに同定される $FR1$ の始まりから $FR3$ 配列の終わりに至る中で最も類似したヒト生殖細胞系抗体配列のうち3つをウサギ配列の下に並置する

50

。このウサギ配列に最も似ているとみなされるヒト配列がウサギ配列のすぐ下にある。本発明のヒト化戦略のこの例示では、最も似ているヒト生殖細胞系配列は、軽鎖ではL 1 2 Aであり、重鎖では3-6 4-0 4である。ヒトのC D R 3配列は示していない。最も似ているヒトフレームワーク4配列をウサギフレームワーク4配列の下に並置する。垂直の線は、ウサギ残基が同じ位置のヒト残基の1以上と同一である残基を示す。太字の残基は、その位置でのヒト残基が同じ位置のウサギ残基と同一であることを示す。最終のヒト化配列を、可変軽鎖配列と可変重鎖配列についてそれぞれV L hとV H hと呼ぶ。この図では、下線を施した残基は、その残基がその位置でウサギ残基と同じであるが、3つの並置したヒト配列中のその位置でヒト残基とは異なることを示す。

【図3】[00049] 図3は、同様に、I L-6 特異性抗体から導かれる同じ親ウサギ可変重鎖及び軽鎖配列、相同的なヒト生殖細胞系配列、及び本主題のヒト化戦略を使用してそれより産生した2つのヒト化可変重鎖及び軽鎖配列のアライメントを含有する。具体的には、この図は、元のウサギ軽鎖及び重鎖配列、3つの相同的なヒト生殖細胞系配列、及びここで「a g g r e s」及び「c o n s r v」と呼ぶ2つのヒト化重鎖配列と2つのヒト化軽鎖配列を含有する。このアライメントから、このヒト化「a g g r e s」及び「c o n s r v」配列は、特異的なウサギフレームワーク残基の存在又は非存在において互いに異なることがわかる。

【図4】[00050] 図4は、本発明のヒト化手順を使用して産生された、h I L-6 及びT N F- α に特異的なウサギ抗体から導かれるキメラ抗体対ヒト化抗体の解離定数を比較する。

【図5】[00051] 図5は、本発明のヒト化手順を使用して産生した、特異的なウサギ抗I L-6 抗体から導かれる異なるヒト化抗体によるI L-6 依存型T 1 1 6 5細胞増殖の拮抗作用を比較する実験を含有する。

【図6】[00052] 図6は、本発明のヒト化手順を使用して産生した、特異的なウサギ抗h I L-6 抗体から導かれる異なるヒト化抗体によるh I L-6 依存型T 1 1 6 5細胞増殖の拮抗作用を比較する実験を含有する。

【図7】[00053] 図7は、ウサギ抗h T N F- α 抗体から導かれるキメラ抗T N F- α 抗体とそれより本発明のヒト化手順に従って産生したヒト化抗体とのh T N F- α 依存型細胞傷害性の拮抗作用を比較する実験を含有する。

【好ましい態様の詳細な説明】

【0 0 4 7】

[00054] 諸定義

[00055] 本発明は、記載される特別な方法論、プロトコール、細胞系、動物の種又は属、及び試薬に、そのようなものは変わり得るので、限定されないと理解されたい。また、本明細書に使用する用語は、特別な態様について記載することのみを目的とし、付帯の特許請求項によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを企図しないことも理解されたい。

【0 0 4 8】

[00056] 本明細書に使用するように、単数形の「a」、「an」（不定冠詞）及び「the」（定冠詞）には、文脈が明らかに他のことを示さなければ、複数の指示物が含まれる。例えば、「細胞」への言及には、複数のそのような細胞が含まれ、「タンパク質」への言及には、1以上のタンパク質と当業者に知られているその同等物、等への言及が含まれる。本明細書に使用するすべての技術及び科学用語は、明らかに他のことを示さなければ、本発明が属する当該技術分野の当業者が通常理解するものと同じ意味を有する。

【0 0 4 9】

[00057] 本明細書に使用するように、「アクセプター」及び「アクセプター抗体」又は「元の」又は「親」抗体という用語は、本発明に従ってウサギ抗体可変配列よりヒト化抗体配列を産生するために使用する配列を提供するか又はコードするヒトの抗体又は核酸の配列のことを指す。典型的には、アクセプター抗体は、フレームワーク領域の1以上の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくと

も 96、97、98、99 又は 100% のアミノ酸配列を提供する。いくつかの態様において、「アクセプター」という用語は、定常領域（複数）を提供するか又はコードする抗体又は核酸配列のことを指す。なお別の態様において、「アクセプター」という用語は、フレームワーク領域と定常領域（複数）の 1 以上を提供するか又はコードする抗体又は核酸配列のことを指す。具体的な態様において、「アクセプター」という用語は、フレームワーク領域の 1 以上のアミノ酸配列の少なくとも 80%、好ましくは、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96、97、98、99、又は 100% を提供するか又はコードするヒトの抗体又は核酸配列のことを指す。この態様に従えば、アクセプターは、ヒト抗体の 1 以上の特異的位置に生じない、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、又は少なくとも 10 のアミノ酸残基を含有してよい。アクセプターフレームワーク領域及び／又はアクセプター定常領域（複数）は、例えば、生殖細胞系抗体遺伝子、成熟した抗体遺伝子、機能性抗体（例えば、当該技術分野でよく知られた抗体、開発中の抗体、又は市販されている抗体）より導くか又は入手してよい。

10

【0050】

[00058] 本明細書に使用するように、「抗体」及び「抗体（複数）」という用語は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、単鎖 Fv s (s c F v)、単鎖抗体、単ドメイン抗体、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、ジスルフィド連結 F v s (s d F v)、抗イディオタイプ（抗 I d）抗体、及び、上記のいずれものエピトープ結合断片のことを指す。特に、抗体には、免疫グロブリン分子と免疫グロブリン分子の免疫活性断片、即ち、抗原結合部位を含有する分子が含まれる。免疫グロブリン分子は、どんな種類（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、及び I g Y）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 1、I g G 3、I g G 4、I g A 1、及び I g A 2）又はサブクラスであってもよい。注記したように、本発明は、全般に、所望の抗原へ特異的なウサギドナー抗体の特異的残基と相同的なヒト（アクセプター）抗体配列を組み合わせることによって産生されるヒト化抗体及びヒト化抗体断片に関する。

20

【0051】

[00059] 典型的な抗体は、2つの軽鎖と対合した2つの重鎖を含有する。完全長の重鎖は、約 50 k D のサイズ（ほぼ 446 のアミノ酸の長さ）であり、重鎖可変領域遺伝子（約 116 のアミノ酸）と定常領域遺伝子によってコードされる。本発明では、所望の抗原特異性及び機能特性のあるウサギ抗体の特異的な C D R 残基を含有するヒト化可変軽鎖及びヒト化可変重鎖の配列をコードして、単にエクソンと呼ばれる場合がある、本質的には2つの核酸及び遺伝成分を一緒に融合して、この構築体が適正な発現系において発現されるときにヒト化可変領域の発現を生じる、ヒト化可変鎖をコードする構築体を産生する。

30

【0052】

[00060] 本主題のヒト化抗体は、定常領域が存在するならば、ヒトの定常領域を含有するものである。α、γ（I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）、δ、ε、及び μ 配列のような異なるアイソタイプの重鎖定常領域をコードする異なる定常領域遺伝子がある。完全長の軽鎖は、約 25 K d の長さ（ほぼ 214 のアミノ酸の長さ）であり、軽鎖可変領域遺伝子（約 110 アミノ酸）と κ 又は λ 定常領域遺伝子によってコードされる。軽鎖及び／又は重鎖の可変領域は、抗原へ結合することに責任があり、定常領域は、抗体に典型的なエフェクター機能に責任がある。

40

【0053】

[00061] 本明細書に使用するように、「類似体」という用語は、タンパク質性薬剤（例、抗体のような、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチド）の文脈において、第二のタンパク質性薬剤と類似又は同一の機能を保有するが、必ずしも第二のタンパク質性薬剤と類似又は同一のアミノ酸配列を含まないし、第二のタンパク質性薬剤と類似又は同一の構造を保有しないタンパク質性薬剤を意味する。類似のアミノ酸配列を有するタンパク質

50

性薬剤は、以下の少なくとも1つを満たす第二のタンパク質性薬剤のことを指す：(a) 第二のタンパク質性薬剤のアミノ酸配列に少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも96、97、98、99又は100%同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質性薬剤；(b) 少なくとも5の隣接アミノ酸残基、少なくとも10の隣接アミノ酸残基、少なくとも15の隣接アミノ酸残基、少なくとも20の隣接アミノ酸残基、少なくとも25の隣接アミノ酸残基、少なくとも40の隣接アミノ酸残基、少なくとも50の隣接アミノ酸残基、少なくとも60の隣接アミノ酸残基、少なくとも70の隣接アミノ酸残基、少なくとも80の隣接アミノ酸残基、少なくとも90の隣接アミノ酸残基、少なくとも100の隣接アミノ酸残基、少なくとも125の隣接アミノ酸残基、又は少なくとも150の隣接アミノ酸残基の第二のタンパク質性薬剤をコードするヌクレオチド配列ヘストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質性薬剤；並びに(c) 第二のタンパク質性薬剤をコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも96、97、98、99又は100%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質性薬剤。第二のタンパク質性薬剤に類似した構造があるタンパク質性薬剤は、第二のタンパク質性薬剤に類似した二次、三次、又は四次構造を有するタンパク質性薬剤のことを指す。タンパク質性薬剤の構造は、限定されないが、ペプチド配列決定、X線結晶学、核磁気共鳴、円二色性、及び結晶学的電子顕微鏡法が含まれる、当業者に知られた方法によって決定することができる。

【0054】

[00062] 2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するには、その配列を最適な比較目的のために並置する（例えば、第二のアミノ酸又は核酸配列との最適なアライメントのために、第一のアミノ酸又は核酸配列の配列中にギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第一の配列中の位置が第二の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占められるとき、その分子は、その位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、その配列によって共有される同一位置数の関数である（即ち、同一性% = 同一の重なり位置の数 / 位置の全数 × 100%）。1つの態様において、2つの配列は、同じ長さである。注記したように、本発明は、そのヒト化戦略において、対応する「ヒト化」変異体を導くために使用されるウサギ軽鎖又は重鎖可変領域の対応する可変領域に対して高い配列同一性又は相同性を保有するヒト可変領域を選択する。典型的には、選択されるヒト可変領域は、CDR1及びCDR2領域を含む可変領域の特定部分にわたり対応するウサギ可変配列に対して少なくとも80%以上の配列同一性を保有するものである。理想的には、選択されるヒト可変領域は、BLAST検索のような適正な方法によって決定されるように、ヒト抗体可変領域エンコーディング配列を含有するヒト生殖細胞系配列の集団又はライブラリーの他のすべてのメンバーと比較して、ウサギ可変領域に対して最大の相同性又は配列同一性を保有するものである。加えて、本主題のヒト化戦略に使用される好ましいか又はリード候補のウサギ抗体は、（比較可能な親和性及び／又は機能特性のある）ウサギ抗体の集団より、ヒト生殖細胞系配列に対するその高い相同性又は配列同一性に基づいて選択してよい。このことが可能であるのは、本発明が、好ましい態様において、IL-6のような抗原標的上の異なるエピトープを認識する、その標的に対して特異的な多数（例、10以上）の高親和性抗体を生じることが見出されたB細胞免疫化プロトコルを使用して、その親抗体を産生するからである。いくつかの事例では、この同一性がきわめて実質的であり得るので、齧歯動物やモルモットのような、ヒト化に典型的に使用される他の動物に対して、ヒトとウサギの抗

体の間でこの高い配列同一性があるために、ヒト化抗体と親抗体がヒト被検者において類似の免疫原性特性を保有する場合がある。

【0055】

[00063] 2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを使用して達成することもできる。2つの配列の比較のために利用される数学アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877 において改良された、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268 のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403 の N B L A S T 及び X B L A S T プログラムへ取り込まれている。B L A S T ヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同的なヌクレオチド配列を得るための N B L A S T ヌクレオチドプログラム変数セット（例えば、スコア＝100、語長＝12）で実施することができる。B L A S T タンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同的なアミノ酸配列を得るための X B L A S T プログラム変数セット（例えば、スコア＝50、語長＝3）で実施することができる。比較目的のためにギャップのあるアライメントを得るには、Altschul et al, 1997, Nucleic acids Res. 25:3389-3402 に記載されるような G a p p e d B L A S T を利用することができる。あるいは、P S I - B L A S T を使用して、分子間の遠い関係を検出する反復検索を実行することができる（同上）。B L A S T、G a p p e d B L A S T、及び P S I - B l a s t のプログラムを利用するときは、各プログラムの（例えば、X B L A S T 及び N B L A S T の）デフォルト変数を使用することができる（例えば、N C B I ウェブサイトを参照のこと）。配列の比較に利用される数学アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17 のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、G C G 配列アライメントソフトウェアパッケージの一部である A L I G N プログラム（バージョン2, 0）に取り込まれている。アミノ酸配列を比較するために A L I G N プログラムを利用するときは、P A M 1 2 0 荷重残基表、12のギャップ長ペナルティ、及び4のギャップペナルティを使用することができる。

【0056】

[00064] 2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを許容することを伴うか又は伴わずに、上記の記載に類似した技術を使用して決定することができる。同一性パーセントを計算するときには、典型的には、正確な適合だけを計数する。

【0057】

[00065] 本明細書に使用するように、「C D R」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域のことを指す。重鎖及び軽鎖の可変領域のそれぞれに3つのC D Rがあり、可変領域のそれぞれについて、C D R 1、C D R 2、及びC D R 3と表記される。これらのC D Rの正確な境界は、異なる体系に従って異なって画定されてきた。Kabat (Kabat et al., 「Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学的に興味深いタンパク質の配列)」(米国国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ (1987) 及び (1991)) により記載された体系は、抗体のどの可変領域へも適用可能な明白な残基番号付けシステムを提供するだけでなく、3つのC D Rを画定する正確な残基境界を提供する。これらのC D Rは、K a b a t (カバット) C D Rと呼ばれる場合がある。Chothia と共同研究者 (Chothia & Leska, J. MoL Biol. 196:901-917 (1987) 及び Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) は、K a b a t C D R 内のあるサブ部分が、アミノ酸配列のレベルでは大きな多様性を有するにもかかわらず、ほとんど同一のペプチド骨格コンホメーションをとることを見出した。これらのサブ部分は、L 1、L 2、及びL 3、又はH 1、H 2、及びH 3と表記された（ここで「L」と「H」は、軽鎖領域と重鎖領域をそれぞれ指定する）。これらの領域は、C h o t h i a C D R と呼ばれる場合があるが、これらは、K a b a t C D R と重なる境界を有する。K a b a t C D R と重なるC D R を画定する他の境界が Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) 及び MacCallum (J MoI Biol 262 (5):732-45 (1996)) によって記載されている。なお他のC D R 境界の画定は、上記の体系の1つに厳密には従わないかもしれないが、それでもK a b a t C D R と重なるもの

である。しかし、それらは、特別な残基又は残基の群、又はC D R全体でも抗原結合に有意には影響を及ぼさないという予測又は実験の知見に照らして、短縮又は延長される場合がある。本明細書に使用する方法は、上記の体系のいずれにも従って画定されるC D Rを利用してよいが、好ましい態様は、K a b a t又はC h o t h i aにより画定されるC D Rを使用する。下記に記載のように、これらのC D Rは、「選択性決定残基」と呼ばれる、抗原結合又は認識に重要であると考えられる離散残基を含有する。

【0058】

[00066] 本発明での「選択性決定残基」という表現は、抗原認識及び／又は抗原結合に有意に関与すると考えられる、ウサギ可変重鎖及び軽鎖ポリペプチドに含まれる特異的アミノ酸残基のことを指す。本発明のヒト化戦略において、ウサギC D R領域中のこれらの選択性決定残基は、ウサギC D R残基のすべてを選択される相同的なヒト可変領域中の対応残基へ比較することによって、そしてこの比較に基づいて、推定の「選択性決定残基」を同定することによって実験的に同定される。本質的には、特別なC D R残基は、それがK a b a t番号付けスキームによる対応するヒトC D R残基より実質的に異なるならば、選択性決定残基であるとみなされる。本明細書の「実質的に」は、ウサギとヒトの生殖細胞系C D Rアミノ酸残基の間の有意な化学的な差又は構造上の差、例えば、電荷の差、帯電対非帯電、嵩張った側鎖の有無、等のことを指す。例えば、ウサギC D Rアミノ酸残基が嵩張った側鎖を有して、対応するヒトC D Rアミノ酸残基がそれを有さなければ、そのウサギC D R残基は、選択性決定残基であるとみなされて、ヒト化可変領域に保持されることになる。加えて、ウサギ可変領域中のC D Rアミノ酸残基が塩基性アミノ酸であり、ヒトC D R中の対応するアミノ酸残基が酸性アミノ酸残基であるならば、ウサギC D R中のこの残基は、選択性決定残基であると判定されて、ヒト化可変領域に保持されることになる。対照的に、ウサギC D R中のC D R残基とヒトC D R中の対応残基がともに酸性であるか又はともに類似の嵩張った側鎖を含有するならば、その残基は、選択性決定残基ではないと判定されて、このヒトC D R残基は、そのヒト化可変領域において変更されない。ヒト化可変領域中に保持すべき特異的なウサギC D R残基を選択するために本発明のヒト化戦略において使用する、ウサギC D R領域中の特異的残基を「選択性決定」又は「非選択性決定」として分類するこの手段は、アミノ酸の置換又は修飾を保守的又は非保守的のいずれと見ることができると判定するためにタンパク突然変異誘発において使用される判定基準に類似している。しかしながら、本発明は、典型的には、ヒト化可変領域ポリペプチド中のそのような選択性決定残基のすべてを、これら残基のそれぞれが抗原認識及び／又は結合に役立つという仮説に基づいて保持するが、ある事例では、異なるヒト化可変鎖変異体の合成時に、特別な推定の選択性決定残基の保持がヒト化可変領域を含有する抗体の抗原結合に関して非本質的であると判定される可能性があると理解されたい。例えば、親ウサギ抗体が標的抗原に対してきわめて高い抗原親和性を有するならば、すべての推定の選択性決定残基を保持することは、望まれる抗原結合認識と親和性を保有するヒト化抗体を導くのに本質的ではないかもしれない。このことは、異なるヒト化可変領域ポリペプチドを合成することによって実験的に判定することができる。加えて、特別なC D R残基が選択性決定残基であるかないかを同定することは、選択される相同的なヒト可変領域の特別な単数又は複数の配列に依存して変化する場合がある。

【0059】

[00067] 「可変領域」又は「V R」という表現は、抗体を抗原へ結合させることに直接関与する、抗体中の軽鎖及び重鎖の各対内のドメインのことを指す。各重鎖は、一端に可変ドメイン(V_H)を有して、いくつかの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、そしてその他端に定常ドメイン有し；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一定常ドメインと並置して、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並置する。

【0060】

[00068] 「フレームワーク領域」又は「F R」という表現は、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域内のフレームワーク領域の1以上のことを指す(Kabat, E. A. et al., 「Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫学的に目的のタンパク質の配列)」(

米国国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ (1987) を参照のこと)。フレームワーク領域又は F R には、抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域内に含まれる C D R の間に挟まれるアミノ酸配列領域が含まれる。

【0061】

[00069] 本明細書に使用するように、「カノニカル (canonical)」残基という表現は、Chothia et al. (J. Mol Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), いずれも参照により本明細書に組み込まれる) によって定義されるような特別なカノニカル C D R 構造を規定する C D R 又はフレームワーク中の残基のことを指す。Chothia et al. によれば、多くの抗体の C D R の決定的な部分は、アミノ酸配列のレベルでの大きな多様性にかかわらず、ほとんど同一のペプチド骨格コンホメーションを有する。それぞれのカノニカル構造は、主に、ループを形成するアミノ酸残基の隣接セグメントについてペプチド骨格ねじれ角のセットを特定する。

10

【0062】

[00070] 本明細書に使用するように、「誘導体」という表現は、タンパク質性薬剤 (例、抗体のような、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチド) の文脈において、アミノ酸残基の置換、欠失、及び／又は付加の導入によって改変されたアミノ酸配列を含むタンパク質性薬剤のことを指す。本明細書に使用される「誘導体」という表現はまた、あらゆる種類の分子のタンパク質性薬剤への共有付加によって修飾されたタンパク質性薬剤のことを指す。例えば、限定のためではないが、抗体は、例えば、非グリコシル化、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク分解切断、細胞性リガンド又は他のタンパク質への連結、等によって修飾してよい。好ましくは、抗体は、非グリコシル化される。タンパク質性薬剤の誘導体は、限定されないが、特異的な化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成、等が含まれる、当業者に知られた技術を使用する化学的な修飾によって産生してよい。さらに、タンパク質性薬剤の誘導体は、1 以上の非古典的アミノ酸を含有してよい。タンパク質性薬剤の誘導体は、それが誘導されたタンパク質性薬剤と類似又は同一の機能を保有する。

20

【0063】

[00071] 本明細書に使用するように、「障害」又は「疾患」という表現は、被検者の状態について交換可能的に使用される。

30

[00072] 本明細書に使用するように、「ドナー」又は「ドナー抗体」という表現は、1 以上の C D R を提供する抗体のことを指す。好ましい態様において、ドナー抗体は、フレームワーク領域が入手されるか又は導かれる抗体とは異なる種由来の抗体である。ヒト化抗体の文脈において、「ドナー抗体」という用語は、1 以上の C D R を提供する非ヒト (ウサギ) 抗体のことを指す。

【0064】

[00073] 本明細書に使用するように、「有効量」という表現は、障害又はその 1 以上の症状の重症度及び／又は期間を抑制又は改善する、障害の進行を妨げる、障害の退縮を引き起こす、障害に関連した 1 以上の症状の再発、進展、発症、又は進行を妨げる、障害を検出する、又は別の療法 (例えば、予防又は療法剤) の予防又は療法効果 (複数) を増強又は向上させるのに十分である療法剤の量のことを指す。

40

【0065】

[00074] 本明細書に使用するように、「エピトープ」という表現は、動物において、好ましくは哺乳動物において、そして最も好ましくはヒトにおいて抗原性又は免疫原性の活性を有するポリペプチド又はタンパク質の断片のことを指す。免疫原性の活性を有するエピトープは、動物において抗体応答を誘発するポリペプチド又はタンパク質の断片である。抗原性の活性を有するエピトープは、当業者によく知られたどの方法によっても、例えばイムノアッセイによって定量されるように、抗体が免疫特異的に結合するポリペプチド又はタンパク質の断片である。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。言及したように、本発明は、好ましくは、抗原標的上の多様な異なるエピトープに対

50

して高い親和性のある抗体を生じることが見出されているクローンB細胞免疫化アプローチを使用して、特異的な標的抗原に対するウサギ抗体を産生する。

【0066】

[00075] 本明細書に使用するように、「融合タンパク質」という表現は、第一のタンパク質又はポリペプチド又はその機能性断片、類似体、又は誘導体のアミノ酸配列と、異種のタンパク質、ポリペプチド又はペプチド（即ち、第一のタンパク質又はその断片、類似体、又は誘導体とは異なる、第二のタンパク質又はポリペプチド又はその断片、類似体、又は誘導体）のアミノ酸配列を含むポリペプチド又はタンパク質（限定されないが、抗体が含まれる）のことを指す。1つの態様において、融合タンパク質は、異種のタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドへ融合した予防又は療法剤を含む。この態様に従えば、異種のタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドは、予防又は療法剤とは異なる種類のものであってもなくてもよい。例えば、免疫調節活性のある2つの異なるタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドと一緒に融合させて、融合タンパク質を生成してよい。好ましい態様において、融合タンパク質は、元のタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドの、異種のタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドへ融合される前の活性に比べて改善された活性を保持するか又は有する。

10

【0067】

[00076] 本明細書に使用するように、「断片」という表現は、別のポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも5の隣接アミノ酸残基、少なくとも10の隣接アミノ酸残基、少なくとも15の隣接アミノ酸残基、少なくとも20の隣接アミノ酸残基、少なくとも25の隣接アミノ酸残基、少なくとも40の隣接アミノ酸残基、少なくとも50の隣接アミノ酸残基、少なくとも60の隣接アミノ酸残基、少なくとも70の隣接アミノ酸残基、少なくとも80の隣接アミノ酸残基、少なくとも90の隣接アミノ酸残基、少なくとも100の隣接アミノ酸残基、少なくとも125の隣接アミノ酸残基、少なくとも150の隣接アミノ酸残基、少なくとも175の隣接アミノ酸残基、少なくとも200の隣接アミノ酸残基、又は少なくとも250の隣接アミノ酸残基のアミノ酸配列を含んでなる、ペプチド又はポリペプチド（限定されないが、抗体が含まれる）のことを指す。具体的な態様において、タンパク質又はポリペプチドの断片は、そのタンパク質又はポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。

20

【0068】

[00077] 本明細書に使用するように、「機能性断片」という表現は、第二の異なるポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも5の隣接アミノ酸残基、少なくとも10の隣接アミノ酸残基、少なくとも15の隣接アミノ酸残基、少なくとも20の隣接アミノ酸残基、少なくとも25の隣接アミノ酸残基、少なくとも40の隣接アミノ酸残基、少なくとも50の隣接アミノ酸残基、少なくとも60の隣接アミノ酸残基、少なくとも70の隣接アミノ酸残基、少なくとも80の隣接アミノ酸残基、少なくとも90の隣接アミノ酸残基、少なくとも100の隣接アミノ酸残基、少なくとも125の隣接アミノ酸残基、少なくとも150の隣接アミノ酸残基、少なくとも175の隣接アミノ酸残基、少なくとも200の隣接アミノ酸残基、又は少なくとも250の隣接アミノ酸残基のアミノ酸配列を含んでなるペプチド又はポリペプチド（限定されないが、抗体が含まれる）のことを指し、ここで前記ポリペプチド又はタンパク質は、この第二の異なるポリペプチド又はタンパク質の少なくとも1つの機能を保持する。具体的な態様において、ポリペプチド又はタンパク質の断片は、そのタンパク質又はポリペプチドの少なくとも2、3、4、又は5つの機能を保持する。好ましくは、特別な抗原へ免疫特異的に結合する抗体の断片は、抗原へ免疫特異的に結合する能力を保持する。

30

40

【0069】

[00078] 本明細書に使用するように、「生殖細胞系抗体遺伝子」又は「遺伝子断片」という表現は、特別な免疫グロブリンの発現のための遺伝子再構成及び突然変異をもたらす成熟化プロセスを受けていない、非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列のことを指す（例えば、Shapiro et al., Crit Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (200

50

2); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001) を参照のこと)。本発明の様々な態様によって提供される利点の1つは、生殖細胞系抗体遺伝子は、成熟した抗体遺伝子よりも、その種の個体に特徴的な必須のアミノ酸配列構造を保存する可能性が高く、それ故に、その種において療法的に使用されるときに、外来起源として認識される可能性がより低いという認識に由来する。

【0070】

[00079] 本明細書に使用するように、「重要(key)」残基という表現は、抗体、特にヒト化抗体の結合特異性及び／又は親和性により大きく影響する、可変領域内にある一定の残基のことを指す。これには、上記に言及した選択性決定残基が含まれ、そしてさらに、限定されないが、以下の1以上が含まれる：CDR残基に隣接している残基、潜在的なグリコシル化部位（N又はO-グリコシル化部位のいずれもあり得る）、希少残基、抗原と相互作用することが可能な残基、CDRと相互作用することが可能な残基、カノニカル残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間の接触残基、Vernier 帯内の残基、及び可変重鎖CDR1の Chothia 定義と第一の重鎖フレームワークの Kabat 定義の間で重なる領域中の残基。

【0071】

[00080] 本明細書に使用するように、「腫瘍壊死因子- α 」又は(TNF- α)又はTNF- α という表現には、GenBankタンパク質受入番号：CAA26669（ホモ・サピエンスTNF- α ）として利用可能な以下の233のアミノ酸配列：

[00081] M S T E S M I R D V E L A E E A L P K K T G G P Q G S R R C L F L S
L F S F L I V A G A T T L F C L L H F G V I G P Q R E E F P R D L S L I S P L A
Q A V R S S S R T P S D K P V A H V V A N P Q A E G Q L Q W L N R R A N A L L A
N G V E L R D N Q L V V P S E G L Y L I Y S Q V L F K G Q G C P S T H V L L T H
T I S R I A V S Y Q T K V N L L S A I K S P C Q R E T P E G A E A K P W Y E P I
Y L G G V F Q L E K G D R L S A E I N R P D Y L D F A E S G Q V Y F G I I A L（
配列番号1）だけでなく、このTNF- α アミノ酸配列のあらゆるプレプロ、プロ、成熟、可溶、及び／又は膜結合形態、並びにこの配列の突然変異体（ムテイン）、スプライス変異体、オーソログ、相同体、及び変異体が含まれる。

【0072】

[00082] 本明細書での「インターロイキン-6」又は(IL-6)という表現には、GenBankタンパク質受入番号：NP_000591として利用可能な以下の212のアミノ酸配列：M N S F S T S A F G P V A F S L G L L L V L P A A F P A P V P P
G E D S K D V A A P H R Q P L T S S E R I D K Q I R Y I L D G I S A L R K E T C
N K S N M C E S S K E A L A E N N L N L P K M A E K D G C F Q S G F N E E T C L
V K I I T G L L E F E V Y L E Y L Q N R F E S S E E Q A R A V Q M S T K V L I Q
F L Q K K A K N L D A I T T P D P T T N A S L L T K L Q A Q N Q W L Q D M T T H
L I L R S F K E F L Q S S L R A L R Q M（配列番号2）だけでなく、このIL-6アミノ酸配列のあらゆるプレプロ、プロ、及び成熟形態、並びにこの配列の突然変異体と対立遺伝子変異体が含まれる変異体が含まれる。

【0073】

[00083] 本明細書での「接合コンピテント酵母種」という表現には、培養において安定的に維持することができるあらゆる二倍体酵母が広く含まれると企図される。そのような酵母の種は、一倍体及び二倍体の形態で存在する。二倍体細胞は、適正な条件の下で、二倍体形態で無限数の世代の間増殖する場合がある。二倍体細胞はまた、発芽して一倍体細胞を形成することができる。加えて、連続した接合は、栄養要求性二倍体のさらなる接合により、四倍体株をもたらすことができる。本発明において、二倍体又は倍数体の酵母細胞は、好ましくは、接合又はスフェロプラスト融合によって産生される。

【0074】

[00084] 本発明の1つの態様において、接合コンピテント酵母は、アルキシオザイマ(Arxiozyma)；アスコボトリオザイマ(Ascobotryozyma)；シテロマイセス(Citeromyc

es) ; デバリオマイセス (Debaryomyces) ; デッケラ (Dekkera) ; エレモセシウム (Eremothecium) ; イサットヘンキア (Issatchenkia) ; カザクスタニア (Kazachstania) ; クルイベロマイセス (Kluyveromyces) ; コダマエア (Kodamaea) ; ロデロマイセス (Lodderomyces) ; パチソレン (Pachysolen) ; ピキア (Pichia) ; サッカロマイセス (Saccharomyces) ; サツニスボラ (Saturnispora) ; テトラピシスボラ (Tetrapisispora) ; トルラスボラ (Torulaspora) ; ウィリオプシス (Williopsis) ; 及びザイゴサッカロマイセス (Zygosaccharomyces) 属が含まれるサッカロマイセス科のメンバーである。本発明において潜在的に有用な他の種類の酵母には、ヤロウィア (Yarrowia) 、ロドスポリジウム (Rhodosporidium) 、カンジダ (Candida) 、ハンセヌラ (Hansenula) 、フィロバシウム (Filobasium) 、フィロバシデッラ (Filobasidella) 、スポリディオボロス (Sporidiobolus) 、ブレラ (Bullera) 、ロイコスボリジウム (Leucosporidium) 、及びフィロバシデッラ (Filobasidella) が含まれる。

10

【0075】

[00085] 本発明の好ましい態様において、接合コンピテント酵母は、ピキア属のメンバーである。本発明のさらに好ましい態様において、ピキア属の接合コンピテント酵母は、以下の種の1つである：ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 、ピキア・メタノリカ (Pichia metanolica) 、及びハンセヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha) (ピキア・アングスタ (Pichia angusta)) 。本発明の特に好ましい態様において、ピキア属の接合コンピテント酵母は、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 種である。

【0076】

20

[00086] 本明細書での「一倍体酵母細胞」という表現は、その通常のゲノム (染色体) 全体の各遺伝子の単一コピーを有する酵母細胞のことを指す。

[00087] 本明細書での「倍数体酵母細胞」という表現は、その通常のゲノム (染色体) 全体の各遺伝子の1より多いコピーを有する酵母細胞のことを指す。

【0077】

[00088] 本明細書での「二倍体酵母細胞」という表現は、典型的には2つの一倍体細胞の融合 (接合) のプロセスによって形成される、その通常のゲノム全体の各遺伝子の2つのコピー (対立遺伝子) を有する酵母細胞のことを指す。

【0078】

[00089] 本明細書での「四倍体酵母細胞」という表現は、典型的には2つの二倍体細胞の融合 (接合) のプロセスによって形成される、その通常のゲノム全体の各遺伝子の4つのコピー (対立遺伝子) を有する細胞のことを指す。四倍体は、2、3、又は4の異なるカセットを担う場合がある。そのような四倍体は、サッカロミセス・セレビスエ (S. cerevisiae) において、ホモ接合型の自家不和合性 a/α 及び α/α 又は a/α 二倍体を選択的に接合させることによって、そしてピキアにおいては、栄養要求性二倍体を得るために一倍体を連続的に接合させることによって入手することができる。例えば、[met his] 一倍体を [ade his] 一倍体と接合させて、二倍体 [his] を得ることができ；そして、[met arg] 一倍体を [ade arg] 一倍体と接合させて、二倍体 [arg] を得て；次いで、この二倍体 [his] x 二倍体 [arg] によって四倍体の原栄養体を得ることができる。当業者には、二倍体細胞の利益及び使用への言及が四倍体細胞へも適用され得ることが理解されよう。

30

40

【0079】

[00090] 「酵母接合」という表現は、2つの一倍体酵母細胞が自然に融合して1つの二倍体酵母細胞を生成するプロセスのことを指す。

[00091] 本明細書での「減数分裂」という表現は、二倍体酵母細胞が減数分裂を受けて、4つの一倍体胞子産物を生成するプロセスのことを指す。次いで、それぞれの胞子は、発芽して、一倍体の植物的に成長する細胞系を生成する。

【0080】

[00092] 本明細書での「選択可能マーカー」という表現は、例えば、形質転換イベントを介してその遺伝子を受容する細胞に増殖表現型 (物理増殖の特徴) を付与する遺伝子

50

又は遺伝子断片である選択可能マーカーのことを指す。選択可能マーカーは、その選択可能マーカー遺伝子を受容していない細胞が増殖し得ない条件の下で、その細胞が選択増殖培地において生存及び増殖することを可能にする。選択可能マーカー遺伝子は、一般に、抗生物質又は他の薬物、温度（2つの t s 突然変異体を交配するか又は t s 突然変異体が形質転換されるときに）への抵抗性を細胞に付与する遺伝子のようなポジティブ選択可能マーカー遺伝子；生合成遺伝子を有さないすべての細胞により必要とされる特定栄養素のない培地において増殖する能力を細胞に付与する生合成遺伝子、又は野生型遺伝子を有さない細胞では増殖し得ないことを細胞に付与する突然変異誘発させた生合成遺伝子のようなネガティブ選択可能マーカー遺伝子；等が含まれる、いくつかの種類へ分類される。好適なマーカーには、限定されないが：Z E O；G 4 1 8；L Y S 3；M E T 1；M E T 3 a；A D E 1；A D E 3；U R A 3；等が含まれる

10

【00093】 本明細書での「発現ベクター」という表現は、標的宿主細胞内の異種タンパク質の発現のための操作を促進するエレメントを含有する D N A ベクターのことを指す。簡便には、形質転換のための配列の操作と D N A の産生を細菌の宿主、例えば大腸菌において初めに実施して、通常ベクターには、細菌の複製起点と適正な細菌選択マーカーを含めて、そのような操作を促進する配列が含まれる。選択マーカーは、選択培養基において増殖される形質転換された宿主細胞の生存及び増殖に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含有するベクターで形質転換されていない宿主細胞は、その培養基において生き残らない。典型的な選択遺伝子は、（a）抗生物質や他の毒素に対する抵抗性を付与する、（b）栄養要求欠乏症を補う、又は（c）複合培地より利用し得ない必須栄養素を供給するタンパク質をコードする。

20

【0081】

【00094】 本発明の方法における使用に適した発現ベクターには、形質転換された酵母株を同定するための選択可能な栄養要求性又は薬剤マーカーを含めて、酵母特異的な配列がさらに含まれる。さらに、薬剤マーカーは、酵母宿主細胞中のベクターのコピー数を増幅させるために使用される場合がある。

【0082】

【00095】 目的のポリペプチドコーディング配列は、そのポリペプチドの酵母細胞における発現をもたらす転写及び翻訳の調節配列へ機能可能的に連結している。これらのベクター成分には、限定されないが、以下の1以上を含めてよい：エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列。ポリペプチドの選択のための配列には、例えば、シグナル配列、等も含めてよい。発現ベクターが酵母ゲノムの中へしばしば組み込まれるので、酵母の複製起点は、任意選択的である。

30

【0083】

【00096】 本発明の1つの態様において、目的のポリペプチドは、該ポリペプチドの酵母二倍体細胞からの最適化された分泌をもたらす配列に対して、機能可能的に連結しているか又は融合している。

【0084】

【00097】 核酸配列に関連した「機能可能的に連結している」という表現は、これらの配列が互いに機能的な関連の中に置かれていることを意味する。例えば、シグナル配列をコードする D N A は、それがポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されるならば、そのポリペプチドの D N A へ機能可能的に連結している可能性があり；プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響を及ぼすならば、コーディング配列へ機能可能的に連結している。一般に、「機能可能的に連結している」は、連結している D N A 配列が隣接していて、分泌リーダーの場合は、隣接してリーディングフレームにあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣接していなくてもよい。連結は、簡便な制限部位でのライゲーションによって、あるいは当業者に馴染みの P C R / 組換え法により達成される（G a t e w a y ^R T e c h n o l o g y；I n v i t r o g e n，カリフォルニア州カールスバッド）。そのような部位が存在しなければ、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを慣用の実践に従って使用する。

40

50

【0085】

[00098] 「プロモーター」という表現は、構造遺伝子の開始コドンに対して上流（5'）に（一般に、約100～1000塩基対以内に）位置して、それらが機能可能的に連結している特別な核酸配列の転写及び翻訳を制御する非翻訳配列のことを指す。そのようなプロモーターは、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、及び抑制性プロモーター（リプレッサーの非存在に応答して転写のレベルを高める）といういくつかのクラスへ分類される。誘導性プロモーターは、培養条件のある変化（例えば、栄養素の存在又は非存在又は温度変化）に応答して、その制御下にあるDNAからの転写の増加レベルを始動させることができる。

【0086】

[00099] 酵母プロモーター断片は、相同的組換えや酵母ゲノム中の同じ部位への発現ベクターの組込みの部位としても役立つ場合がある；あるいは、選択可能マーカーは、相同的組換えの部位として使用される。ピキアの形質転換については、Cregg et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376-3385 に記載されている。

【0087】

[00100] ピキア由来の好適なプロモーターの例には、AOXIプロモーター（Cregg et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9:1316-1323）；ICL1プロモーター（Menendez et al. (2003) *Yeast* 20(13): 1097-108）；グリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター（GAP）（Waterham et al. (1997) *Gene* 186 (1): 37-44）；及びFLD1プロモーター（Shen et al. (1998) *Gene* 216(1):93-102）が含まれる。GAPプロモーターは、強い構成的プロモーターであり、AOX及びFLD1プロモーターは、誘導性である。

【0088】

[00101] 他の酵母プロモーターには、ADHI、アルコールデヒドロゲナーゼII、GAL4、PHO3、PHO5、Pyk、及びそれらより導かれるキメラプロモーターが含まれる。その上に、本発明では、哺乳動物、昆虫、植物、爬虫類、両生類、ウイルス、及び鳥のプロモーターのような非酵母プロモーターも使用してよい。最も典型的には、プロモーターは、哺乳動物プロモーター（潜在的には、発現される遺伝子に対して内因性の）を含むか、又は酵母系において効率的な転写をもたらす酵母又はウイルスのプロモーターを含む。

【0089】

[00102] 目的のポリペプチドは、直接的にだけでなく、異種ポリペプチド（例えば、シグナル配列、又は成熟したタンパク質又はポリペプチドのN末端に特異的な切断部位を有する他のポリペプチド）との融合ポリペプチドとしても組換え的に産生してよい。一般に、シグナル配列は、ベクターの成分であっても、それは、ベクターへ挿入されるポリペプチドコーディング配列の一部であってもよい。選択される異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞内で利用可能な標準経路の1つを介して認識されて処理されるものである。サッカロミセス・セレビシエ（*S. cerevisiae*）α因子のブレブシグナルは、ピキア・パストリス（*P. pastoris*）由来の多様な組換えタンパク質の選択に有効であることが証明されている。他の酵母シグナル配列には、接合因子αシグナル配列、インベルターゼシグナル配列、及び他の分泌される酵母ポリペプチドから導かれるシグナル配列が含まれる。その上に、これらのシグナルペプチド配列は、二倍体酵母発現系において増強される分泌をもたらすように工学処理してよい。注目される他のシグナルには、分泌されるタンパク質に対して異種であっても、分泌されるタンパク質のネイティブ配列であってもよい、哺乳動物のシグナル配列も含まれる。シグナル配列には、ブレブシグナル配列が含まれ、いくつかの事例では、プロペプチド配列が含まれる場合がある。免疫グロブリン鎖上に見出されるシグナル配列、例えば、K28ブレブプロトキシニン配列、PHA-E、FACE、ヒトMCP-1、ヒト血清アルブミンシグナル配列、ヒトIg重鎖、ヒトIg軽鎖、等が含まれる、多くのそのようなシグナル配列が当該技術分野で知られている。例えば、Hashimoto et. al. *Protein Eng* 11(2) 75 (1998); 及び Kobayashi et. al. *Therapeutic Ap*

10

20

30

40

50

heresis 2(4) 257 (1998) を参照のこと。

【00090】

[000103] 転写は、転写アクチベータ配列をベクターへ挿入することによって高めることができる。これらのアクチベータは、通常約10～300塩基対である、DNAのcis作用性エレメントであって、その転写を高めるようにプロモーターに作用する。転写エンハンサーは、相対的に配向や位置に無関係であり、転写単位に対して5'及び3'に、イントロンの内部に、並びにコーディング配列それ自体の内部に見いだされてきた。エンハンサーは、コーディング配列に対して5'又は3'の位置で発現ベクターへ継いでよいが、好ましくは、プロモーターから5'の部位に位置づけられる。

【00091】

[000104] 真核宿主細胞に使用される発現ベクターは、転写の終結のために、そしてmRNAを安定化させるために必要な配列も含有してよい。そのような配列は、通常、真核又はウイルスのDNA又はcDNAの非翻訳領域にある、翻訳終結コドンに対して3'より入手可能である。これらの領域は、mRNAの非翻訳部分にあるポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。

【00092】

[000105] 上記に列挙した構成要素の1以上を含有する好適なベクターの構築は、標準的なライゲーション技術又はPCR／組換え法を利用する。単離したプラスミド又はDNA断片を切断し、特別設計して、組換え法に必要とされるか又はそれによるプラスミドを産生することが望まれる形態で再連結させる。構築したプラスミド中の正確な配列を確定する分析のために、このライゲーション混合物を使用して宿主細胞を形質転換させ、適宜抗生物質抵抗性（例、アンピシリン又はZeocin）によって、成功した形質転換体を選択する。この形質転換体よりプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼによって解析し、及び／又は配列決定する。

【00093】

[000106] DNA配列をベクターへ挿入するには、断片の制限及びライゲーションへの代替法として、att部位と組換え酵素に基づく組換え法を使用してよい。そのような方法については、例えば、Landy (1989) Ann. Rev. Biochem. 58: 913-949 によって記載されていて、当業者に知られている。そのような方法は、λ及び大腸菌によりコードされる組換えタンパク質の混合物によって媒介される分子間DNA組換えを利用する。組換えは、相互作用するDNA分子上の特異的な付着（att）部位の間で起こる。att部位の記載については、ラムダII、ワインバーグ監修（ニューヨーク州コールドスプリングハーバー：コールドスプリングハーバー出版局）211-250 頁中、Weisberg and Landy (1983) 「Site-Specific Recombination in Phage Lambda（ラムダファージにおける部位特異的組換え）」を参照のこと。この組換え部位の側面にあるDNAセグメントは、組換えの後で、att部位が、それぞれの親ベクターにより供与される配列より構成されるハイブリッド配列になるように切り換えられる。この組換えは、あらゆるトポロジーのDNAの間で起こり得る。

【00094】

[000107] Att部位は、目的の配列を適正なベクターヘライゲートすること；attB部位を含有するPCR産物を特異的プライマーの使用により産生すること；att部位を含有する適正なベクターヘクローン化されるcDNAライブラリーを産生すること；等によって、目的の配列へ導入することができる。

【00095】

[000108] フォールディングは、本明細書に使用するように、アミノ酸残基の間の相互作用がその構造を安定化するように作用する、ポリペプチド及びタンパク質の三次元構造のことを指す。構造を決定するときには、非共有性の相互作用が重要であるが、通常、目的のタンパク質は、2つのシステイン残基によって形成される分子内及び／又は分子間の共有ジスルフィド結合を有するものである。天然に存在するタンパク質及びポリペプチド又はその誘導体及び変異体にとって、適切なフォールディングとは、典型的には、最適な

10

20

30

40

50

生物活性をもたらす配置であって、簡便には、活性、例えば、リガンド結合、酵素活性、等のアッセイによってモニターすることができる。

【0096】

[000109] いくつかの事例において、例えば、所望の産物が合成起源である場合、生物活性に基づくアッセイは、さほど意味がないであろう。そのような分子の適切なフォールディングは、物理特性、エネルギー考察、モデリング試験、等に基づいて決定してよい。

【0097】

[000110] 発現宿主は、フォールディングやジスルフィド結合形成を増強する1以上の酵素、即ち、フォルダーゼ、シャペロニン、等をコードする配列の導入によってさらに修飾してよい。その酵母宿主細胞では、当該技術分野で知られるようなベクター、マーカー、等を使用して、そのような配列を構成的又は誘導的に発現させることができる。好ましくは、所望される発現パターンに十分な転写調節エレメントが含まれる配列は、標的指向される方法論により、酵母ゲノムに安定的に組み込まれる。

【0098】

[000111] 例えば、真核PDIは、タンパク質システイン酸化とジスルフィド結合異性化の効率的な触媒であるだけでなく、シャペロン活性も示す。PDIの同時発現は、多数のジスルフィド結合を有する活性タンパク質の産生を促進することができる。また注目されるのは、BIP（免疫グロブリン重鎖結合タンパク質）；シクロフィリン；等の発現である。本発明の1つの態様では、一倍体の親株のそれぞれが異なったフォールディング酵素を発現する。例えば、ある株がBIPを発現して、他の株がPDI又はその組合せを発現してよい。

【0099】

[000112] 「所望のタンパク質」又は「標的タンパク質」という用語は、交換可能的に使用されて、一般に、本明細書に記載されるヒト化抗体又はその結合部分のことを指す。本発明において、出発材料として有用な抗体を本発明に従って産生するための供給源は、ウサギである。数多くの抗体コーディング配列がすでに記載されている；そして他のものは、当該技術分野でよく知られた方法によって産生することができる。その例には、キメラ抗体、ヒト抗体、及び他の非ヒト哺乳動物の抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体（scFv）、ラクダ抗体、SIMP S、並びにFab、Fab'、F(ab')₂、等のような抗体断片が含まれる。

【0100】

[000113] 例えば、抗体又は抗原結合断片は、遺伝子工学によって産生することができる。この技術では、他の方法と同様に、抗体産生細胞を所望の抗原又は免疫原へ感作させる。抗体産生細胞より単離したメッセンジャーRNAを鋳型として使用して、PCR増幅を使用してcDNAを作製する。増幅した免疫グロブリンcDNAの適正な切片の発現ベクターへの挿入によって、最初の抗原特異性を保持する1つの重鎖遺伝子と1つの軽鎖遺伝子をそれぞれ含有するベクターのライブラリーを産生する。重鎖遺伝子ライブラリーを軽鎖遺伝子ライブラリーと組み合わせることによって、コンビナトリアルライブラリーを構築する。これは、重鎖と軽鎖（抗体分子のFab断片又は抗原結合断片に似ている）を同時発現するクローンのライブラリーをもたらす。これらの遺伝子を担うベクターを宿主細胞へ同時トランスフェクトする。このトランスフェクトされた宿主において抗体遺伝子合成が誘導されるとき、重鎖及び軽鎖のタンパク質は、自己集合して、抗原又は免疫原を用いたスクリーニングによって検出され得る活性抗体を産生する。

【0101】

[000114] 目的の抗体コーディング配列には、ネイティブ配列によってコードされるもの、並びに、遺伝暗号の縮重性のために、開示される核酸に対して配列が同一でない核酸とその変異体が含まれる。変異体ポリペプチドには、アミノ酸（aa）の置換、付加、又は欠失が含まれ得る。アミノ酸置換は、保守的なアミノ酸置換、又は、グリコシル化部位を改変すること、又は機能に必要なでない1以上のシステイン残基の置換又は欠失によってミスフォールディングを最小化することのような、非本質的なアミノ酸を消失させる置換

であり得る。変異体は、タンパク質の特別な領域（例、機能性ドメイン、触媒性アミノ酸残基、等）の増強された生物活性を保持するか又は有するように設計することができる。変異体にはまた、本明細書に開示されるポリペプチドの断片、特に、生物活性のある断片及び／又は機能性ドメインに対応する断片が含まれる。クローン化遺伝子の *in vitro* 突然変異誘発用の技術が知られている。本発明にまた含まれるのは、タンパク質分解的な分解に対するその抵抗性を向上させるか又は溶解特性を最適化するか又はそれらを治療薬剤としてより適したものにするように、通常の分子生物学技術を使用して修飾されたポリペプチドである。

【0102】

[000115] キメラ抗体は、ある種の抗体産生細胞より得られる可変軽鎖及び重鎖領域（ V_L 及び V_H ）を別の種からの定常軽鎖及び重鎖領域と組み合わせることによる組換え手段によって作製することができる。典型的には、キメラ抗体は、ヒトドメインが優勢である抗体を産生するために、齧歯動物又はウサギの可変領域とヒトの定常領域を利用する。そのようなキメラ抗体の産生については当該技術分野でよく知られていて、標準手段（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 5, 624, 659 号に記載されるような）によって達成することができる。さらに、本発明のキメラ抗体のヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5、IgG6、IgG7、IgG8、IgG9、IgG10、IgG11、IgG12、IgG13、IgG14、IgG15、IgG16、IgG17、IgG18 又は IgG19 の定常領域より選択され得ると考慮される。

【0103】

[000116] 「所望の分泌される異種ポリペプチドを安定的に発現するか又は延長期間の間発現する倍数体酵母」という表現は、前記ポリペプチドを少なくとも数日～1週間、より好ましくは少なくとも1ヶ月、なおより好ましくは少なくとも1～6ヶ月間、そしてさらにより好ましくは1年以上の間、発現の閾値レベル（典型的には、少なくとも10～25mg／リットルで、好ましくは、実質的にそれ以上）で分泌する酵母培養物のことを指す。

【0104】

[000117] 「所望される量の組換えポリペプチドを分泌する倍数体酵母培養物」という表現は、安定的に、又は延長期間の間、少なくとも10～25mg／リットルの異種ポリペプチド、より好ましくは、少なくとも50～500mg／リットル、そして最も好ましくは、500～1000mg／リットル以上の異種ポリペプチドを分泌する培養物のことを指す。

【0105】

[000118] ポリヌクレオチド配列の遺伝暗号に従った翻訳がポリペプチド配列を生じる（即ち、ポリヌクレオチド配列がポリペプチド配列を「コードする」）ならば、ポリヌクレオチド配列は、ポリペプチド配列に「対応する」。2つの配列が同じポリペプチド配列をコードするならば、一方のポリヌクレオチド配列は、他方のポリヌクレオチド配列に「対応する」。

【0106】

[000119] DNA構築体の「異種」領域又は「異種ドメイン」という表現は、より大きなDNA分子内にあって、自然界ではそのより大きな分子と関連して見出されない、同定可能なDNAのセグメントのことを指す。従って、この異種領域が哺乳動物の遺伝子をコードするとき、その遺伝子は、通常、その起源生物のゲノム中の哺乳動物ゲノムDNAの側面でないDNAの側面に置かれることになる。異種領域の別の例は、コーディング配列それ自体が天然に見出されない構築体（例えば、ゲノムコーディング配列がイントロンを含有するcDNA、又はネイティブ遺伝子とは異なるコドンを含む合成配列）である。対立遺伝子変異又は天然に存在する突然変異イベントでは、本明細書に定義されるようなDNAの異種領域を生じない。

【0107】

[000120] 「コーディング配列」という表現は、タンパク質又はペプチドの配列に（遺伝暗号に照らして）対応するか又はそれをコードするコドンのインフレーム配列のことを指す。2つのコーディング配列は、その配列又はそれらの相補配列が同じアミノ酸配列をコードするならば、互いに対応する。適正な調節配列と関連したコーディング配列を転写してポリペプチドへ翻訳することができる。ポリアデニル化シグナルと転写終結配列は、通常、コーディング配列に対して3'に位置するものである。

【0108】

[000121] 本明細書での「ベクター」という表現は、DNA、RNA、又はタンパク質のような外来物質を生物又は宿主細胞へ導入するために使用される材料のことを指す。典型的なベクターには、組換えウイルス（ポリヌクレオチド用）とリボソーム（ポリペプチド用）が含まれる。「DNAベクター」は、別のポリヌクレオチドセグメントをそれへ付着させて、付着したセグメントの複製をもたらすことができる、プラスミド、ファージ、又はコスミドのようなレプリコンである。本明細書において、「発現ベクター」は、適正な宿主細胞によるポリペプチド合成を指令する調節配列を含有するDNAベクターである。これは、通常、RNAポリメラーゼへ結合してmRNAの転写を開始させるプロモーター、並びに、mRNAのポリペプチド（複数）への翻訳を指令するリボソーム結合部位と開始シグナルを意味する。ポリヌクレオチド配列を発現ベクターへ適切な部位に正確なリーディングフレームで取り込むことに続く、適正な宿主細胞のベクターによる形質転換によって、前記ポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの産生が可能になる。

【0109】

[000122] ポリヌクレオチド配列の文脈における「増幅」という用語は、特別な核酸配列の多数のコピーの *in vitro* 産生のことである。増幅された配列は、通常、DNAの形態である。そのような増幅を行うための多様な技術が Van Brunt (1990, Bio/Technol., 8(4):291-294) による概説論文に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応又はPCRは、核酸増幅の原型であり、本発明でのPCRの使用は、他の好適な増幅の例示としてみなすべきである。

【発明を実施するための形態】

【0110】

[000123] 本主題のヒト化方法は、あらゆるウサギ抗体又はその可変領域（即ち、これらの抗体は、異なる所望の抗原へ特異的に結合することができる）をヒト化するのに総じて適用可能である。その上、本主題のヒト化アプローチは、他の種の抗体、例えば、異なるウサギ及び野ウサギが含まれる、ウサギ目又はウサギ科の他の哺乳動物のような、ウサギに近縁の動物由来の抗体をヒト化するのに適用可能であり得る。これらの哺乳動物は、家畜化されたウサギに近縁であるので、本発明においてヒト化の供給源又はウサギ抗体として使用される、家畜化ウサギ種に近縁の可変配列を保有するはずである。従って、ヒト化抗TNF- α 又は抗IL-6抗体の合成に対応する以下の記載は、例示である。本発明のヒト化プロトコールは、図1に概略的に図示されて、以下に詳しく記載される。以下に開示する方法の記載は、全般に適用可能な規則だけでなく、図2に1例として示す特異的配列へのそれらの規則の応用を提供する。

【0111】

[000124] 本発明は、本主題のヒト化戦略の、どの所望の抗原にも特異的である、ヒト化重鎖及び軽鎖と抗体及び抗体断片を産生することへの使用を考慮する。好適な抗原の例には、増殖因子、サイトカイン、酵素、ホルモン、腫瘍特異抗原、癌遺伝子、他のようなヒトタンパク質、アレルゲン、細菌、ウイルス、真菌、酵母、寄生虫、他のような感染作用体由来の抗原、毒素、等が含まれる。下記の実施例は、TNF- α 及びIL-6に特異的なヒト化ウサギ抗体を得るのに有用な方法を例示して、本発明の方法とその内在する利点を例解する。

【0112】

[000125] 本発明はまた、本発明に従って産生されるヒト化重鎖又は軽鎖の1以上が含

まれる抗体断片を考慮する。本発明は、具体的には、 $TNF-\alpha$ 又は $IL-6$ への結合特異性を有するヒト化抗体断片を考慮する。そのような抗体断片は、以下の非限定的な形態の 1 以上に存在してよい： Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、及び単鎖 Fv 抗体の形態。

【0113】

[000126] 先に言及したように、本発明の好ましくて例示の態様において、ヒト化に使用される抗体は、本明細書で言及するヒト化の方法の開始に先立って、1 以上のクローン抗原特異的なウサギ B 細胞集団より生じるか又は選択される。

【0114】

[000127] 上記に述べたように、抗体とその断片は、化学リンカーのようなエフェクター部分、例えば、蛍光色素、酵素、基質、生物発光材料、放射活性材料、及び化学発光部分のような検出可能部分、又は、例えば、ストレプトタビジン、アビジン、ビオチン、サイトトキシン、細胞傷害剤、及び放射活性材料のような機能性部分を付加するように、翻訳後に修飾されてよい。

【0115】

[000128] 検出可能部分に関して言えば、さらなる例示の酵素には、限定されないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、及びルシフェラーゼが含まれる。さらなる例示の蛍光材料には、限定されないが、ローダミン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、ジクロロトリアジニルアミン、フィコエリスリン、及び塩化ダンシルが含まれる。さらなる例示の化学発光部分には、限定されないが、ルミノールが含まれる。さらなる例示の生物発光材料には、限定されないが、ルシフェリンとエクオリンが含まれる。さらなる例示の放射活性材料には、限定されないが、ヨウ素 ^{125}I 、炭素 ^{14}C 、イオウ ^{35}S 、トリチウム (3H)、及びリン ^{32}P が含まれる。

【0116】

[000129] 機能性部分に関して言えば、例示の細胞傷害剤には、限定されないが、メトトレキセート、アミノプテリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン；メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、マイトマイシン C、ロムスチン (CCNU)、1-メチルニトロソ尿素、シクロホスファミド、メクロレタミン、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、cis-ジクロロジアミン白金 (II) (DDP) (シスプラチン)、及びカルボプラチン (パラプラチン) のようなアルキル化剤が含まれ；アントラサイクリン類には、ダウノルビシン (以前は、ダウノマイシン)、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、デトルビシン、カルミノマイシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトザントロン、及びビサントレンが含まれ；抗生物質には、ダクチノマイシン (アクチノマイシン D)、プレオマイシン、カリケアマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン (AMC) が含まれ；そして、植物アルカロイド、ビンクリスチン、及びビンブラスチンのような抗有糸分裂剤が含まれる。他の細胞傷害剤には、パクリタキセル (タキソール)、リシン、シュードモナス外毒素、ゲンシタビン、サイトカラシン B、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、エトポシド、テノポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、プロカルバジン、ヒドロキシア尿素、アスパラギナーゼ、コルチコステロイド、ミトタン (O, P'- (DDD))、インターフェロン、及びこれらの細胞傷害剤の混合物が含まれる。

【0117】

[000130] さらに細胞傷害剤には、限定されないが、カルボプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、ゲンシタビン、カリケアマイシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、マイトマイシン C、アクチノマイシン D、シクロホスファミド、ビンクリスチン

、及びブレオマイシンのような化学療法剤が含まれる。リシン、ジフテリア毒素、及びシュードモナス毒素のような植物及び細菌由来の有毒酵素も、ヒト化抗体又はその結合断片へコンジュゲートして、細胞タイプ特異的な殺傷試薬を産生することができる (Youle, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:5483 (1980); Gilliland, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4539 (1980); Krolick, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5419 (1980))。

【0118】

[000131] 他の細胞傷害剤には、米国特許第 6, 653, 104 号において Goldenberg により記載されるような細胞傷害性リボヌクレアーゼが含まれる。本発明の態様はまた、 α 又は β 粒子を放射する放射性核種が複合体形成剤の使用を伴うか又は伴わずに抗体又はその結合断片へ安定的に共役している、放射免疫コンジュゲートに関する。そのような放射性核種には、リン-32 (^{32}P)、スカンジウム-47 (^{47}Sc)、銅-67 (^{67}Cu)、ガリウム-67 (^{67}Ga)、イットリウム-88 (^{88}Y)、イットリウム-90 (^{90}Y)、ヨウ素-125 (^{125}I)、ヨウ素-131 (^{131}I)、サマリウム-153 (^{153}Sm)、ルテチウム-177 (^{177}Lu)、レニウム-186 (^{186}Re)、又はレニウム-188 (^{188}Re) のような β 放射体とアスタチン-211 (^{211}At)、鉛-212 (^{212}Pb)、ビスマス-212 (^{212}Bi) 又は 213 (^{213}Bi)、又はアクチニウム-225 (^{225}Ac) のような α 放射体が含まれる。

【0119】

[000132] 当該技術分野では、例えば、Hunter et al, Nature 144:945 (1962); David et al, Biochemistry 13:1014 (1974); Pain et al, J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); 及び Nygren, J., Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982) により記載される方法のような、抗体又はその結合断片を検出可能部分、等へコンジュゲートするための方法が知られている。

【0120】

[000133] 本明細書に記載の態様には、本明細書に示す抗体、抗体断片、ポリペプチド、可変領域、及び CDR に実質的には相同である変異体及び同等物がさらに含まれる。これらには、例えば、保守的置換突然変異 (即ち、類似したアミノ酸による 1 以上のアミノ酸の置換) を含めてよい。例えば、保守的な置換は、あるアミノ酸を同じ一般クラス内の別のアミノ酸で (例えば、ある酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸で、ある塩基性アミノ酸を別の塩基性アミノ酸で、又はある中性アミノ酸を別の中性アミノ酸で) 置換することを指す。保守的なアミノ酸置換によって企図されることは、当該技術分野でよく知られている。

【0121】

[000134] 別の態様において、本発明は、本明細書に示す抗体断片、可変領域、及び CDR のヒト化ポリペプチド配列のどの 1 以上に対しても少なくとも 90% 以上の配列相同性を有するポリペプチド配列を考慮する。より好ましくは、本発明は、本発明に従って産生されるヒト化抗体断片のどの 1 以上に対しても、少なくとも 95% 以上の配列相同性、なおより好ましくは、少なくとも 98% 以上の配列相同性、そしてさらにより好ましくは、少なくとも 99% 以上の配列相同性を有するヒト化ポリペプチド配列を考慮する。

【0122】

[000135] 本発明のヒト化プロトコールの重大な利点は、本発明に従って産生されるヒト化可変配列を含有する抗体の結合親和性が、親ウサギ抗体に比べて、実質的にはインタクト (不変) なままであることである。好ましくは、ヒト化抗 IL-6 又は TNF- α 抗体とその断片のような、本発明によって産生されるヒト化抗体は、IL-6、TNF- α 、又はヒトの療法に有用な別の抗原に対する結合特異性を有して、 $5 \times 10^{-7} \text{M}^{-1}$ 、 10^{-7}M^{-1} 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}^{-1}$ 、 10^{-8}M^{-1} 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}^{-1}$ 、 10^{-9}M^{-1} 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}^{-1}$ 、 10^{-10}M^{-1} 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}^{-1}$ 、 10^{-11}M^{-1} 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}^{-1}$ 、 10^{-12}M^{-1} 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}^{-1}$ 、 10^{-13}

M^{-1} 、 $5 \times 10^{-14} M^{-1}$ 、 $10^{-14} M^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-15} M^{-1}$ 、又は $10^{-15} M^{-1}$ 以下の解離定数 (K_D) でその抗原へ結合するものである。好ましくは、本主題のヒト化抗体は、IL-6 又はTNF- α のようなその抗原標的へ $5 \times 10^{-10} M^{-1}$ 以下の解離定数で結合する。

【0123】

[000136] 本発明の別の態様において、ウサギ抗体より産生されるヒト化抗体及び断片は、IL-6 又はTNF- α のような抗原に対する結合特異性を $10^{-4} S^{-1}$ 、 $10^{-5} S^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6} S^{-1}$ 、 $10^{-6} S^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7} S^{-1}$ 、又は $10^{-7} S^{-1}$ 以下の解離速度で保有する。

【0124】

[000137] 本発明のさらなる態様において、本発明の本主題のヒト化抗体とその断片の活性は、TNF- α のような抗原への結合特異性を有して、特別な抗原の機能に作動する (agonize) か又は拮抗する活性を示す。好ましくは、抗原は治療標的であり、ヒト化抗体は、IL-6 又はTNFのような特別な抗原、又はヒト腫瘍ポリペプチド、自己抗原、アレルゲン、又は感染作用体に特異的な抗原のような別の治療標的に関連した疾患及び障害の症状を改善又は抑制するか、あるいはそれを治療する。

【0125】

[000138] B細胞のスクリーニング及び単離

[000139] 注記したように、本発明は、あらゆるウサギ抗体、即ち、どの所望の抗原へも特異的なウサギ抗体を効率的にヒト化することに応用可能な一般法を提供する。これらの抗体は、ハイブリドーマ細胞、血清から、又はウサギ抗体又は他のウサギ目の動物のような近縁種の抗体を分泌する免疫細胞から導いてよい。免疫細胞を使用するならば、これらの細胞は、以下のB細胞単離プロトコールによって導かれる、所望の標的抗原に特異的な抗体を分泌するB細胞を構成することが好ましい。このプロトコールは、選択時に、良好な結合親和性のある抗体を生じるB細胞の集団をもたらし、さらに、完全なレパートリー又は多様性の抗体、即ち、広範囲の異なるエピトープへ結合するものが含まれる抗体の集団を生じることが見出されている。この好ましい態様において、本発明は、免疫ウサギより入手される抗原特異的B細胞のクローン集団を単離する、少なくとも1つの抗原特異的な細胞を単離するために使用し得る方法を提供する。下記に記載して例示するように、これらの方法は、別々に、組み合わせ、連続的に、反復的に、又は周期的に使用し得る一連の培養及び選択工程を含有する。好ましくは、これらの方法は、所望の抗原へ特異的であるモノクローナル抗体、又はそのような抗体へ対応する核酸配列を産生するために使用し得る、少なくとも1つの抗原特異的な細胞を単離するために使用する。

【0126】

[000140] 本質的には、これらの方法は、以下の工程を含む：

[000141] a. 少なくとも1つの抗原特異的B細胞を含んでなる細胞集団を調製する工程；

[000142] b. その細胞集団を、例えばクロマトグラフィーによって濃縮して、少なくとも1つの抗原特異的B細胞を含んでなる濃縮細胞集団を生成する工程；

[000143] c. 濃縮B細胞集団より単一B細胞を単離する工程；及び

[000144] d. この単一B細胞がその抗原に特異的な抗体を産生するかどうかを決定する工程。

【0127】

[000145] これらの方法は、単一の抗体産生B細胞を単離する方法への改善を提供し、その改善は、抗原へ免疫化又は自然曝露された宿主より得られるB細胞集団を濃縮する工程を含んでなり、ここでその濃縮工程は、どの選択工程にも先行し、少なくとも1つの培養工程を含み、前記抗原へ特異的な単一のモノクローナル抗体を産生するB細胞のクローン集団を生じる。

【0128】

[000146] 本発明のヒト化アプローチにおいて本出願全体を通して利用する抗体を分泌

するウサギB細胞を導くために好ましくは使用されるそのような方法に関して言えば、「B細胞のクローン集団」は、所望の抗原に特異的な単一の抗体だけを分泌するB細胞の集団のことを指す。即ち、これらの細胞は、所望の抗原に特異的な唯一種のモノクローナル抗体だけを産生するということである。

【0129】

[000147] そのような方法について記載する場合、細胞集団を「濃縮する工程」という表現は、所望の細胞、典型的には、混合した細胞集団（例えば、所望の抗原に対して免疫化された宿主より導かれるB細胞含有単離物）に含まれる抗原特異的な細胞の頻度を高める工程を意味する。従って、濃縮細胞集団には、濃縮工程の結果として、より高い頻度の抗原特異的な細胞を有する細胞集団が含まれるが、この細胞の集団は、異なる抗体を含有及び産生する場合がある。

10

【0130】

[000148] そのような方法について記載する場合、「細胞集団」という一般的な表現には、濃縮前及び後の細胞集団が含まれ、多数の濃縮工程が実施されるときは、ある細胞集団が濃縮前と濃縮後の両方であり得ることが銘記される。より好ましくは、抗原特異的B細胞のクローン集団を導くためのこれらの方法は以下の工程を含む：

[000149] a. 免疫化した宿主より細胞集団を採取して、採取された細胞集団を入手する工程；

[000150] b. 採取された細胞集団より少なくとも1つの単一細胞懸濁液を創製する工程；

20

[000151] c. 少なくとも1つの単一細胞懸濁液を濃縮して、第一の濃縮細胞集団を生成する工程；

[000152] d. 第一の濃縮細胞集団を濃縮して、第二の濃縮細胞集団を生成する工程；

[000153] e. 第二の濃縮細胞集団を濃縮して、第三の濃縮細胞集団を生成する工程；及び

[000154] f. 第三の濃縮細胞集団の抗原特異的な細胞によって産生される抗体を選択する工程。

【0131】

[000155] それぞれの細胞集団は、次の工程に直接使用しても、長期又は短期の保存のために、又は後の工程のために一部又は全部を凍結させてもよい。また、細胞集団からの細胞は、個別に懸濁させて、単一細胞懸濁液を入手することができる。この単一細胞懸濁液は、単一細胞懸濁液が濃縮前の細胞集団として役立つように濃縮することができる。次いで、1以上の抗原特異的単一細胞懸濁液は、濃縮細胞集団と一緒に生成し；抗原特異的単一細胞懸濁液は、一緒に分類して、例えば、さらなる分析及び／又は抗体産生のために再びプレート培養することができる。

30

【0132】

[000156] 抗原特異性は、どの抗原に関しても測定することができる。抗原は、抗体が結合し得るどんな物質であってもよく、限定されないが、ペプチド、タンパク質、又はその断片；炭水化物；有機及び無機分子；動物細胞、細菌細胞、及びウイルスによって産生される受容体；酵素；生体経路のアゴニスト及びアンタゴニスト；ホルモン；及びサイトカインが含まれる。例示の抗原には、限定されないが、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-18、IFN- α 、IFN- γ 、BAFF、CXCL13、IP-10、VEGF、EPO、EGF、HRG、MIF、及びコロニー刺激因子、TPA、インターフェロン、腫瘍関連抗原、env及びgag及びpolのようなHIV抗原、インフルエンザ抗原、トリインフルエンザ抗原、等が含まれる。好ましい抗原には、IL-6、IL-13、TNF- α 、VEGF- α 、ヘプシジン、及び肝細胞増殖因子、並びに特定のヒト癌に特異的な腫瘍抗原が含まれる。1より多い濃縮工程を利用する方法において、それぞれの濃縮工程において使用される抗原は、互いに同じであっても、異なってもよい。同じ抗原での多数の濃縮工程は、抗原特異的な細胞の大きい、及び／又は多様な集団を生じる場合があり；異なる抗原での多数の濃縮工程は、異

40

50

なる抗原に対して交差特異性がある濃縮細胞集団を生じる場合がある。

【0133】

[000157] 細胞集団を濃縮する工程は、当該技術分野で知られている、抗原特異的な細胞を単離するためのどの細胞選択手段によっても実施することができる。例えば、細胞集団は、クロマトグラフィー技術、例えば、Miltenyi ビーズ又は磁気ビーズの技術によって濃縮することができる。このビーズは、目的の抗原へ直接的又は間接的に付けることができる。好ましい態様において、細胞集団を濃縮する方法には、少なくとも1つのクロマトグラフィー濃縮工程が含まれる。

【0134】

[000158] 細胞集団は、当該技術分野で知られているどの抗原特異性アッセイ技術（例えば、ELISAアッセイ又はフローアッセイ）を実施することによっても濃縮することができる。ELISAアッセイには、限定されないが、選択的な抗原固定化（例、ストレプトタビジン、アビジン、又はニュートラビジンコート化プレートによるビオチニル化抗原捕捉）、非特異的な抗原プレートコーティング、及び抗原構築（build-up）戦略（例えば、選択的な抗原捕捉に結合パートナー付加を続けて、ヘテロマーのタンパク質-抗原複合体を産生すること）を介することが含まれる。抗原は、固体のマトリックス又は支持体、例えばカラムへ直接的又は間接的に付けることができる。フローアッセイは、細胞を抗原負荷ビーズと、B細胞を採取するのに使用した宿主に特異的な標識化抗宿主抗体に接触させることを含む。この標識は、例えば、フルオロフォアであり得る。1つの態様では、少なくとも1つの単一細胞懸濁液に対して少なくとも1つのアッセイ濃縮工程を実施する。別の態様において、細胞集団を濃縮する方法には、少なくとも1つのクロマトグラフィー濃縮工程と少なくとも1つのアッセイ濃縮工程が含まれる。

【0135】

[000159] 細胞集団をサイズ又は密度により「濃縮する」方法が当該技術分野で知られている。これらの工程は、本方法において、細胞集団を抗原特異性により濃縮する工程に加えて使用することができる。

【0136】

[000160] これらの方法に使用される細胞集団は、抗原を認識することが可能な少なくとも1つの細胞を含有するものである。抗原認識細胞には、限定されないが、B細胞、形質細胞、及びこれらの子孫が含まれる。典型的には、これらの方法は、単一種の抗原特異的B細胞を含有するクローン細胞集団（即ち、その細胞集団は、所望の抗原に特異的な単一のモノクローナル抗体を産生する）を生じる条件の下で実効される。本発明において、これらの抗原特異的B細胞は、典型的には、ウサギのものであるか、あるいは近縁の哺乳動物種からのB細胞であろう。

【0137】

[000161] 本明細書に提供する新規な培養及び選択プロトコールによって、抗原特異的な抗体分泌性の細胞から専らなるB細胞のクローン抗原特異的集団が入手され则认为られている。

【0138】

[000162] そのような方法において、単一B細胞の単離は、どの選択工程（例えば、特別なB細胞を細胞集団より選択する工程、及び／又は特別な細胞によって産生される抗体を選択する工程）よりも前に、宿主より得られる細胞集団を濃縮することによって実効し得る。濃縮工程は、1、2、3、又はより多くの工程として実施することができる。1つの態様では、濃縮細胞集団から単一B細胞を単離した後で、その単一B細胞が抗原特異性及び／又は所望の特性のある抗体を分泌するかどうかを確認する。

【0139】

[000163] 本発明の好ましい態様では、所望の抗原に対して免疫化したウサギより得られる濃縮細胞集団を、本主題のヒト化戦略の候補出発材料となる、抗体産生及び／又は選択の方法に使用する。この方法には、以下の工程を含めることができる：少なくとも1つの抗原特異的な細胞を含んでなる細胞集団を調製する工程、少なくとも1つの抗原特異的

な細胞を単離することによってその細胞集団を濃縮して、濃縮細胞集団を生成する工程、及び少なくとも1つの抗原特異的な細胞より抗体産生を誘導する工程。好ましい態様において、濃縮細胞集団は、1より多い抗原特異的な細胞を含有する。1つの態様では、濃縮された集団のそれぞれの抗原特異的な細胞をクローン抗原特異的B細胞集団を生じる条件の下で培養して、その後で、抗体産生細胞をそれより単離する、及び／又は前記B細胞又は本発明のヒト化戦略に使用されるそのような抗体に対応する核酸配列を使用して抗体を産生する。低頻度の抗原特異的な細胞の細胞集団より抗体が産生される先行技術とは対照的に、本発明は、高頻度の抗原特異的な細胞の間からの抗体選択を可能にする。濃縮工程を抗体選択に先立って使用するので、抗体産生に使用される細胞の大多数、好ましくは、ほとんどすべての細胞が抗原特異的である。抗原特異性の頻度が増加した細胞の集団から抗体を産生することによって、抗体の量と多様性が高まることで、ヒト化のためのより多くの出発材料が提供される。

10

【0140】

[000164] ヒト化のためのウサギ抗体を導くためにこれらの抗体選択方法を使用するとき、抗体は、好ましくは、濃縮工程と、抗原特異的B細胞のクローン集団を生じる培養工程の後で選択する。この方法は、1以上の単離された抗原特異的な細胞より選択された抗体又はその部分を配列決定する工程をさらに含むことができる。当該技術分野で知られている、配列決定のためのどの方法も利用することができて、重鎖、軽鎖、可変領域（複数）、及び／又は相補性決定領域（複数）（CDR）を配列決定することを含めることができる。

20

【0141】

[000165] 濃縮工程に加えて、抗体選択の方法には、細胞集団について抗原認識及び／又は抗体機能性をスクリーニングする1以上の工程を含めてもよい。例えば、所望の抗体は、特別なエピトープへの結合又は特別な構造の模倣；アンタゴニスト又はアゴニスト活性；又は、中和活性（例えば、抗原とリガンドの間の結合を阻害すること）といった、特異的な構造上の特徴を有する場合がある。1つの態様において、抗体機能性スクリーニングは、リガンド依存性である。抗体機能性をスクリーニングする工程には、限定されないが、組換え受容体タンパク質と抗原リガンドの天然の相互作用を再創出する *in vitro* タンパク質-タンパク質相互作用アッセイ；及び、リガンド依存的で容易にモニタリングされる細胞ベースの応答（例えば、増殖応答）が含まれる。1つの態様において、抗体選択の方法には、細胞集団について阻害濃度（IC50）を測定することによって抗体機能性をスクリーニングする工程が含まれる。1つの態様では、単離された抗原特異的な細胞の少なくとも1つが、約100、50、30、25、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又はその増分未満のIC50を有する抗体を産生する。

30

【0142】

[000166] 濃縮工程に加えて、抗体選択の方法には、細胞集団について抗体結合強度をスクリーニングする1以上の工程も含めてよい。抗体結合強度は、当該技術分野で知られているどの方法（例、Biacore）によっても測定することができる。1つの態様において、単離された抗原特異的な細胞の少なくとも1つは、高い抗原親和性、例えば、約 $5 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ 未満、好ましくは、約 $1 \times 10^{-13} \text{ M}^{-1} \sim 5 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{ M}^{-1} \sim 7.5 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1} \sim 2 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$ 、又は約 $1.5 \times 10^{-11} \text{ M}^{-1}$ 以下、又はその増分の解離定数（Kd）を有する抗体を産生する。この態様において、抗体は、親和性成熟であると言われる。好ましい態様において、本発明のヒト化に使用される抗体の親和性は、Panorex（登録商標）（エドレコロマブ）、Rituxan（登録商標）（リツキシマブ）、Herceptin（登録商標）（トラスツズマブ）、Mylotarg（登録商標）（ゲムツズマブ）、Campath（登録商標）（アレムツズマブ）、ZevalinTM（イブリツモマブ）、ErbibituxTM（セツキシマブ）、AvastinTM（ベバシズマブ）、RaptivaTM（エファリズマブ）、Remicade（登録商標）（インフリキシマブ）、HumiraTM（アダリムマブ）、及びXolairTM（オマリズマ

40

50

ブ)のいずれもの親和性に匹敵するか、又はそれより高い。好ましくは、その抗体の親和性は、HumiraTMの親和性に匹敵するか又はそれより高い。抗体の親和性は、既知の親和性成熟化技術によって高めることもできる。1つの態様では、少なくとも1つの細胞集団について、抗体機能性及び抗体結合強度の少なくとも1つ、好ましくはその両方をスクリーニングする。

【0143】

[000167] 濃縮工程に加えて、ヒト化の候補品を選択するために使用する抗体選択の方法には、ウサギ細胞集団について、抗体配列相同性、具体的にはヒト相同性をスクリーニングする1以上の工程も含めてよい。1つの態様では、単離された抗原特異的な細胞の少なくとも1つが、ヒト抗体に対して約50%～約100%、又はその増分の相同性を有するか、又は約60%、70%、80%、85%、90%、又は95%より多く相同的である抗体を産生する。

10

【0144】

[000168] 別の好ましい態様において、本発明はまた、IC50、Kd、及び／又は相同性の用語で上記に記載される態様のいずれにも従う抗体より産生されるウサギ由来ヒト化抗体を提供する。

【0145】

[000169] ヒト化への良好な候補品とする親和性と機能特性を有する抗体を産生するB細胞を同定するために好ましくは使用される、本明細書に開示されるB細胞選択プロトコールは、所望の標的抗原に特異的な抗体分泌B細胞及びモノクローナル抗体を入手するための他の方法に対して、いくつかの固有の利点を有する。これらの利点には、制限されないが、以下が含まれる：

20

[000170] 第一に、これらの選択手順をIL-6又はTNF- α のような所望の抗原で利用するとき、この方法は、抗原特異的B細胞（例えば、実質的に包括的な全数の抗体、即ち、抗原の様々な異なるエピトープへ結合する抗体であるように見えるものを産生することが可能なウサギより導かれる）を再現可能にもたらすことが見出された。理論により束縛されなければ、この包括的な全数は、最初のB細胞回収に先立って実施される抗原濃縮工程に起因すると仮定される。さらに、この利点は、異なる特性のある抗体の単離及び選択を可能にするが、これらの特性は、特別な抗体のエピトープ特異性に依存して変動する可能性がある。これらの抗体は、本発明のヒト化戦略にとって理想的な出発材料である。

30

【0146】

[000171] 第二に、本発明のB細胞選択プロトコールは、所望の抗原へ相対的に高い結合親和性で概して結合する単一のモノクローナル抗体を分泌する単一B細胞又はその子孫を含有するクローンB細胞培養物を再現可能に産出することが見出された。対照的に、先行の抗体選択方法は、相対的に少ない高親和性抗体を産出するので、治療ポテンシャルのある抗体を単離するには多大なスクリーニング手順が必要とされる。理論により束縛されなければ、本発明のプロトコールは、宿主のin vivo B細胞免疫化（一次免疫化）だけでなく、それに続く、抗原標的に特異的な単一の高親和性モノクローナル抗体を分泌する、回収されたクローンB細胞の能力及び傾向を強める可能性がある、第二のin vitro B細胞刺激（二次抗原プライミング工程）ももたらすと仮定される。

40

【0147】

[000172] 第三に、本発明のB細胞選択プロトコールは、所望の標的に対して、平均してきわめて選択的（抗原特異的）であるIgGを産生する、濃縮B細胞を再現可能に産出することが観測された。そのことに一部基づけば、本発明の方法によって回収される抗原濃縮されたB細胞は、上記に考察したようなエピトープ特異性の所望される全体（full complement）を生じることが可能なB細胞を含有すると考えられる。

【0148】

[000173] 第四に、このB細胞選択プロトコールは、小さな抗原、即ち、100以下のアミノ酸、例えば、5～50のアミノ酸の長さのペプチドで使用するときに、その小

50

な抗原（例えば、ペプチド）に対する単一の高親和性抗体を分泌するクローンB細胞培養物を再現可能に生じることが観測された。このことは、低分子ペプチドに対する高親和性抗体を産生することが、一般的にはきわめて難しく、労働集約的で、時には実現可能でさえないので、きわめて驚くべきことである。従って、これらの方法を使用して、所望のペプチド標的、例えば、ウイルス、細菌、又は自己抗原のペプチドに対するヒト化治療用抗体を導くのに理想的な候補品を産生して、それにより、非常に独自の結合特性があるモノクローナル抗体の産生、又は異なるペプチド標的（例えば、異なるウイルス株）に対するモノクローナル抗体のカクテルの産生さえ可能になる。この利点は、異なるHPV株に対する防御免疫を誘導するHPVワクチンのような、所望の結合価を有する治療用又は予防用ワクチンの産生の文脈において特に有用であり得る。

10

【0149】

[000174] 第五に、このB細胞選択プロトコールは、特にウサギから導かれるB細胞で使用する時、内因性のヒト免疫グロブリンにきわめて似ていて（アミノ酸レベルではほぼ90%似ている）、ヒト免疫グロブリンにきわめて類似した長さを保有するCDRを含有し、それ故に潜在的な免疫原性の懸念を払拭するための配列修飾をほとんど又はまったく必要としない（典型的には、先に記載のように、親抗体配列中のせいぜい数個だけのCDR残基を修飾する必要がある、フレームワークの外因性残基は、導入する必要がない）、抗原特異的な抗体配列を再現可能に生じるものである。特に、好ましくは、この組換え抗体は、このことが抗体親和性の成熟化に重要であると思われるので、抗原認識に必要とされる宿主（ウサギ）のCDR1及びCDR2残基とCDR3全体だけを含有する。それにより、本発明のB細胞及び抗体選択プロトコールに従って産生される、回収される抗体配列の高い抗原結合親和性は、ヒト化に伴っても、インタクトであるか又は実質的にインタクトなままである。

20

【0150】

[000175] 要約すると、本発明の方法を使用して、先に知られていたものより効率的なプロトコールの使用によって、より独自のエピトープに対してより高い結合親和性を示すヒト化抗体を産生することができる。

【0151】

[000176] 具体的な態様において、本発明は、以下の工程が含まれる製法によって、本発明のプロトコールにおけるヒト化のために所望の抗原に特異的な抗体を分泌して、親和性、アビディティ、細胞溶解活性、等のような少なくとも1つの所望される機能特性を保有してもよい単一B細胞を同定するための方法を提供する：

30

[000177] a. 宿主を抗原に対して免疫化する工程；

[000178] b. その宿主よりB細胞を採取する工程；

[000179] c. 採取されたB細胞を濃縮して、抗原特異的な細胞の頻度を高める工程；

[000180] d. 少なくとも1つの単一細胞懸濁液を創製する工程；

[000181] e. 単一抗原特異的B細胞の培養ウェルごとの生存が有利になる条件の下で、単一細胞懸濁液からサブ集団を培養する工程；

[000182] f. このサブ集団より10～12未満のB細胞を単離する工程；及び

[000183] g. この単一B細胞がその抗原に特異的な抗体を産生するかどうかを決定する工程。

40

【0152】

[000184] 本発明の方法は、選択性決定残基のような最重要（critical）残基を同定して、その理想的なヒト化バージョンを導くために利用する候補品の相同的なヒト可変配列を同定するためのBLAST検索の一部としてこの配列を使用するために、所望の抗体をコードするポリペプチド及び核酸配列を全部又は一部単離して配列決定する追加の工程をさらに含む。これらの配列又はそのヒト化バージョン又は部分は、IL-6、TNF-α、肝細胞増殖因子、ヘプシジン、等のような所望の抗原に対する組換え抗体を産生するために、所望の宿主細胞において発現させることができる。

【0153】

50

[000185] 先に注記したように、B細胞のクローン集団は、所望の抗原に対する抗体を産生する抗体分泌性B細胞を専ら含むと考えられている。また、いくつかの抗原と異なるB細胞集団で得られた実験結果に基づけば、本発明に従って産生されるクローン産生されるB細胞とそれより導かれる単離された抗原特異的B細胞は、培養された抗原特異的B細胞よりモノクローナル抗体を導く他の方法に比較して、典型的には相対的に高親和性であり、より大きなエピトープ変異性のあるモノクローナル抗体の選択物を効率的かつ再現可能に産生することがさらに可能であるモノクローナル抗体を分泌すると考えられている。本主題の発明において、そのようなB細胞選択方法に使用される免疫細胞の集団は、ウサギ又は別のウサギ種のようなそれに近縁の動物より導かれる。ウサギ又は近縁の哺乳動物のB細胞の供給源としての使用は、ヒト化バージョンを導くために本発明において使用され得るモノクローナル抗体の多様性を高める可能性があると考えられている。また、本発明に従ってウサギから導かれる抗体配列は、典型的には、ヒト抗体配列に対する高い度合いの配列同一性を有する配列を保有し、それらは、ほとんど抗原性を保有しないヒト化変異体を生じるはずなので、それらをヒトにおける使用に有利にする。ヒト化の経過において、最終のヒト化抗体は、ずっと低い異種／宿主残基含量を含有し、通常は、移植時に使用されるヒト標的配列に対するその性質のために劇的に異なる宿主CDR残基のサブセットに限定される。このことは、本発明のヒト化戦略を使用して産生されるヒト化抗体タンパク質において、完全な活性回復の確率を高める。

10

【0154】

[000186] 本明細書に開示される濃縮工程を使用する抗体選択の方法には、免疫化した宿主より免疫細胞含有細胞集団を入手する工程が含まれる。免疫化した宿主より免疫細胞含有細胞集団を入手する方法は、当該技術分野で知られていて、一般的には、宿主において免疫応答を誘導する工程と、その宿主より細胞を採取して1以上の細胞集団を入手する工程が含まれる。この応答は、宿主を所望の抗原に対して免疫化することによって誘発することができる。あるいは、そのような免疫細胞の供給源として使用される宿主は、細菌又はウイルスのような特別な病原体に感染しているか、又はあるいは、その個体が罹患している癌への特異的な抗体応答を開始した個体のように、所望の抗原へ天然で曝露されている可能性がある。本方法において、宿主は、ウサギである。

20

【0155】

[000187] 言及したように、免疫応答は、疾患の結果として自然に起こり得るか、又はそれは、抗原での免疫化によって誘導することができる。免疫化は、完全又は不完全フロイントアジュバントのような、免疫応答を高めるための薬剤を伴うか又は伴わない抗原の1回以上の注射によるといった、当該技術分野で知られているどの方法によっても実施することができる。宿主動物を *in vivo* で免疫化することに代わる手段として、本方法は、宿主細胞培養物を *in vitro* で免疫化することを含み得る。

30

【0156】

[000188] 免疫応答（例えば、血清抗体検出によって測定されるような）の時間を許容した後で、宿主動物の細胞を採取して、1以上の細胞集団を入手する。好ましい態様では、採取した細胞集団について抗体結合強度及び／又は抗体機能性をスクリーニングする。採取した細胞集団は、好ましくは、脾臓、リンパ節、骨髓、及び／又は末梢血単核細胞（PBMC）の少なくとも1つに由来する。この細胞は、1より多い供給源より採取して、プールすることができる。ある抗原にはある供給源が好ましい場合がある。例えば、IL-6には、脾臓、リンパ節、及びPBMCが好ましく；そして、TNFにはリンパ節が好ましい。細胞集団は、免疫後約20～約90日又はその増分、好ましくは、約50～約60日で採取する。採取した細胞集団及び／又はそこからの単一細胞懸濁液は、抗体選択のために濃縮、スクリーニング、及び／又は培養することができる。採取した細胞集団内の抗原特異的な細胞の頻度は、通常、約1%～約5%又はその増分である。

40

【0157】

[000189] 1つの態様では、採取した細胞集団からの単一細胞懸濁液を、好ましくはMiltenyi ビーズを使用して濃縮する。約1%～約5%の抗原特異的な細胞の頻度を有する

50

採取された細胞集団より、このようにして、100%に近づく抗原特異的な細胞の頻度を有する濃縮細胞集団を導く。

【0158】

[000190] 濃縮工程を使用する抗体選択の方法には、濃縮細胞集団由来の少なくとも1つの抗原特異的な細胞より抗体を産生する工程が含まれる。抗体を *in vitro* で産生する方法は、当該技術分野でよく知られていて、どの好適な方法も利用することができる。1つの態様では、採取した細胞集団由来の抗原特異的な単一細胞の懸濁液のような濃縮細胞集団を、ウェルにつき50、100、250、500、又は1と1000の間の他の増分の細胞といった、様々な細胞密度でプレート培養する。好ましくは、このサブ集団は、約10,000個以下の抗原特異的な抗体分泌細胞、より好ましくは、約50~10,000、約50~5,000、約50~1,000、約50~500、約50~250、又はその増分の抗原特異的な抗体分泌細胞を含む。次いで、これらのサブ集団をフィーダー層上に好適な培地（例えば、活性化T細胞条件付け培地、特に、1~5%の活性化ウサギT細胞条件付け培地）で、好ましくは、単一の増殖性抗体分泌細胞の培養ウェルあたりの生存に有利である条件の下で培養する。フィーダー層は、一般に、放射された細胞物質（例えば、EL4B細胞）からなり、細胞集団の一部を構成しない。この細胞を好適な培地において、抗体産生に十分な時間、例えば、約1日~約2週、約1日~約10日、少なくとも約3日、約3~約5日、約5日~約7日、少なくとも約7日、又はその他の増分の間培養する。1つの態様では、1より多いサブ集団を同時に培養する。好ましくは、単一の抗体産生細胞とその子孫が各ウェル中で生存し、それにより、各ウェルにおいて、抗原特異的B細胞のクローン集団を提供する。この段階で、このクローン集団によって産生される免疫グロブリンG（IgG）は、抗原特異性ときわめて相関している。好ましい態様において、IgGは、約50%より高い、より好ましくは、70%、85%、90%、95%、99%、又はその増分より高い抗原特異性との相関性を示す。この相関性は、ウェルごとに単一の抗原特異的な抗体産物を確立する制限条件の下でB細胞培養物を供給することによって証明されている。「抗原特異的」対「一般的」なIgG合成について比較した。3つの集団が観察された：単一形態の抗原（ビオチニル化及び直接コーティング）を認識するIgG、固定化に関わらず検出可能なIgG及び抗原認識、並びにIgG産生単独である。IgG産生は、抗原特異性ときわめて相関していた。

【0159】

[000191] 抗体を含有する上清を採取してもよく、これは、上記に記載の工程に従って、抗体選択のために、濃縮、スクリーニング、及び／又は培養することができる。1つの態様では、上清を濃縮し（好ましくは、抗原特異性アッセイ、具体的にはELISAアッセイによって）、及び／又は抗体機能性をスクリーニングする。

【0160】

[000192] 別の態様において、所望の分泌されるモノクローナル抗体の存在を検出するために上記に記載の上清をスクリーニングしてもよい、濃縮された、好ましくはクローンの抗原特異的B細胞集団を少数のB細胞、好ましくは、単一のB細胞の単離のために使用して、次いでこれを適正なアッセイにおいて試験して、単一の抗体産生B細胞のクローンB細胞集団における存在を確認する。1つの態様では、クローンB細胞集団より、約1~約20の細胞、好ましくは、約15、12、10、5、又は3未満、又はその増分の細胞、最も好ましくは、単一の細胞を単離する。スクリーニングは、好ましくは、抗原特異性アッセイ、具体的にはハロアッセイによって実効される。ハロアッセイは、完全長のタンパク質、又はその断片で実施することができる。抗体を含有する上清についても、抗原結合親和性；抗原ーリガンド結合の作動作用又は拮抗作用、特異的な標的細胞種の増殖の誘導又は阻害；標的細胞の溶解の誘導又は阻害、並びにその抗原が関与する生体経路の誘導又は阻害の少なくとも1つをスクリーニングすることができる。

【0161】

[000193] ウサギ宿主から導かれる、同定された抗原特異的な細胞を使用して、本発明のヒト化アプローチに使用し得る所望のモノクローナル抗体をコードする対応する核酸配

列を導くことができる（A I u I 消化によって、ウェルあたり単一のモノクローナル抗体種だけが産生されていることを確かめることができる）。上記に言及したように、次いで、これらの配列をヒト医薬品での使用により適したものとするために、それらを、本発明のヒト化プロトコールによって、好ましくは突然変異させる。

【0162】

[000194] 言及したように、本発明の方法に使用するウサギ由来の濃縮B細胞集団はまた、繰り返しても異なる順序で実施してもよい上記に記載の工程に従って、抗体選択のためにさらに濃縮、スクリーニング、及び／又は培養することができる。好ましい態様では、濃縮された、好ましくはクローンの抗原特異的な細胞集団の少なくとも1つの細胞を抗体選択のために単離し、培養して、使用する。

10

【0163】

[000195] このように、別の態様において、本発明は、以下の工程を含んでなる、本主題のヒト化方法に使用のための抗体候補品を単離する方法を提供する：

[000196] a. 免疫化したウサギ宿主より細胞集団を採取して、採取した細胞集団を入手する工程；

[000197] b. 採取した細胞集団より少なくとも1つの単一細胞懸濁液を創製する工程；

[000198] c. 少なくとも1つの単一細胞懸濁液を好ましくはクロマトグラフィーによって濃縮して、第一の濃縮細胞集団を生成する工程；

[000199] d. 第一の濃縮細胞集団を好ましくはE L I S Aアッセイによって濃縮して、好ましくはクローンである、即ち、単一種の抗原特異的B細胞だけを含有する、第二の濃縮細胞集団を生成する工程；

20

[000200] e. 第二の濃縮細胞集団を好ましくはハロアッセイによって濃縮して、所望の抗原に特異的な抗体を産生する単一又は少数のB細胞を含有する第三の濃縮細胞集団を生成する工程；並びに

[000201] f. 第三の濃縮細胞集団より単離される抗原特異的な細胞によって産生される抗体を選択する工程。

【0164】

[000202] この方法には、採取した細胞集団について抗体結合強度（親和性、アビディティ）及び／又は抗体機能性をスクリーニングする1以上の工程をさらに含めることができる。好適なスクリーニング工程には、限定されないが、同定された抗原特異的B細胞によって産生される抗体が最小限の抗原結合親和性を保有する抗体を産生するかどうか；その抗体が所望の抗原のリガンドへの結合に作動するか又は拮抗するか；その抗体が特異的な細胞種の増殖を誘導するか又は阻害するか；その抗体が標的細胞に対する細胞溶解反応を誘導するか又は誘発するか；その抗体が特異的エピトープへ結合するかどうか；及び、その抗体が、その抗原が関与する特異的な単数又は複数の生体経路を調節する（阻害するか又は作動する）かどうかを検出するアッセイ方法が含まれる。

30

【0165】

[000203] 同様に、この方法には、第二の濃縮細胞集団について抗体結合強度及び／又は抗体機能性をスクリーニングする1以上の工程を含めることができる。

40

[000204] この方法には、最重要残基を同定して、本主題のヒト化方法における使用に適した相同的なヒト生殖細胞系抗体配列のB L A S T検索を実行するために、選択された抗体のポリペプチド配列又は対応する核酸配列を配列決定する工程が含まれる。この方法にはまた、選択された抗体の配列、その断片、又は遺伝子修飾したヒト化バージョンを使用して組換え抗体を産生する工程が含まれる。これらのヒト化突然変異の方法により、所望のエフェクター機能、免疫原性、安定性、グリコシル化の除去又は付加、等を保有する組換え抗体を産出することができる。本明細書に記載の組換えヒト化抗体又はヒト化抗体断片は、限定されないが、C H O、C O S、B H K、H B K-293のような哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、及び両生類細胞が含まれる、どの好適な組換え細胞によっても産生することができる。好ましい態様において、親ウサギ抗体とこ

50

これらの抗体及び相同的なヒト可変配列から導かれるヒト化抗体は、倍数体の酵母細胞、即ち、二倍体酵母細胞、特にピキアにおいて発現される。

【0166】

[000205] 本質的には、本方法は、以下のように実効してよい：

[000206] a. ウサギ宿主を抗原に対して免疫化して、ウサギ抗体を産出する工程；

[000207] b. 入手したウサギ抗体について抗原特異性と中和をスクリーニングする工程；

[000208] c. このウサギよりB細胞を採取する工程；

[000209] d. 採取したウサギB細胞を濃縮して、増加頻度の抗原特異的な細胞を有する濃縮細胞集団を創製する工程；

[000210] e. この濃縮細胞集団由来の1以上のサブ集団を、単一B細胞の生存に有利である条件の下で培養して、少なくとも1つの培養ウェルにおいてクローン集団を産生する工程；

[000211] f. このクローン集団がその抗原に特異的なウサギ抗体を産生するかどうかを決定する工程；

[000212] g. 単一のウサギB細胞を単離する工程；及び

[000213] h. 単一B細胞によって産生されるウサギ抗体の核酸配列を配列決定する工程、及び

[000214] i. この抗体配列を使用して、親ウサギ抗体の親和性と任意選択的に他の特性を保有するヒト化抗体を、本発明のヒト化戦略を使用して導く工程。

【0167】

[000215] 抗体をヒト化する方法

[000216] 記載のように、本発明は、ウサギ抗体重鎖及び軽鎖をヒト化する新規で改善された方法を提供する。本発明の方法は、ウサギ抗体重鎖及び軽鎖のヒト化のために、以下のように実効してよい：

[000217] ウサギ抗体軽鎖のヒト化

[000218] 1. シグナルペプチド配列に続く第一のアミノ酸であるアミノ酸を同定する。これがフレームワーク1の開始である。ウサギ軽鎖タンパク質配列では、シグナルペプチドは、最初の開始メチオニンで始まり、典型的には、必ずではないが、22のアミノ酸の長さである。成熟したポリペプチドの開始は、N末端のタンパク質の配列決定によって実験的に決定しても、予測アルゴリズムを使用して予測してもよい。これはまた、当業者によって古典的に画定されるようなフレームワーク1の開始である。

【0168】

[000219] 例：「A Y D M・・・」で始まる、図2中のR b t V Lアミノ酸残基1。

[000220] 2. フレームワーク3の終わりを同定する。これは、典型的には、フレームワーク1の開始に続く86～90のアミノ酸であり、典型的には、2つのチロシン残基に先行されるシステイン残基である。これは、当業者によって古典的に画定されるようなフレームワーク3の終わりである。

【0169】

[000221] 例：「T Y Y C」として終わる、図2中のR b t V Lアミノ酸残基88。

[000222] 3. 上記に画定されるようなフレームワーク1の始まりから出発してフレームワーク3の終わりに至るポリペプチドのウサギ軽鎖配列を使用して、最も類似したヒト抗体タンパク質配列を求める配列相同性検索を実行する。これは、典型的には、免疫原性の可能性を抑えるために、抗体成熟化に先立つヒト生殖細胞系配列に対する検索となるが、どのヒト配列も使用することができる。典型的には、B L A S Tのようなプログラムを使用して、最も相同的なものを求めて、配列のデータベースを検索することができる。ヒト抗体配列のデータベースは、N C B I（国立生物工学情報センター）のような様々なソースから見出すことができる。

【0170】

[000223] 例：図2中の1～88と番号付けた残基からのR b t V Lアミノ酸配列をヒ

ト抗体生殖細胞系データベースに対してBLAST検索する。上位3つのユニークなリターン (returned) 配列を図2にL12A、V1、及びVx02として示す。

【0171】

[000224] 4. 一般的には、最も相同的なヒト生殖細胞系可変軽鎖配列をヒト化の基礎として次に使用する。しかしながら、当業者は、配列ギャップやフレームワーク類似性が含まれる他の要因に基づいて、相同性アルゴリズムによって決定される最高の相同性ではなかった別の配列を使用することを決定してよい。

【0172】

[000225] 例：図2では、L12Aが最も相同的なヒト生殖細胞系可変軽鎖配列であったので、Rb t V Lのヒト化の基礎として使用する。

[000226] 5. 軽鎖ヒト化に使用するこのヒト相同体について、フレームワークとCDR配置 (FR1、FR2、FR3、CDR1、及びCDR2) を決定する。これは、当該技術分野で記載されるような伝統的なレイアウトを使用している。フレームワークとCDR領域のレイアウトを維持しながら、ウサギ可変軽鎖配列をヒト相同体と並置する。

【0173】

[000227] 例：図2では、Rb t V L配列をヒト相同配列L12Aと並置して、フレームワーク及びCDRのドメインを示す。

[000228] 6. ヒト相同軽鎖配列のCDR1及びCDR2領域をウサギ配列由来のCDR1及びCDR2配列に置き換える。ウサギ及びヒトのCDR配列の間に長さの違いがあるならば、全体のウサギCDR配列とその長さを使用する。これより少ないか又はより多い配列交換を実施しても、又は特異的残基 (複数) を改変しても、得られるヒト化抗体の特異性、親和性、及び/又は免疫原性が不変であり得ることは可能であるが、記載のような交換が成功裡に使用されたとしても、他の変更も許容され得るという可能性を排除するものではない。

【0174】

[000229] 例：図2では、ヒト相同可変軽鎖L12AのCDR1及びCDR2のアミノ酸残基をRb t V Lウサギ抗体軽鎖配列由来のCDR1及びCDR2アミノ酸配列に置き換える。ヒトL12Aフレームワーク1、2、及び3は、不変である。得られるヒト化配列を、1~88と番号付けた残基からのV L hとして下に示す。L12ヒト配列と異なる残基だけが下線を施されて、従って、ウサギ由来のアミノ酸残基であることに留意されたい。この例では、88残基のうち8つだけがヒト配列と異なる。

【0175】

[000230] 7. 工程6において創出したこの新たなハイブリッド配列のフレームワーク3の後に、ウサギ軽鎖抗体配列のCDR3全体を付ける。このCDR3配列は、様々な長さであり得るが、典型的には、9~15のアミノ酸残基の長さである。CDR3領域と後続のフレームワーク4領域の始まりは、当業者によって古典的に画定されて同定可能である。典型的には、フレームワーク4の始まり、そして従って、CDR3の終わりの後は、配列「F G G G . . .」からなるが、これらの残基には、いくつかの変異が存在する場合がある。

【0176】

[000231] 例：図2では、V L hと示したヒト化配列中のフレームワーク3の終わりの後に、Rb t V LのCDR3 (89~100と番号付けられたアミノ酸残基) を付け加える。

【0177】

[000232] 8. ウサギ軽鎖フレームワーク4 (これは、典型的には、可変軽鎖の最終の11のアミノ酸残基であり、上記の工程7に示したように始まって、典型的には、アミノ酸配列「. . . V V K R」で終わる) を、通常は生殖細胞系配列に由来する、最も近いヒト軽鎖フレームワーク4相同体で置き換える。頻繁に、このヒト軽鎖フレームワーク4は、配列「F G G G T K V E I K R」である。最も相同的なわけではないか、又は他の点で異なる他のヒト軽鎖フレームワーク4配列を、得られるヒト化抗体の特異性、親和性、及

10

20

30

40

50

び／又は免疫原性に影響を及ぼすことなく使用し得ることは可能である。このヒト軽鎖フレームワーク 4 配列を、可変軽鎖ヒト化配列の終わりへ上記の工程 7 からの C D R 3 配列の直後に付け加える。これが現下では可変軽鎖ヒト化アミノ酸配列の終わりである。

【0178】

[000233] 例：図 2 に、R b t V L ウサギ軽鎖配列のフレームワーク 4 (F R 4) を相同的なヒト F R 4 配列の上に示す。このヒト F R 4 配列を、ヒト化可変軽鎖配列 (V L h) へ上記の工程 7 において付け加えた C D 3 領域の終わりのすぐ後に付け加える。

【0179】

[000234] ウサギ抗体重鎖のヒト化

[000235] 1. シグナルペプチド配列に続く第一のアミノ酸であるアミノ酸を同定する。これがフレームワーク 1 の開始である。ウサギ重鎖タンパク質配列では、シグナルペプチドは、最初の開始メチオニンで始まり、典型的には、19 のアミノ酸の長さである。典型的には、しかし必ずとは言えないが、ウサギ重鎖シグナルペプチドの最終の 3 つのアミノ酸残基は、「・・・V Q C」であり、フレームワーク 1 の開始がこれに続く。成熟したポリペプチドの開始は、N 末端のタンパク質の配列決定によって実験的に決定しても、予測アルゴリズムを使用して予測してもよい。これはまた、当業者によって古典的に画定されるようなフレームワーク 1 の開始である。

【0180】

[000236] 例：「Q E Q L・・・」で始まる、図 2 の R b t V H アミノ酸残基。

[000237] 2. フレームワーク 3 の終わりを同定する。これは、典型的には、フレームワーク 1 の開始に続く 95～100 のアミノ酸であり、典型的には、「・・・C A R」(但し、アラニンは、バリンでもあり得る) の最終配列を有する。これは、当業者によって古典的に画定されるようなフレームワーク 3 の終わりである。

【0181】

[000238] 例：「・・・F C V R」として終わる、図 2 中の R b t V H アミノ酸残基 8。

[000239] 3. 上記に画定されるようなフレームワーク 1 の始まりから出発してフレームワーク 3 の終わりに至るポリペプチドのウサギ重鎖配列を使用して、最も類似したヒト抗体タンパク質配列を求める配列相同性検索を実行する。これは、典型的には、免疫原性の可能性を抑えるために、抗体成熟化に先立つヒト生殖細胞系配列に対する検索となるが、どのヒト配列も使用することができる。典型的には、B L A S T のようなプログラムを使用して、最も相同的なものを求めて、配列のデータベースを検索することができる。ヒト抗体配列のデータベースは、N C B I (国立生物工学情報センター) のような様々なソースから見出すことができる。

【0182】

[000240] 例：図 2 中の 1～98 と番号付けた残基からの R b t V H アミノ酸配列をヒト抗体生殖細胞系データベースに対して B L A S T 検索する。上位 3 つのユニークなリターン (returned) 配列を図 2 に 3-64-04、3-66-04、及び 3-53-02 として示す。

【0183】

[000241] 4. 一般的には、最も相同的なヒト生殖細胞系可変重鎖配列をヒト化の基礎として次に使用する。しかしながら、当業者は、配列ギャップやフレームワーク類似性が含まれる他の要因に基づいて、相同性アルゴリズムによって決定される最高の相同性ではなかった別の配列を使用することを決定してよい。

【0184】

[000242] 例：図 2 では、3-64-04 が最も相同的なヒト生殖細胞系可変重鎖配列であったので、R b t V H のヒト化の基礎として使用する。

[000243] 5. 重鎖ヒト化に使用するこのヒト相同体について、フレームワークと C D R 配置 (F R 1、F R 2、F R 3、C D R 1、及び C D R 2) を決定する。これは、当該技術分野で記載されるような伝統的なレイアウトを使用している。フレームワークと C D

10

20

30

40

50

R領域のレイアウトを維持しながら、ウサギ可変重鎖配列をヒト相同体と並置する。

【0185】

[000244] 例：図2では、R b t V H配列をヒト相同配列3-64-04と並置して、フレームワーク及びCDRのドメインを示す。

[000245] 6. ヒト相同重鎖配列のCDR1及びCDR2領域をウサギ配列由来のCDR1及びCDR2配列に置き換える。ウサギ及びヒトのCDR配列の間に長さの違いがあるならば、全体のウサギCDR配列とその長さを使用する。加えて、ヒト重鎖フレームワーク1領域の最終の3つのアミノ酸をウサギ重鎖フレームワーク1の最終の3つのアミノ酸に置き換えることが必要な場合がある。典型的には、しかし必ずとは言えないが、ウサギ重鎖フレームワーク1において、これらの3つの残基は、セリン残基が先行するグリシン残基に続く。加えて、ヒト重鎖フレームワーク2領域の最終のアミノ酸をウサギ重鎖フレームワーク2の最終のアミノ酸に置き換えることが必要な場合がある。典型的には、しかし必ずとは言えないが、これは、ウサギ重鎖フレームワーク2において、イソロイシン残基が先行するグリシン残基である。これより少ないか又はより多い配列交換を実施しても、又は特異的残基（複数）を改変しても、得られるヒト化抗体の特異性、親和性、及び／又は免疫原性が不変であり得ることは可能であるが、記載のような交換が成功裡に使用されたとしても、他の変更も許容され得るという可能性を排除するものではない。例えば、トリプトファンのアミノ酸残基は、典型的には、ウサギ重鎖CDR2領域の終わりから4番目の残基に生じるが、ヒト重鎖CDR2において、この残基は、典型的には、セリン残基である。この位置でこのウサギトリプトファン残基をヒトセリン残基へ変えることは、ヒト化抗体の特異性にも親和性にもほとんど又はまったく影響を及ぼさないことが実証されているので、ヒト化配列中のウサギ配列由来アミノ酸残基の含量がさらに最小化される。

10

20

【0186】

[000246] 例：図2では、ヒト相同可変重鎖のCDR1及びCDR2のアミノ酸残基をR b t V Hウサギ抗体重鎖配列由来のCDR1及びCDR2アミノ酸配列に置き換える。但し、ウサギ配列中ではトリプトファン（位置番号63）であり、ヒト配列中の同じ位置でセリンである囲みの残基は、ヒトのセリン残基として保つ。CDR1及びCDR2の変更に加えて、フレームワーク1の最終の3つのアミノ酸（位置28～30）、並びにフレームワーク2の最終残基（位置49）は、ヒトではなくウサギのアミノ酸残基として保持する。得られるヒト化配列を、1～98と番号付けた残基からのV H hとして下に示す。3-64-04ヒト配列と異なる残基だけが下線を施されて、従って、ウサギ由来のアミノ酸残基であることに留意されたい。この例では、98残基のうち15だけがヒト配列と異なる。

30

【0187】

[000247] 7. 工程6において創出したこの新たなハイブリッド配列のフレームワーク3の後に、ウサギ重鎖抗体配列のCDR3全体を付ける。このCDR3配列は、様々な長さであり得るが、典型的には、5～19のアミノ酸残基の長さである。CDR3領域と後続のフレームワーク4領域の始まりは、当業者によって古典的に画定されて同定可能である。典型的には、フレームワーク4の始まり、そして従って、CDR3の終わりの後は、配列「W G X G・・・」（ここで、Xは、通常Q又はPである）からなるが、これらの残基には、いくらかの変異が存在する場合がある。

40

【0188】

[000248] 例：V H hと示したヒト化配列中のフレームワーク3の終わりの後に、R b t V HのCDR3（99～110と番号付けられたアミノ酸残基）を付け加える。

[000249] 8. ウサギ重鎖フレームワーク4（これは、典型的には、可変重鎖の最終の11のアミノ酸残基であり、上記の工程7に示したように始まって、典型的には、アミノ酸配列「・・・T V S S」で終わる）を、通常は生殖細胞系配列に由来する、最も近いヒト重鎖フレームワーク4相同体で置き換える。頻繁に、このヒト重鎖フレームワーク4は、配列「W G Q G T L V T V S S」である。最も相同的なわけではないが、又は他の点で

50

異なる他のヒト重鎖フレームワーク4配列を、得られるヒト化抗体の特異性、親和性、及び／又は免疫原性に影響を及ぼすことなく使用し得ることは可能である。このヒト重鎖フレームワーク4配列を、可変重鎖ヒト化配列の終わりへ上記の工程7からのCDR3配列の直後に付け加える。これが現下では可変重鎖ヒト化アミノ酸配列の終わりである。

【0189】

[000250] 例：図2に、RbtVHウサギ重鎖配列のフレームワーク4（FR4）を相同的なヒト重鎖FR4配列の上に示す。このヒトFR4配列を、ヒト化可変重鎖配列（VHh）へ上記の工程7において付け加えたCD3領域の終わりのすぐ後に付け加える。

【0190】

[000251] 上記のヒト化方法は、先行のヒト化方法に優る重大な利益を提供する。例えば、本発明は、ウサギアミノ酸残基のきわめて高い百分率を選択される相同的な並置ヒト抗体配列からのヒト抗体残基で置き換える、ウサギ抗体配列からの抗体配列をヒト化する方法を提供する。必然的に、それらは、ヒトにおいて免疫原性である可能性がより低い。

10

【0191】

[000252] 加えて、本発明の方法は、一次配列の比較だけに依拠して、（i）ドナー又はアクセプター抗体配列の三次元構造の知識；（ii）「表層」対「埋没」残基に関する残基の局在化の知識；（iii）異なるフレームワーク残基選択肢の異なるバージョン又は変異を特異的部位又はランダム部位で試すことに依拠しないし、必要ともしない。従って、本発明は、結合親和性や他の機能特性のような、得られるヒト化抗体の所望の特性を損なうことなく、より複雑なヒト化アプローチに比べてきわめて効率的である。

20

【0192】

[000253] さらに、そして上述のことに関連して、本発明の方法によって産生される得られるヒト化抗体は、親ウサギ抗体に比べて同一又はほとんど同一の結合特異性を保有する。

【0193】

[000254] また、本発明の方法は、抗原親和性を最適化又は増強するために、追加の「親和性成熟化」を必要としない。対照的に、ほとんどの他のヒト化アプローチでは、結合親和性が増加した変異体を同定するために数多くのランダム又は明確な配列変異体をスクリーニングする「親和性成熟化」プロトコルの反復を実効することによって、ヒト化後の抗原親和性を（実行可能な投与量で療法的又は診断的に有効であるように）有意に高めることが必要である。従って、本発明は、先行のヒト化アプローチより単純でより効率的である。

30

【0194】

[000255] なおさらに、本発明のヒト化方法は、得られるヒト化可変軽鎖及び重鎖配列を使用して、完全長の抗体、並びにヒト化抗体断片又は含有する融合タンパク質を産生することができるので、有利である。故に、治療又は診断の薬剤へ付けられるような、これらのヒト化抗体、ヒト化抗体断片、及び含有する融合タンパク質は、免疫療法だけでなく、腫瘍組織、転移巣、アテローム性動脈硬化斑、炎症部位、等の造影における使用のような *in vivo* 免疫診断と免疫予後判定によく適している。

40

【0195】

[000256] 本発明のヒト化抗体とその断片を組換え的に産生する好ましい方法。

[000257] 本発明はまた、本明細書に記載のヒト化ウサギ抗体又はその断片の産生に好ましい方法へ向けられる。本明細書に記載の抗体又はその断片に対応する組換えポリペプチドは、好ましくは、接合コンピテント酵母の倍数体、好ましくは、二倍体又は四倍体の株より分泌される。本発明は、倍数体酵母を含んでなる培養物を使用して、延長期間の間、即ち、少なくとも数日～1週、より好ましくは、少なくとも1ヶ月又は数ヶ月、そしてなおより好ましくは、少なくとも6ヶ月～1年以上、これらの組換えポリペプチドを分泌型で産生するための方法へ向けられる。これらの倍数体酵母培養物は、少なくとも10～25mg／リットルのポリペプチド、より好ましくは少なくとも50～250mg／リッ

50

トル、なおより好ましくは少なくとも500～1000mg／リットル、そして最も好ましくは、1グラム以上／リットルの組換えポリペプチド（複数）を発現するものである。

【0196】

[000258] 本発明の1つの態様では、遺伝子をマークした酵母一倍体細胞の対を、所望のヘテロ多量体タンパク質のサブユニットを含んでなる発現ベクターで形質転換する。ある一倍体細胞が第一の発現ベクターを含み、第二の一倍体細胞が第二の発現ベクターを含む。別の態様では、本発明により提供される組換えヒト化ポリペプチドの1以上の発現及び分泌をもたらす1以上の発現ベクターで二倍体酵母細胞が形質転換される。なお別の態様では、単一の一倍体細胞を1以上のベクターで形質転換して、融合又は接合の戦略によって倍数体酵母を産生するために使用してよい。なお別の態様では、本発明に従って産生される所望のヒト化ウサギ重鎖又は軽鎖又は抗体ポリペプチド又はポリペプチド群の発現及び分泌をもたらす1以上のベクターで、二倍体酵母培養物を形質転換してよい。これらのベクターは、染色体外で維持されるプラスミドを含んでも、ベクター（例えば、酵母細胞のゲノムヘランダムに、又は相同的組換えによって組み込まれる線状プラスミド）を含んでもよい。追加の発現ベクターは、一倍体又は二倍体の細胞へ導入されていてもよく；あるいは、第一又は第二の発現ベクターが、ヘテロ三量体、ヘテロ四量体、等の合成のための追加のコーディング配列を含んでもよい。非同一ポリペプチドの発現レベルは、適正な選択、ベクターコピー数、プロモーターの強度及び／又は誘導、等により、個々に較正及び調整してよい。形質転換された一倍体細胞を遺伝的に交配又は融合させる。得られる二倍体又は四倍体の株を利用して、完全に組み立てられて生体機能のあるタンパク質、つまり本明細書に記載のヒト化抗体又はその断片を産生及び分泌させる。

【0197】

[000259] 二倍体又は四倍体の細胞のタンパク質産生への使用は、予期せぬ利益をもたらす。この細胞は、生産目的、即ちスケールアップのために、そして延長期間の間、一倍体細胞の増殖には有害であり得る条件において、増殖させることができる。この条件には、高い細胞密度；最少培地での増殖；低温での増殖；選択圧力の非存在下での安定増殖を含めてよく、それは、異種遺伝子配列の完全性の維持と高レベルの発現の長時間にわたる維持をもたらす場合がある。それに束縛されることを望まないが、本発明者は、これらの利益が、少なくとも一部は、2つの別々の親の一倍体株からの二倍体株の創製より生じる可能性があると推論する。そのような一倍体株は、数多くの些細な自家栄養性の突然変異を含む場合があり、この突然変異は、二倍体又は四倍体において補充されて、きわめて選択的な条件下での増殖を可能にする。

【0198】

[000260] 形質転換された接合コンピテント一倍体酵母細胞は、所望のヒト化抗体タンパク質のサブユニット対合を可能にする遺伝学的方法を提供する。一倍体酵母株を2つの発現ベクターのそれぞれで形質転換して、第一のベクターは、あるポリペプチド鎖の合成を指令して、第二のベクターは、第二の非同一ポリペプチド鎖、即ちヒト化ウサギ重鎖及び軽鎖ポリペプチドの合成を指令する。この2つの一倍体株を接合させて、最適化された標的タンパク質（ヒト化ウサギ抗体又はヒト化ウサギ抗体断片）の産生を得ることができる、二倍体宿主を提供する。

【0199】

[000261] 追加の非同一コーディング配列（複数）を提供してもよい。そのような配列は、追加の発現ベクター上に存在しても、第一又は第二の発現ベクター中に存在してもよい。当該技術分野で知られているように、多数のコーディング配列は、個々のプロモーターより独立的に発現される場合もあれば、ATGのような、シストロン（タンパク質エンコーディング領域）の開始コドンへの直接的な内部リボソーム進入を促進して、それにより遺伝子のキャップ非依存的翻訳をもたらすエレメントである、「内部リボソーム進入部位」又は「IRES」の包含により協調的に発現される場合もある。酵母において機能的なIRESエレメントについては、Thompson et al. (2001) P.N.A.S. 98: 12866-12868に記載されている。

【0200】

[000262] 本発明の1つの態様では、IgAの増強された安定性をもたらす分泌性J鎖と組み合わせて、抗体配列を産生する（米国特許第5,959,177号；及び5,202,422号を参照のこと）。

【0201】

[000263] 好ましい態様において、2つの一倍体酵母株は、それぞれ栄養要求性であり、この一倍体細胞の増殖には培地の補充を必要とする。栄養要求株の対は相補的であるので、二倍体産物は、一倍体細胞に求められる補充物の非存在下で増殖するものである。酵母では多くのそのような遺伝子マーカーが知られていて、アミノ酸（例、met、lys、his、arg、等）、ヌクレオシド（例、ura3、ade1、等）；等への要求条件が含まれる。本発明の方法には、アミノ酸マーカーが好ましい場合がある。あるいは、他の手段によって、例えば、緑色蛍光タンパク質のような他の選択可能マーカー、様々な優性選択可能マーカー、等の使用によって、所望のベクターを含有する二倍体細胞を選択することができる。

【0202】

[000264] 2つの形質転換された一倍体細胞を遺伝的に交配させて、この接合イベントより生じる二倍体株をそのハイブリッド栄養要求性によって選択してよい。あるいは、この2つの形質転換された一倍体株の集団をスフェロプラスト化及び融合させて、二倍体子孫を再生して、選択する。いずれの方法によっても、二倍体株は、その一倍体の親とは違って、同じ栄養要求性を有さないので、同定して選択的に増殖させることができる。例えば、二倍体細胞は、最少培地で増殖させてよい。この二倍体合成戦略には、確かな利点がある。二倍体株には、組換えタンパク質の産生及び／又は分泌に影響を及ぼす場合がある、潜在的な（underlying）突然変異に対するより広い相補性を介して増強レベルの異種タンパク質を産生するポテンシャルがある。

【0203】

[000265] 上記に注記したように、いくつかの態様では、一倍体酵母を単一又は多数のベクターで形質転換して、非形質転換細胞と接合又は融合させて、単数又は複数のベクターを含有する二倍体細胞を産生してよい。他の態様では、所望のヒト化ウサギ抗体ポリペプチド又はポリペプチド群の二倍体酵母細胞による発現及び分泌をもたらす1以上のベクターで二倍体酵母細胞を形質転換してよい。

【0204】

[000266] 本発明の1つの態様では、2つの一倍体株をポリペプチドのライブラリー、例えば、本発明に従って産生されるヒト化ウサギ抗体重鎖又は軽鎖のライブラリーで形質転換する。このポリペプチドを合成する形質転換された一倍体細胞を相補的な一倍体細胞と接合させる。得られる二倍体細胞について、機能性タンパク質をスクリーニングする。この二倍体細胞は、機能検査用ポリペプチドの多数の組合せを迅速に、簡便に、そして廉価で集める手段を提供する。この技術は、具体的には、サブユニット合成レベルの最適化が機能性タンパク質の発現及び分泌に不可欠である、ヘテロ二量体タンパク産物の産生に応用可能である。

【0205】

[000267] 本発明の別の態様では、産物の産生を最大化するために、2つのサブユニットの発現レベル比を調節する。ヘテロ二量体サブユニットタンパク質レベルが最終産物の産生に影響を及ぼすことがかつて示された（Simmons LC, J Immunol Methods. 2002 May 1; 263(1-2): 133-47）。調節は、接合工程に先立って、発現ベクター上に存在するマーカーの選択によって達成することができる。このベクターのコピー数を安定的に増加させることによって、発現レベルを増加させることができる。いくつかの事例では、ポリペプチドのサブユニット間の均衡した比率に達するように、一方の鎖の他方の鎖に対するレベルを高めることが望ましい場合がある。この目的には、抗生物質抵抗性マーカー、例えば、Zeocin抵抗性マーカー、G418抵抗性、等が有用であり、より高いレベルのZeocin又はG418に抵抗性である形質転換体を選択することによって、発現ベク

ターの多数の組込みコピーを株に含有する株の濃縮の手段を提供する。サブユニット遺伝子の適正な比（例えば、1：1、1：2、等）は、効率的なタンパク質産生に重要であり得る。同じプロモーターを使用して両方のサブユニットを転写するときでも、発現されるタンパク質の最終レベルには多くの他の要因が寄与するので、一方のコード化遺伝子のコピー数を他方に対して高めることが有用であり得る。あるいは、そのいずれも発現ベクターの多数のコピーを有する2つの一倍体株を接合させることによって、単一コピーベクター株に対してより高いレベルのヒト化抗体ポリペプチドを産生する二倍体株を創製する。

【0206】

[000268] 宿主細胞を上記に記載の発現ベクターで形質転換し、接合させて二倍体株を生成して、プロモーターを誘導すること、形質転換体を選択すること、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅することに適するように修飾した慣用の栄養培地において培養する。酵母の増殖に適した多数の最少培地が当該技術分野で知られている。これらの培地のいずれも、必要に応じて、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩のような）、緩衝剤（H E P E S、リン酸カリウム、リン酸ナトリウムのような）、ヌクレオシド（アデノシン及びチミジンのような）、抗生物質、微量元素、及びグルコース又は同等のエネルギー源で補充してよい。当業者には知られている、他の必要などの補充物も、適正な濃度で含めてよい。温度、pH、等のような培養条件は、発現のために選択される宿主細胞ですでに使用したものであり、当業者に明らかであろう。

【0207】

[000269] 分泌されるタンパク質を培養基より回収する。精製の間のタンパク分解的な分解を阻害するにはフェニルメチルスルホニルフルオリド（P M S F）のようなプロテアーゼ阻害剤が有用であり得て、偶発的な汚染体の増殖を防ぐために抗生物質を含めてよい。この組成物は、当該技術分野で知られている方法を使用して、濃縮、濾過、透析、等してよい。

【0208】

[000270] 本発明の二倍体細胞を産生目的のために増殖させる。そのような産生目的には、望ましくは、最少培地（この培地は、プレ生成アミノ酸や他の複合生体分子を欠く）、例えば、窒素源としてのアンモニア、エネルギー及び炭素源としてのグルコース、及び、リン酸、カルシウム、等の供給源としての塩類を含んでなる培地における増殖が含まれる。好ましくは、そのような産生培地は、抗生物質、アミノ酸、プリン、ピリミジン、等のような選択薬剤を欠く。二倍体細胞は、高い細胞密度、例えば、少なくとも約50 g/L、より通常は、少なくとも約100 g/Lまで増殖させることができ、少なくとも約300、約400、約500 g/L以上であってよい。

【0209】

[000271] 本発明の1つの態様では、本主題の細胞の産生目的の増殖を低温で実施して、その温度は、対数期の間、定常期の間、又はその両方で低くしてよい。「低温」という用語は、少なくとも約15℃、より通常は、少なくとも約17℃の温度のことを指し、約20℃であってよく、そして通常は、約25℃以下、より通常は、約22℃以下である。増殖温度は、完全長の分泌タンパク質の産生培養物における産生に影響を及ぼす可能性があり、この培養増殖温度を下げることで、インタクトな産物の収率を強く高めることができる。低下された温度は、細胞プロテアーゼ分解の抑制とともに、標的産物を産生するのに宿主が使用するフォールディング及び翻訳後プロセッシング経路を介して、細胞内輸送に役立つようである。

【0210】

[000272] 本発明の方法は、分泌される活性タンパク質、好ましくは哺乳動物のタンパク質の発現をもたらす。1つの態様において、分泌される「活性抗体」は、本明細書に使用するように、そのコグネイト抗原へ正確に結合する、少なくとも2つの適切に対合した鎖の正確に折り畳まれた多量体のことを指す。活性タンパク質の発現レベルは、通常は少なくとも約10～50 mg/リットル培養物、より通常は少なくとも約100 mg/リットル、好ましくは少なくとも約500 mg/リットルであり、1000 mg/リットル以

上であってよい。

【0211】

[000273] 本発明の方法は、宿主と異種コーディング配列の産生の間の増加された安定性をもたらすことができる。この安定性は、例えば高いレベルの発現の経時的な維持によって裏付けられ、ここで開始の発現レベルは、約20%以下、通常は10%以下だけ減少し、そして約20回の増倍、50回の増倍、100回の増倍、又はそれ以上にわたって約5%以下だけ減少してよい。

{000274} この株安定性はまた、異種遺伝子配列の完全性の経時的な維持をもたらし、ここで活性コーディング配列の配列と必要な転写調節エレメントは、約20回の増倍、50回の増倍、100回の増倍、又はそれ以上にわたって、二倍体細胞の少なくとも約99%において、通常は二倍体細胞の少なくとも約99.9%において、そして好ましくは、二倍体細胞の少なくとも約99.99%において維持される。好ましくは、実質的にすべての二倍体細胞が、活性コーディング配列と必要な転写調節エレメントの配列を維持する。

【0212】

[000275] 当業者によく知られた同じ慣用手段を使用して第二の発現ベクターを産生するが、前記発現ベクターは、オペロンと、抗体軽鎖をコードするDNA配列を含有し、ここで抗体特異性に必要とされるCDRをコードするDNA配列は、ウサギB細胞源から導かれるのに対し、抗体鎖の残る部分をコードするDNA配列は、ヒト細胞源から導かれる。

【0213】

[000276] 当業者によく知られた慣用技術によって発現ベクターを宿主細胞へトランスフェクトしてトランスフェクトされた宿主細胞を産生し、前記トランスフェクトされた宿主細胞培養を当業者によく知られた慣用技術によって培養して、前記抗体ポリペプチドを産生する。

【0214】

[000277] 宿主細胞は、オペロンとヒト化ウサギ軽鎖由来ポリペプチドをコードするDNAを含有する第一の発現ベクターと、オペロンとヒト化ウサギ重鎖由来ポリペプチドをコードするDNAを含有する第二のベクターという、上記に記載の2つの発現ベクターで同時トランスフェクトしてよい。この2つのベクターは、異なる選択可能マーカ含有するが、好ましくは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの実質的に等しい発現を達成する。あるいは、単一のベクターを使用してよく、このベクターには、ヒト化ウサギ重鎖及び軽鎖ポリペプチドとともにコードするDNAが含まれる。

【0215】

[000278] 2つの形質転換された一倍体細胞を遺伝的に交配させて、この接合イベントより生じる二倍体株をそのハイブリッド栄養要求性及び／又は抗生物質抵抗性のスペクトルによって選択してよい。あるいは、この2つの形質転換された一倍体株の集団をスフェロプラスト化して融合させて、二倍体子孫を再生して、選択する。いずれの方法によっても、二倍体株は、その親とは異なる培地で増殖する能力に基づいて、同定して選択的に増殖させることができる。例えば、二倍体細胞は、抗生物質を含めてよい最少培地で増殖させてよい。この二倍体合成戦略には、確かな利点がある。二倍体株には、組換えタンパク質の産生及び／又は分泌に影響を及ぼす場合がある、潜在的な（underlying）突然変異に対するより広い相補性を介して増強レベルの異種タンパク質を産生するポテンシャルがある。さらに、安定した株が入手されたならば、これらの株を選択するのに使用したどの抗生物質も、必ずしもその増殖培地に継続的に存在している必要はない。

【0216】

[000279] 抗体ポリペプチドを発現するのに使用する宿主細胞は、大腸菌のような細菌細胞であっても、真核細胞であってもよい。本発明の特に好ましい態様では、骨髓腫細胞又はチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系のような、この目的のために正しく定義された種類の哺乳動物細胞を使用してよい。

【0217】

[000280] ベクターを構築し得る一般的な方法、宿主細胞を産生するのに必要とされるトランスフェクション方法、及び抗体ポリペプチドを前記宿主細胞より産生するのに必要とされる培養方法には、すべてに慣用の技術が含まれる。好ましくは、抗体を産生するのに使用する細胞系は哺乳動物の細胞系であるが、大腸菌由来の細菌株のような細菌細胞系、又は酵母細胞系といった他のどの好適な細胞系も、代わりに使用してよい。

【0218】

[000281] 同様に、ひとたび産生されたならば、ヒト化ウサギ抗体ポリペプチドは、例えば、クロスフロー濾過、硫酸アンモニウム沈殿、親和性カラムクロマトグラフィー、等のような、当該技術分野の標準手順に従って精製してよい。

【0219】

[000282] 本明細書に記載のヒト化抗体ポリペプチドは、本発明の抗体ポリペプチドと同じ治療応用に有用であろうペプチド又は非ペプチドのいずれかの模倣体の設計及び合成にも使用してよい。例えば、その内容がその全体において参照により本明細書に組み込まれる、Saragobi et al, Science, 253:792-795 (1991) を参照のこと。

【0220】

[000283] 投与

[000284] 本発明に従って産生されるヒト化ウサギ抗体及び断片及び含有する融合物は、好ましくは、ヒトの療法に、又は腫瘍部位の *in vivo* 造影のような診断法に使用される。本発明の1つの態様において、本明細書に記載のヒト化抗体、又はそのヒト化結合断片、並びに前記抗体断片の組合せは、レシピエント被検者の体重1 kgにつき約0.05 mgと10.0 mgの間の濃度で被検者へ投与される。本発明の好ましい態様において、本明細書に記載のヒト化抗体、又はそのヒト化結合断片、並びに前記抗体断片の組合せは、レシピエント被検者の体重1 kgにつき約0.1～1.0 mgの間の濃度で被検者へ投与される。

【0221】

[000285] 本発明の別の態様において、本明細書に記載のヒト化ウサギ抗体、又はその結合断片、並びに前記抗体断片の組合せは、被検者へ医薬製剤において投与される。

[000286] 「医薬組成物」は、哺乳動物への投与に適した化学的又は生物学的な組成物のことを指す。そのような組成物は、具体的には、限定されないが、頬内、表皮、硬膜外、吸入、動脈内、心臓内、脳室内、皮内、筋肉内、鼻腔内、眼内、腹腔内、脊髄内、鞘内、静脈内、経口、非経口、浣腸剤又は坐剤により直腸へ、皮下、真皮下、舌下、経皮、及び経粘膜が含まれる数多くの経路の1以上を介した投与のために製剤化され得る。加えて、投与は、注射剤、散剤、液剤、ゲル剤、滴剤の手段、又は他の投与手段によって起こり得る。

【0222】

[000287] 「医薬賦形剤」又は「医薬的に許容される賦形剤」は、活性のある治療薬剤がその中で製剤化される担体、通常は液剤である。本発明の1つの態様において、活性のある治療薬剤は、IL-6又はTNF- α に特異的なヒト化抗体、又はその1以上の断片である。一般に、賦形剤は、製剤に対して薬理活性をまったく提供しないが、それは、化学的及び／又は生物学的安定性と放出特性を提供する場合がある。例示の製剤については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、「レミントンの薬科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」第19版、Grennaro, A. 監修 (1995年)に見出すことができる。

【0223】

[000288] 本明細書に使用するように、「医薬的に許容される担体」又は「賦形剤」には、生理学的適合性がある、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌及び抗真菌剤、等張剤、及び吸収遅延剤が含まれる。1つの態様において、担体は、非経口投与に適している。あるいは、担体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、又は舌下の投与に適したものであり得る。医薬的に許容される担体には、無菌の水溶液剤又は分散剤と、無菌の注射可能な溶液剤又は分散剤の即時調製用の無菌散剤が含まれる。そのような媒体及び薬剤

の医薬活性物質への使用は、当該技術分野でよく知られている。どの慣用の媒体又は薬剤も活性化化合物と不適合であることがない限りにおいて、本発明の医薬組成物におけるその使用が考慮される。補充の活性化化合物もその組成物へ取り込むことができる。

【0224】

[000289] 医薬組成物は、典型的には、無菌で、製造及び保存の条件の下で安定でなければならない。組成物は、溶液剤、ミクロエマルジョン、リボソーム、又は高い薬物濃度に適した他の秩序構造として製剤化することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液状ポリエチレングリコール）、及びこれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であり得る。適正な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング剤の使用により、分散の場合に必要なとされる粒径の維持により、そして界面活性剤の使用によって維持することができる。

10

【0225】

[000290] 多くの場合において、等張剤、例えば、糖類、マンニトール、ソルビトールのような多価アルコール、又は塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましいであろう。注射可能な組成物の延長吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物に含めることによってもたらしすることができる。さらに、アルカリ性のポリペプチドは、時間放出製剤において、例えば、徐放性ポリマーが含まれる組成物において製剤化することができる。活性化化合物は、インプラントやマイクロカプセル化送達系が含まれる制御放出製剤のように、該化合物を迅速放出に対して保護する担体とともに調製することができる。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸、及びポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体（PLG）のような、生物分解性、生体適合性のポリマーを使用することができる。そのような製剤の調製のための多くの方法が当業者に知られている。

20

【0226】

[000291] 引用した態様のそれぞれで、化合物は、多様な剤形によって投与することができる。当業者に知られているあらゆる生物学的に許容される剤形とその組合せが考慮される。そのような剤形の例には、限定なしに、復元可能な散剤、エリキシル剤、液剤、溶液剤、懸濁液剤、乳剤、散剤、顆粒剤、粒子剤、微粒子剤、分散性顆粒剤、カシェ剤、吸入剤、エアゾール吸入剤、パッチ剤、粒子吸入剤、インプラント剤、デポーインプラント剤、注射剤（皮下、筋肉内、静脈内、及び皮内が含まれる）、注入剤、及びこれらの組合せが含まれる。

30

【0227】

[000292] 本発明の様々な例示態様についての上記の記載は、徹底的であることも、本発明を開示される正確な形態へ限定することも企図していない。本明細書では、本発明の具体的な態様とその実施例について例示目的で記載するが、当業者が認めるように、様々な同等の修飾も本発明の範囲内で可能である。本明細書に提供する本発明の教示は、上記に記載の諸例以外の他の目的にも適用することができる。

【0228】

[000293] 上記の詳しい説明に照らして、本発明に対して上記や他の変更を加えることができる。概して言えば、以下の特許請求項において、使用される用語は、本明細書及び特許請求項において開示される具体的な態様へ本発明を限定するように解釈してはならない。従って、本発明は、本開示によって限定されないが、その代わり、本発明の範囲は、以下の特許請求項によって完全に決定されるべきである。

40

【0229】

[000294] 本発明は、先の記述と諸例に特に記載されるもの以外のやり方で実施してよい。上記の教示に照らして、本発明の数多くの修飾及び変更が可能であるので、それらは、付帯の特許請求項の範囲内にある。

【0230】

[000295] 抗原特異的B細胞のクローン集団を入手するための方法に関するいくつかの教示が、その開示がその全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国仮特許出

50

願番号 60 / 801, 412 (2006 年 5 月 19 日出願) に開示されている。

【0231】

[000296] 接合コンピテント酵母を使用して抗体又はその断片を産生することと対応する方法に関するいくつかの教示が、その開示がその全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願番号 11 / 429, 053 (2006 年 5 月 8 日出願) (米国特許出願公開公報番号 US 2006 / 0270045) に開示されている。

【0232】

[000297] 「背景技術」、「発明を実施するための形態」、及び「実施例」において引用される各文献 (特許、特許出願、雑誌記事、抄録、マニュアル、書籍、又は他の開示が含まれる) の全開示は、その全体において参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0233】

[000298] 以下の実施例は、本発明を作製及び使用する方法についての完全な開示及び記載を当業者に提供するように述べるものであり、本発明とみなされるものの範囲を限定することを企図するものではない。使用する数字 (例えば、量、温度、濃度、等) に関して正確を期すように努力を払ったが、いくつかの実験誤差及び偏差は許容されるべきである。他に示さなければ、分率は重量分率であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏 (°C) であり、そして気圧は、大気圧又はその付近である。

【実施例】

【0234】

[000299] 実施例

20

[000300] 実施例 1 : 濃縮された抗原特異的 B 細胞抗体培養物の産生

[000301] 目的の標的抗原へのネイティブな免疫応答を利用すべき伝統的な抗体宿主動物を免疫化することによって、抗体のパネルを導く。典型的には、免疫化に使用する宿主は、ウサギであるか、又は同様の成熟化プロセスを使用して抗体を産生して、匹敵する多様性、例えば、エピトープ多様性の抗体を産生する抗原特異的 B 細胞の集団をもたらす他の宿主である。初回の抗原免疫化は、完全フロイントアジュバント (CFA) を使用して行うことができ、後続の追加免疫は、不完全アジュバントで実効することができる。免疫化の約 50 ~ 60 日後、好ましくは 55 日目に、抗体力価を試験して、適正な力価が確認されたならば、抗体選択 (ABS) 法を開始する。ABS 開始の鍵となる 2 つの判定基準は、ポリクローナル血清における強力な抗原認識と機能修飾活性である。

30

【0235】

[000302] 陽性の抗体力価を確認した時点で、動物を犠牲にして、B 細胞源を単離する。これらの供給源には、脾臓、リンパ節、骨髄、及び末梢血単核細胞 (PBMC) が含まれる。単一細胞懸濁液を産生し、この細胞懸濁液を洗浄して、それらを低温での長期保存に適合可能なものとする。次いで、この細胞を、典型的には凍結させる。

【0236】

[000303] 抗体同定法を開始するために、凍結細胞懸濁液の小画分を融解し、洗浄して、組織培養基に入れる。次いで、これらの懸濁液を、動物の免疫応答を産生するために使用した抗原のビオチニル化形態と混合し、Miltenyi 磁気ビーズ細胞選択の方法論を使用して、抗原特異的な細胞を回収する。ストレプタビジンビーズを使用して、特異的な濃縮

40

を実行する。濃縮された集団を回収して、特異的 B 細胞単離の次段階へ進める。

【0237】

[000304] 実施例 2 : クローンの抗原特異的 B 細胞含有培養物の産生

[000305] 次いで、実施例 1 に従って産生した濃縮 B 細胞を、96 ウェルマイクロタイタープレートにおいて、ウェルあたりの様々な細胞密度でプレート培養する。概して言えば、これは、各群 10 のプレートで、ウェルにつき 50、100、250、又は 500 個の細胞である。この培地に、4% の活性化ウサギ T 細胞条件付け培地を 50 K 凍結照射 EL4 B フィーダー細胞とともに補充する。これらの培養物を 5 ~ 7 日間静かに放置して、その時点で、分泌される抗体を含有する上清を採取して、別のアッセイ設定において標的特性を評価する。残りの上清はインタクトなままとして、プレートを -70 °C で凍結させ

50

る。これらの条件の下で、この培養法は、典型的には、抗原特異的 B 細胞のクローン集団を含む混合した細胞集団を含有するウェルをもたらす（即ち、単一のウェルは、所望の抗原に特異的な単一のモノクローナル抗体だけを含有する）。

【0238】

[000306] 実施例 3：抗体上清について所望の特異性及び／又は機能特性のモノクローナル抗体をスクリーニングすること

[000307] 実施例 2 に従って産生されるクローン抗原特異的 B 細胞集団を含有するウェルから導かれる抗体含有上清について、最初に、E L I S A 法を使用して抗原認識をスクリーニングする。これには、選択的な抗原固定化（例えば、ストレプトタビジンコート化プレートによるビオチニル化抗原の捕捉）、非特異的な抗原のプレートコーティング、またあるいは、抗原組立戦略を介すること（例えば、選択的な抗原捕捉に結合パートナー付加を続けて、ヘテロマーのタンパク質-抗原複合体を産生すること）が含まれる。次いで、抗原陽性ウェルの上清を、リガンドに厳密に依存する機能修飾アッセイにおいて試験してもよい。1 つのそのような例は、抗原リガンドの組換え受容体タンパク質との天然の相互作用を再現する *in vitro* のタンパク質-タンパク質相互作用アッセイである。あるいは、リガンド依存型であり、容易にモニタリングされる細胞ベースの応答（例、増殖応答）を利用する。有意な抗原認識及び力価を示す上清を陽性ウェルとみなす。次いで、元の陽性ウェルから導かれる細胞を抗体回収段階へ移す。

【0239】

[000308] 実施例 4：所望の抗原特異性のある単一の抗体産生 B 細胞の回収

[000309] 単一の抗体配列を分泌する抗原特異的 B 細胞のクローン集団（実施例 2 又は 3 に従って産生される）を含有するウェルより少数の細胞を単離する。次いで、この単離した細胞をアッセイして、単一の抗体分泌細胞を単離する。Dyna1 ストレプトタビジンビーズを緩衝培地下にビオチニル化標的抗原でコートして、細胞の生存能力と適合する抗原含有マイクロビーズを調製する。次に、抗原負荷ビーズ、陽性ウェルからの抗体産生細胞、及びフルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識化した抗宿主 H&L IgG 抗体（注記したように、宿主は、どの哺乳動物の宿主（例、ウサギ、マウス、ラット、等）でもよい）を 37℃ で一緒にインキュベートする。次いで、この混合物を、各アリコートが平均して単一の抗体産生 B 細胞を有するように、ガラススライド上へアリコートで再ピペッティングする。次いで、蛍光顕微鏡により、抗原特異的な抗体分泌細胞を検出する。分泌された抗体は、結合した抗原により隣接ビーズ上へ局所的に濃縮されて、強い蛍光シグナルに基づいた局在化情報を提供する。分泌細胞の隣に形成される抗体-抗原複合体の FITC 検出により、抗体分泌細胞を同定する。次いで、この複合体の中心に見出される単一細胞を、マイクロマニピュレータを使用して回収する。この細胞は、抗体配列を始めるまで、-80℃での保存のためにエッペンドルフ PCR 管において瞬間凍結させる。

【0240】

[000310] 実施例 5：抗原特異的 B 細胞からの抗体配列の単離

[000311] 実施例 4 に従って産生される単一の単離 B 細胞、又は実施例 2 に従って入手されるクローン B 細胞集団から単離される抗原特異的 B 細胞より、組み合わせた RT-PCR ベースの方法を使用して、抗体配列を回収する。ウサギ免疫グロブリン配列のような標的免疫グロブリン遺伝子（重鎖及び軽鎖）の保存されて定常的な領域においてアニールするようにプライマーを設計して、2 工程のネステッド PCR 回収工程を使用して抗体配列を得る。各ウェルからのアンプリコンについて、回復とサイズ完全性を分析する。次いで、得られる断片を AluI で消化して、配列クローン性のフィンガープリントを取る。同一の配列は、その電気泳動分析において、共通した断片化パターンを示す。重要にも、細胞クローン性を証明するこの共通の断片化パターンは、一般に、初めに 1000 細胞／ウェルまでプレート培養したウェルにおいても観察される。次いで、元の重鎖及び軽鎖アンプリコン断片を HindIII 及び XhoI 又は HindIII 及び BsiwI で制限酵素消化して、クローニング用 DNA のそれぞれの切片を調製する。次いで、得られる消

化物を発現ベクター中へライゲートして、プラスミドの増殖及び産生用のために細菌へ形質転換させる。配列特性決定のためにコロニーを選択する。

【0241】

[000312] 実施例6：所望の抗原特異性及び／又は機能特性のモノクローナル抗体の組換え産生

[000313] 単一のモノクローナル抗体を含有する各ウェルについて正確な完全長の抗体配列を確立して、Qiagen固相法の方法論を使用してミニプレブDNAを調製する。次いで、DNAを使用して哺乳動物細胞をトランスフェクトして、組換え完全長抗体を産生する。粗製の抗体産物について抗原認識と機能特性を試験して、元の特徴がこの組換え抗体タンパク質に見出されることを確認する。適宜、大規模な一過性の哺乳動物トランスフェクションを完了して、プロテインA親和性クロマトグラフィーにより抗体を精製する。標準法（例、Biacore）を使用してKdを評価するとともに、力価アッセイにおいてIC50を評価する。

10

【0242】

[000314] 実施例7：HuTNF- α 又はIL-6のような所望の抗原へ結合する抗体の調製

[000315] 本明細書に記載の抗体選択プロトコールを使用することによって、TNF- α 又はIL-6又は別の所望の抗原に対して強力な機能的拮抗作用を示す抗体のコレクションを産生することができる。この抗体は、多様なエピトープを明らかにすることによって、Remicade（登録商標）（インフリキシマブ）のように、Hu-TNF- α 、TNF- α エピトープの場合のような特別な抗原についてかつて同定されたエピトープへ標的指向する抗体に対する有用な代替品又はそれとの補助剤を提供する可能性がある。

20

【0243】

[000316] IL-6又はTNF- α のいずれか一方の具体的な事例では、スクリーニング方法を利用して、有意な機能的拮抗作用を保持する一方で、代替的なIL-6又はTNF- α のエピトープへ結合する抗体を同定することができる。例えば、TNF- α の場合、一次の抗原認識スクリーニングの後で、陽性のBCCウェルについて、TNF- α に対する機能的拮抗作用だけでなく、エピトープ競合、例えば、インフリキシマブとの競合を試験することができる。ForteBio Octet の抗体-TNF- α 結合競合試験によって、ユニークなエピトープ認識を確定することができる。機能活性だけでなく競合の不足を示すBCCウェルを捜して、これらのウェルに存在する抗体のコーディング配列を回復させる。回復された配列の大多数は、強力な抗原認識、機能的拮抗作用、及び明白なエピトープ認識という元の標的特徴を示すものである。このように、得られる抗体のコレクションにより、強力な機能的拮抗作用に関連した多数の新規エピトープ領域が確定される。参照により本明細書に組み込まれる仮特許出願では、IL-6で同様の結果が明示されている。

30

【0244】

[000317] 免疫化戦略：

[000318] 米国仮特許出願番号：60/924, 551及び60/924, 551（2007年5月21日出願、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、TNF- α （R&D #210-TA）とヒトIL-6でウサギを免疫化することができる。

40

【0245】

[000319] 抗体選択力価の評価

[000320] そこに記載のプロトコールによって、TNF- α 又はヒトIL-6に対する抗原認識アッセイを定量することができる。

【0246】

[000321] 機能性力価の評価

[000322] 試料の機能活性は、引用の仮特許出願に記載のように定量することができる。例えば、TNF- α の場合、別々に、丸底96-ウェルプレートにおいて、血清試料を1：100希釈（記載の培地において）で加えて、プレート全体（2～10列、11列は

50

、TNF- α 対照用の培地だけであった) で1:10希釈を続けて、5つのレプリケート (B~F行、G行は、バックグラウンド対照用の培地だけであった) で50 μ l / ウェルとした。最終EC50の4倍濃度のTNF- α (濃度は、各ロットについて前もって定量した) と1 μ g / ml のアクチノマイシンDを含有する50 μ l / ウェルの培地をF行以外のすべての試料ウェルへ加えた。プレートを37℃で1時間インキュベートした。

【0247】

[000323] 1時間で、50 μ l の血清 / Ag 複合体と対照を、50 μ l / ウェルのレスポンダー細胞を一定密度で含有する96ウェル平底プレートへ移して (最終容量: 100 μ l / ウェル)、37℃で24時間インキュベートする (蒸発を防いでエッジ効果を引き起こすために、1及び12列とA及びH行を200 μ l の培地で満たす)。

10

【0248】

[000324] 製造業者のプロトコールにより、24時間で、20 μ l / ウェルのCell Titer 96 試薬 (プロメガ) をすべての試験ウェルへ加えて、プレートを37℃で2時間インキュベートした。2時間後、プレートをゆっくり振り混ぜて、試験ウェル中の均質性を可能にする。プレートを490nmの波長で読み取った。Graph Pad Prismを使用して希釈に対してODをプロットして (非線形シグモイドの用量 / 応答曲線を使用した)、機能性力価を定量した。

【0249】

[000325] 組織採取

[000326] 上記に引用した仮特許出願に記載のように、ウサギの脾臓、リンパ節、及び全血を採取し、処理して、凍結させた。

20

【0250】

[000327] B細胞培養 (BCC)

[000328] 参照により組み込まれる仮特許出願に記載のように、B細胞培養物を調製する。

【0251】

[000329] 抗原認識スクリーニング

[000330] 上記に記載のように、抗原認識スクリーニングを単一点として実施した。

[000331] 機能活性スクリーニング

[000332] 引用の仮特許出願に記載のように、機能活性スクリーニングを実施する。例えば、TNF- α の場合は、WEHI細胞傷害性アッセイによってそれを定量する。マスタープレート (複数) からの上清をTNF- α 刺激WEHI細胞傷害性アッセイ (上記に記載のような) において単一点として試験した。上清について先の記載と同様に試験した。

30

【0252】

[000333] 組換え抗体についての二次機能活性アッセイ: huTNF- α で処理したHUVEC細胞によるIL-6発現のブロッキング

[000334] 参照により本明細書に組み込まれる同じ仮特許出願に記載のように、TNF- α 又はIL-6特異的アッセイを実効することができる。例えば、TNF- α の場合、ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) を内皮増殖培地 (EGM) の培地と適正なHUVEC補充物 (Cambrex) において型通りに維持する。アッセイの当日、トリパンブルーによってHUVECの生存度を定量する。この細胞をアッセイに必要な適正容量の培地 (100 μ l / ウェル) において5E05 / ml で再懸濁させる。96ウェル平底培養プレートの中段ウェルにおいて細胞をプレート培養して、蒸発を防ぐために外側のすべてのウェルへ200 μ l の培地を加えた。このプレートを37℃で24時間インキュベートした。

40

【0253】

[000335] 24時間で、適正な抗体希釈液を所望の最終濃度の4倍でEGMにおいて作製する (出発の抗体濃度は、1 μ g / ml であった; 最終行を除いて、プレート全体で1:3の希釈を実施した)。このウェルへEGM中の同量のrhTNF- α (所望の最終

50

濃度の4倍)を加えた。このプレートを37℃で1時間インキュベートして、抗体/抗原複合体を生成した。1時間で、HUVEC培養プレートより50μlの培地を取り出して、捨てた。50μlのAb-Ag混合物を加えて、プレートを37℃で48時間インキュベートした。標準の陽性及び陰性対照を含めた。

【0254】

[000336] 48時間で、条件付け培地のIL-6レベルをELISAによって評価した。Immulonプレートを1μg/mlのヤギ抗huIL-6(50μl/ウェル)で、4℃で一晩、又は室温で1時間コートした。このプレートをプレートウォッシャーにおいてPBS+0.5% Tween 20で洗浄した(200μl/ウェル;3回)。このプレートを200μl/ウェルのFSGで、室温で1時間ブロックした。ブロッキング溶液を吸引して、プレートをプロットした。huIL-6標準品をセットし、1μg/mlで開始して、プレート全体で1:3に希釈した(すべての希釈液をFSGで作製する)。HUVEC培養物からの試料を標準曲線下のウェルへ加えて、室温で1時間インキュベートした。洗浄を繰り返した。1μg/mlのヒト化抗体(抗huIL-6)を50μl/ウェルでプレートへ加えて、室温で1時間インキュベートした。洗浄を繰り返した。二次抗ヒトIgG Fc HRPを1:5000の希釈で50μl/ウェルで加えて、室温で45分間インキュベートした。洗浄を繰り返した。50μl/ウェルの3, 3', 5, 5' テトラメチルベンチジン(TMB)を用いて、少なくとも5分間アッセイ液を発色させた。この反応を50μl/ウェルのHClで止めて、プレートをプレートリーダーにおいて450nmで読み取った。Graph Pad Prismを使用して、データを解析した。

【0255】

[000337] B細胞回収

[000338] 上記に引用した仮特許出願に記載のように、huIL6とhuTNF-αのフォーカス(foci)プロトコールを実施する。

【0256】

[000339] 実施例8:本発明に従った、例示のヒト化ウサギ抗体(IL-6に特異的な)の調製

[000340] 参照により組み込まれる仮特許出願に記載のように、そして上述の実施例に従って産生されるウサギ抗huIL-6抗体から導かれる重鎖及び軽鎖を、本明細書に記載されて図1に概略的に図示するヒト化戦略を使用してヒト化した。例示のウサギ抗IL-6抗体の可変軽鎖領域(このIL-6特異性抗体のFR1からFR3までを含有する領域)について、BLASTを使用してヒト生殖細胞系配列のライブラリーに対してスクリーニングして、このライブラリー中の他のヒト生殖細胞系配列に比べて、それに対して有意な相同性を有する3つの生殖細胞系配列、即ち、V1-6、V1-27、及びV1-5を同定した。生殖細胞系配列V1-6は、ウサギ軽鎖可変配列に対して最大の配列同一性を示すことがわかったので、図3において「aggres」及び「consrv」と表記する2つのヒト化軽鎖バージョンを産生するための出発材料として選択した。これらの配列は、本質的には、V1-6ヒト生殖細胞系配列を、この図の上半分に示すようなウサギ親の抗IL-6 CDR1及びCDR2領域からの特異的な選択性決定残基で修飾することによって、そしてさらにドナー(ウサギ)FR残基をわずかに取り込む(consrvバージョン)か又は全く取り込まない(aggresバージョン)ことによって導いた。特に、図3に示すように、ウサギ軽鎖CDR3とウサギ軽鎖FR4配列に相同的なヒトFR4配列とのV1-6配列の融合によって、ウサギFR残基が取り込まれていない1つのヒト化軽鎖(図において「aggres」と呼ぶ)を産生した。ウサギ軽鎖FR1からの2つのFR残基を含有する、同じ図に図示される「consrv」と呼ぶ別のバージョンを産生した。

【0257】

[000341] 同様のヒト化方法を使用して、そして図1に概略的に図示されるように、CDR1及びCDR2と関連のFR領域を含有する好ましい抗IL-6抗体の可変領域を、

ヒト生殖細胞系配列のライブラリーに対するBLAST法を使用するスクリーニングに使用して、それへ最も相同的なヒト生殖細胞系配列を同定した。図に示すように、このスクリーニングにより、図2の配列を含有する3つの相同的なヒト生殖細胞系配列、V3-66、V3-53、及びV3-23を同定した。最も相同的なヒト生殖細胞系配列、V3-23を出発材料として再び使用して、対応するヒトCDR1及びCDR2残基を選んだ重鎖のCDR1及びCDR2領域の特異的な選択性決定残基の取込みと、少数の離散したウサギFR残基のさらなる取込みとウサギCDR3領域と相同的なヒトFR4領域への融合により同様に修飾した2つのヒト化バージョンを産生した。「aggres」及び「consrv」として再び呼ばれる、得られる2つのヒト化重鎖を図3の下に示す。並置した配列に基づけば、これらのヒト化バージョンが、「aggres」には存在しない、「consrv」バージョン中のいくつかのウサギFR3残基の存在においてのみ異なることが見てとれる。これらの配列はともに、ヒト生殖細胞系配列に比較して、相対的に少ない数の残基でのみ異なるので、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であるはずである。

10

【0258】

[000342] 「aggres」ヒト化重鎖及び軽鎖と「consrv」のいずれかを含有するヒト化抗IL-6抗体は、親ウサギ抗体にきわめて近似したIL-6結合親和性を保有することが見出された。このことは、本発明のヒト化戦略の有効性を立証するとともに、これらの方法を使用して、きわめて「ヒト様」である配列を有して、ヒト被検者において実質的に非免疫原性であるはずの、様々な抗原に対するヒト化抗体を産生することが可能であることをさらに示唆する。

20

【0259】

[000343] 実施例9：本発明に従って産生される例示のヒト化ウサギ抗体（hIL-6及びhTNF- α に特異的な）の保持された親和性特性

[000344] 上記に考察したように、本発明の重要な利点は、本主題のヒト化方法が、高い親和性を保有する（即ち、結合親和性がそれより導かれる親ウサギ又はキメラの抗体のそれに匹敵する）ヒト化抗体を再現可能的に生じることにある。このことは、図4に含まれる解離定数によって例示される。そこでは、2つの異なるウサギキメラ抗ML-6抗体の解離定数が、本発明の方法を使用してすべて産生した、それより導かれる3及び2の異なるヒト化抗体にそれぞれ比較されている。この図に含まれるデータより、解離定数は、ほとんどの場合、キメラからそれより導かれるヒト化変異体まで概ね不変であることがわかる。最悪の場合でも、解離定数は、概ね3.5倍低下する。このことは、抗原結合親和性の実質的な消失（即ち、親からヒト化バージョンに対して1桁以上の大きさの消失）を典型的にはもたらす、他のヒト化方法に対照的である。

30

【0260】

[000345] 加えて、同じ図4は、2つの異なるキメラウサギ抗hTNF- α 抗体の解離定数を、本発明のヒト化の方法論を使用してそれより導かれるヒト化抗体に比較するデータを含有する。同様に、親ウサギ由来のキメラ抗hTNF- α 抗体とヒト化抗体の解離定数は、実質的に同じである。これらの結果は、本主題のヒト化方法の再現可能性、即ち、異なるウサギ抗体配列をヒト化することと、異なる抗原へ特異的な抗体をヒト化することへのその広汎な応用可能性を例証する。

40

【0261】

[000346] 実施例10：本発明に従って産生される例示のヒト化ウサギ抗体（hIL-6及びhTNF- α に特異的な）の保持された機能特性

[000347] 先の実施例に示すように、本発明に従って産生されるヒト化抗体は、それらが導かれる親ウサギ抗体に匹敵する抗原結合定数を保有する。そのことに基づいて、親キメラ抗体とそれより導かれるヒト化変異体の拮抗作用特性も同じように同等であろうと予測した。実際に、こういった発明者たちの予測を確認した。

【0262】

[000348] 図5及び6に示すように、本発明者たちは、ウサギ抗IL-6抗体から導かれる2つの異なるキメラ抗体の拮抗作用特性を、それぞれから導かれる2つの異なるヒト

50

化抗体とそれぞれ比較した。拮抗作用は、これらの抗 h I L - 6 抗体の h I L - 6 依存型細胞増殖に対する効果を検出するアッセイ（アンタゴニスト活性を検出するのに受け入れられている機能アッセイ）において比較した。図 5 及び 6 のデータより、h I L - 6 依存型細胞増殖の障害がキメラ抗体とそれより導かれるヒト化抗体で実質的に同一であることが見てとれる（細胞増殖データ曲線は、異なる抗体濃度で実質的に重なっているか又はきわめて類似している）。

【0263】

[000349] さらに、図 7 に示すように、本発明者たちは、ウサギ抗 h T N F - α 抗体から導かれる、h T N F - α に特異的なキメラ抗体の拮抗作用特性を、本主題のヒト化方法論を使用して産生した、それから導かれるヒト化抗体と比較した。拮抗作用は、これらの抗 h T N F - α 抗体の h T N F - α 依存型細胞傷害性に対する効果を検出するアッセイ（抗 h T N F - α 抗体のアンタゴニスト活性を検出するのに受け入れられた機能アッセイ）において比較した。図 7 のデータより、h T N F - α 依存型細胞傷害性の障害がキメラ抗体とそれより導かれるヒト化抗 h T N F - α 抗体できわめて類似していることが見てとれる（細胞傷害性データ曲線は、異なる抗体濃度で実質的に重なっているか又はきわめて類似している）。

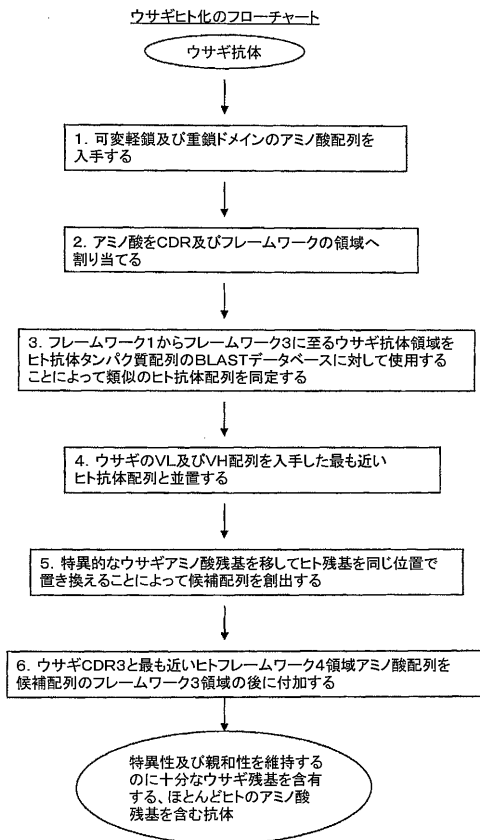
【0264】

[000350] 上記の実施例は、本発明とその内在の利点の例示であることを企図している。実際、本発明のヒト化方法を使用して、所望の抗原に対して特異性を有するどのウサギ抗体（又は近縁種のそれ）もヒト化することができる。好ましくは、これらの抗体は、ヒトの療法に適した標的抗原に特異的であり、この標的抗原に対して高い親和性を保有するものである。例えば、そのような抗体には、特に、「IL-6 antibodies and Use Thereof（I L - 6 抗体とその使用）」及び「Anti-TNF Antibodies（抗 T N F 抗体）」と題して代理人ドケット番号 6 7 8 5 8 . 9 0 1 9 0 2 及び 6 7 8 5 8 . 7 0 1 8 0 2 をそれぞれ有する米国シリアル番号 6 0 / 9 2 4 , 5 5 0 及び 6 0 / 9 2 4 , 5 5 1 と P C T 出願（2008 年 3 月 2 1 日出願）に開示されるウサギ抗体重鎖及び軽鎖配列のいずれも含めてよく、その仮特許出願及び P C T 出願は、そこに報告されるすべての抗体配列を含めて、その全体において参照により本明細書に組み込まれる。加えて、特許請求するヒト化方法とそれにより入手可能なヒト化抗体産物についてさらに記載して例示するために、これらの P C T 出願のいずれもの配列目録を本明細書の特許請求項に先立って記載する。これらの配列目録は、ウサギ抗体配列と、本発明の方法に従って産生した、I L - 6 と T N F - α に特異的であるヒト化バージョンを含有する。

【0265】

[000351] さらに、本発明のヒト化プロトコールは、どの利用可能なウサギ重鎖又は軽鎖配列をヒト化するのにも、即ち、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、ハプテン、炭水化物、等のようなどの所望の抗原に対しても使用することができる。好ましくは、抗原は、ヒトの抗原、又はヒトに感染するか又はヒトにおいて疾患を引き起こすか又はそれに関連する作用体からの抗原である。好ましくは、ウサギ抗体は、上記の A B S スクリーニングプロトコールによって単離されるウサギ B 細胞から導かれる。

【図 1】

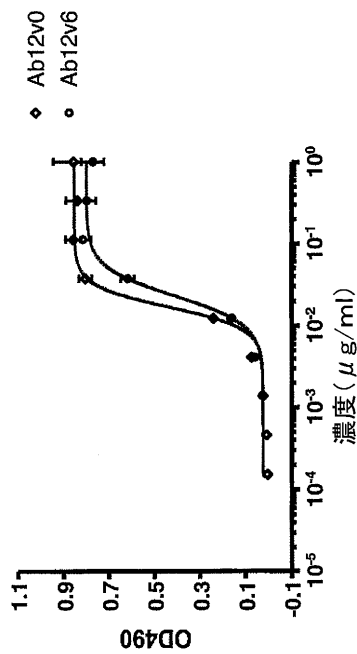


【図 2】



ヒト化Ab12抗体による
hTNF依存型細胞傷害性

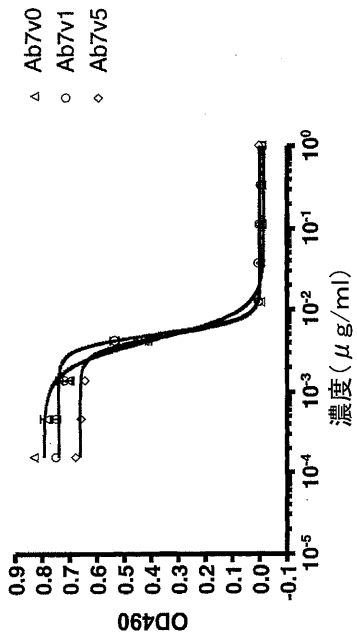
【図 7】



	Ab12v0	Ab12v6
EC50	0.01672	0.02279
pM	111.47	151.93

ヒト化Ab7 (IL-6) 抗体による
IL-6依存型T1165細胞増殖の拮抗作用

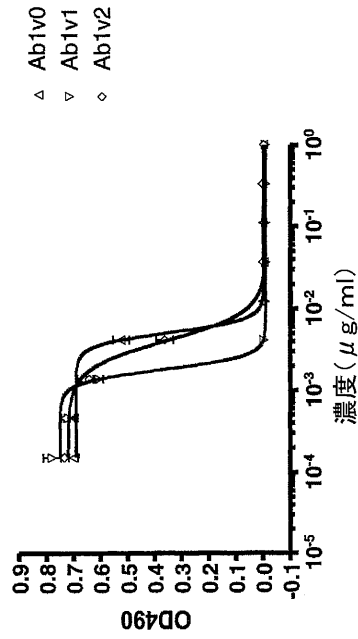
【図 5】



	Ab7	Ab7v1	Ab7v5
EC50	0.004234	0.004983	0.004806
pM	28.23	33.22	32.04

ヒト化Ab1 (IL-6) 抗体による
IL-6依存型T1165細胞増殖

【図 6】



	Ab1	Ab1v1	Ab1v2
EC50	0.005066	0.001792	0.004035
pM	33.77	11.95	26.9

【配列表】

2010528589000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/64421									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/00 (2008.04) USPC - 530/388.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 530/388.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/133.1; 435/320.1 435/326 435/69.1 435/7.1 435/328 530/388.1 536/23.53 702/19 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google; PubMed Search terms: antibody, humanized, framework, FR1, CDR, light, heavy, selectivity determining residue											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2005/0033031 A1 (COUTO) 10 February 2005 (10.02.2005) Fig. 3; claim 2; para [0036], [0040], [0049]-[0051], [0058], [0061], [0071]-[0072], [0075], [0105]-[0106], [0109], [0117]-[0118], [0129]</td> <td>1-30, 34-57, 59-67, and 82-88</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2006/0099204 A1 (COUTO et al.) 11 May 2006 (11.05.2006) para 0034), [0049], [0055]</td> <td>1-30, 34-57, 59-67, and 82-88</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2005/0033031 A1 (COUTO) 10 February 2005 (10.02.2005) Fig. 3; claim 2; para [0036], [0040], [0049]-[0051], [0058], [0061], [0071]-[0072], [0075], [0105]-[0106], [0109], [0117]-[0118], [0129]	1-30, 34-57, 59-67, and 82-88	Y	US 2006/0099204 A1 (COUTO et al.) 11 May 2006 (11.05.2006) para 0034), [0049], [0055]	1-30, 34-57, 59-67, and 82-88
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y	US 2005/0033031 A1 (COUTO) 10 February 2005 (10.02.2005) Fig. 3; claim 2; para [0036], [0040], [0049]-[0051], [0058], [0061], [0071]-[0072], [0075], [0105]-[0106], [0109], [0117]-[0118], [0129]	1-30, 34-57, 59-67, and 82-88									
Y	US 2006/0099204 A1 (COUTO et al.) 11 May 2006 (11.05.2006) para 0034), [0049], [0055]	1-30, 34-57, 59-67, and 82-88									
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 22 September 2008 (22.09.2008)		Date of mailing of the international search report 29 SEP 2008									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/64421

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 31-33 and 58
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 31-33 and 58 are unsearchable because they recite sequences but lack sequence identifiers, as required by Annex C of the Administrative Instructions.

3. ☒ Claims Nos.: 68-81 and 89-91
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
G 0 1 N	33/563	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	P
			G 0 1 N	33/563	
			G 0 1 N	33/574	Z
			G 0 1 N	33/577	Z
			C 0 7 K	16/46	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(74)代理人 100162455

弁理士 辻本 典子

(72)発明者 ラザム, ジョン

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 1 9, シアトル, テンス・アベニュー 2 4 0 9

(72)発明者 コヴァセヴィッチ, ブライアン

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 2 9 6, スノーホーミシュ, サウスイースト, トゥーハンドレッ

ドアンドサーティーサード・ストリート 1 3 9 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 CA01 DA12 GA11 HA15 HA20
4B065 AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 CC05 CC07 CC22 CC23
4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010528589A5	公开(公告)日	2011-07-07
申请号	JP2010509535	申请日	2008-05-21
[标]申请(专利权)人(译)	奥尔德生物制药公司		
申请(专利权)人(译)	阿尔德生物制药公司		
[标]发明人	ラザムジョン コヴァセヴィッチブライアン		
发明人	ラザム,ジョン コヴァセヴィッチ,ブライアン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P43/00 A61P1/14 A61P3/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P17/06 A61P1/04 A61P1/02 A61P19/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P9/10 A61P9/00 A61P3/10 A61P3/04 A61P11/06 A61P25/00 A61P25/28 G01N33/53 G01N33/563 G01N33/574 G01N33/577 C07K16/46		
CPC分类号	A61P1/02 A61P1/04 A61P1/14 A61P3/02 A61P3/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K16/241 C07K16/248 C07K16/461 C07K2317/20 C07K2317/24 C07K2317/567 A61K47/68 C07K16/18 C07K16/22 C07K2317/565 C07K2317/92 C12N15/81		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P1/14 A61P3/02 A61P43/00.107 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P17/06 A61P1/04 A61P1/02 A61P19/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P9/10 A61P9/00 A61P9/10.101 A61P3/10 A61P3/04 A61P11/06 A61P25/00 A61P25/28 G01N33/53.D G01N33/53.P G01N33/563 G01N33/574.Z G01N33/577.Z C07K16/46		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/CA01 4B024/DA12 4B024/GA11 4B024/HA15 4B024/HA20 4B065/AA90Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/924550 2007-05-21 US 60/924551 2007-05-21 US 11/802235 2007-05-21 US		
其他公开文献	JP2010528589A JP5859202B2		

摘要(译)

本发明提供了一种用于人源化免疫重链和轻链可变区的新颖且改进的方法。得到的人源化免疫重链和轻链及其含有的抗体片段非常适合用于免疫治疗和免疫诊断，因为它们保留了亲本抗体的抗原结合亲和力，包括人抗体序列基于其与人类非常高水平的序列同一性，在人类中应该基本上是非免疫原性的。本发明说明了用于制备用于治疗用途的人源化抗人TNF- α 和抗人IL-6抗体的方案。 点域1

