

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5511686号
(P5511686)

(45) 発行日 平成26年6月4日(2014.6.4)

(24) 登録日 平成26年4月4日(2014.4.4)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K	16/46 (2006.01)	C O 7 K	16/46
C O 7 K	16/28 (2006.01)	C O 7 K	16/28
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19

請求項の数 25 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-544182 (P2010-544182)
 (86) (22) 出願日 平成21年12月25日 (2009.12.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/071681
 (87) 国際公開番号 W02010/074266
 (87) 国際公開日 平成22年7月1日 (2010.7.1)
 審査請求日 平成24年12月25日 (2012.12.25)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-331904 (P2008-331904)
 (32) 優先日 平成20年12月26日 (2008.12.26)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000001029
 協和発酵キリン株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (74) 代理人 100090343
 弁理士 濱田 百合子
 (74) 代理人 100129160
 弁理士 古館 久丹子
 (74) 代理人 100177460
 弁理士 山崎 智子
 (72) 発明者 中川 知明
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内
 (72) 発明者 堀 紗也香
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CD4抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体の重鎖可変領域（以下、VHと記す）および軽鎖可変領域（以下、VLと記す）が、配列番号77および配列番号78、配列番号96および配列番号78、配列番号98および配列番号78、配列番号100および配列番号78、ならびに配列番号100および配列番号102から選ばれるいずれか1組のアミノ酸配列であるヒト化抗体であり、且つ抗体の抗原に対する解離定数（以下、KDと記す）が 1×10^{-9} M以下であり、高いアフィニティーでヒトCD4の細胞外領域に結合し、かつ高い抗体依存性細胞傷害活性（Antibody dependent cellular cytotoxicity、以下ADCC活性と記す）を有するヒトCD4に対するモノクローナル抗体および該抗体断片。

【請求項2】

抗体が、高い補体依存性細胞傷害活性（complement dependent cellular cytotoxicity、CDC活性）を有する抗体である請求項1記載のモノクローナル抗体および該抗体断片。

【請求項3】

抗体が、ヒトCD4を発現しているヒト癌細胞株に対してCDC活性を有する抗体である請求項2記載のモノクローナル抗体および該抗体断片。

【請求項4】

モノクローナル抗体が、抗体の重鎖（以下、H鎖と記す）のCDR1~3が配列番号2

7～29で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の軽鎖（以下、L鎖と記す）のCDR1～3が配列番号30～32で表されるアミノ酸配列である抗体と競合して、CD4の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体である、請求項1または2に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【請求項5】

モノクローナル抗体が、抗体のH鎖のCDR1～3が配列番号27～29で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のL鎖のCDR1～3が配列番号30～32で表されるアミノ酸配列である抗体が結合するCD4の細胞外領域に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体である、請求項1～2および4のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

10

【請求項6】

抗体のH鎖のCDR1～3およびL鎖のCDR1～3が、配列番号27～29および配列番号30～32から選ばれるいずれか1組のアミノ酸配列である請求項1～5のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体および該抗体断片。

【請求項7】

抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体断片。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片をコードするDNA。

20

【請求項9】

請求項8に記載のDNAを含有する組換え体ベクター。

【請求項10】

請求項9に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

【請求項11】

請求項10に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

【請求項12】

請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるヒトCD4の免疫学的検出または測定方法。

30

【請求項13】

請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるヒトCD4の検出または測定用試薬。

【請求項14】

請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の診断薬。

【請求項15】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項14に記載の診断薬。

40

【請求項16】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、請求項14に記載の診断薬。

【請求項17】

請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を有効成分として含有するヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の治療薬。

【請求項18】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項17に記載の治療薬。

【請求項19】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、請

50

求項 1 7 に記載の治療薬。

【請求項 2 0】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の診断薬を製造するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項 2 1】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項 2 0 に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項 2 2】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、請求項 2 0 に記載の抗体または該抗体断片の使用。

10

【請求項 2 3】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の治療薬を製造するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項 2 4】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、請求項 2 3 に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【請求項 2 5】

ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、請求項 2 3 に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、高いアフィニティーでヒトCD4細胞外領域に結合し、かつ高い抗体依存的細胞傷害活性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity、以下ADCC活性と記す)、または、高い補体依存性細胞傷害活性 (complement-dependent cellular cytotoxicity、以下CDC活性と記す) を発揮するモノクローナル抗体またはその抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、抗体または該抗体断片を用いる治療薬および診断薬に関する。

【背景技術】

30

【0002】

Cluster of differentiation 4 (以下、CD4と記す) は、胸腺細胞のほとんど、末梢血T細胞の約3分の2、単球、マクロファージ細胞表面に発現する、分子量約55万の糖タンパク質である。CD4はI型膜貫通タンパク質であり、細胞外に4つの免疫イムノグロブリンスーパーファミリードメイン (N末より細胞膜側に向かって、順にD1~D4とする) が存在し、ドメインD3~D4に合計2箇所のN結合型糖鎖が付加している。CD4は、D1、D2ドメインを介して、Major histocompatibility complex (MHC) クラスII分子と結合し、T細胞を活性化する。また、CD4は、D3、D4ドメインを介し、重合することが知られている。CD4のD1ドメインはヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus、以下HIVと記す) のレセプターとなることが知られている (非特許文献1)。

40

【0003】

CD4は、別名T4としても知られ、1985年に遺伝子がクローニングされ (非特許文献2)、CD4のDNA配列、アミノ酸配列および立体構造は、公的データベース上に公開されており、例えば、P01730 (SWISSPROT)、M12807 (EMBL) 等のアクセッション番号から参照可能である。

抗CD4モノクローナル抗体OKT4は、CD4に結合するモノクローナル抗体 (以下mAbと記す) として、初めて確立された (非特許文献3)。以後、CD4に対する多くのモノクローナル抗体 (以下抗CD4mAbと記す) が報告されている。報告されている抗CD4mAbの多くは、D1ドメインを認識することが知られている (非特許文献1)。一部の抗CD4mAbは、癌、免疫疾患、感染症の治療を目指し臨床開発が行われている。例えば、CD4とHIVの結合がHIV感染

50

に必須であることから、HIVが結合するCD4のD1ドメインを認識する抗体は、HIVの感染を阻害する抗体として、HIV治療薬としての開発が進められている。

【0004】

癌または免疫疾患治療薬として開発されている抗CD4mAbには、例えば、zanolimumab (6G5) (非特許文献4)、keliximab (CE9.1) (非特許文献5)などがある。これらの抗体は、標的細胞であるCD4発現細胞を特異的に傷害することにより薬効を発揮する抗体であり、その薬効メカニズムはADCC活性が主であると考えられる(非特許文献6、7)。一方、これらの抗体には、ADCCと同様に、一般に抗体医薬の主な薬効メカニズムの1つとして知られるCDC活性は無いことが示されている(非特許文献6、7)。

【0005】

CDC活性の強さは、抗体のサブクラスにより異なり、ヒトIgG1およびIgG3サブクラスは高いCDC活性を有しており、サブクラス間のCDC活性の強さは、一般的にIgG3 > IgG1 >> IgG2 > IgG4の序列であることが知られている。また、抗体のCDC活性は、抗体が結合する抗原に依存して発揮される場合と発揮されない場合がある(非特許文献11)。そのため、全ての抗体が必ずしもCDC活性を発揮することができるわけではない。

【0006】

これまでに確立されている抗CD4mAbのうち、CDC活性を有する抗体はほとんど知られていない。唯一、補体価が高いウサギ血清を用いた場合にのみ、OKT4はCD4陽性のヒト細胞株に対してCDC活性を示すことは知られているが(非特許文献8)、ヒト補体を用いた場合に、CD4陽性のヒト細胞株に対するCDC活性を示した抗体の例は報告されていない。

既存のいくつかの抗CD4mAbに関して、抗体の解離定数 K_D が報告されている。例えば、下表に示す抗体では、解離定数 K_D が7~0.01 nM程度であることが報告されている(表1)。但し、解離定数の算出に当たっては、測定機器、測定方法、解析方法により測定値が変動する可能性があるため、解離定数を比較する場合は、同条件で測定・解析された数値であることが必要である。

【0007】

【表1】

クローン名	解離定数 [M]
6G5*	7.1×10^{-9}
CE9.1*	3.2×10^{-11}
Leu-3a**	1.0×10^{-11}
13B8.2***	5.0×10^{-9}

*WO 97/13852、**非特許文献9、***非特許文献10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Leucocyte Typing VI, 49 (1997)

【非特許文献2】Cell, 42, 93 (1985)

【非特許文献3】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4061 (1979)

【非特許文献4】Blood, 109, 4655 (2007)

【非特許文献5】Lancet, 352, 1109 (1998)

【非特許文献6】Clin Immunol Immunopathol, 84, 73 (1997)

【非特許文献7】Cancer Res, 67, 9945 (2007)

【非特許文献8】J Immunol, 164, 1925 (2000)

【非特許文献9】J Immunol, 145, 2839 (1990)

【非特許文献10】Clinical Immunology, 119, 38 (2006)

【非特許文献11】J. Immunol., 174, 5706 (2005)

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、高いアフィニティーでCD4細胞外領域に結合し、かつ高いADCC活性、またはCDC活性を有するモノクローナル抗体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法抗体または該抗体断片を用いる治療薬または診断薬を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、以下の(1)～(35)に関する。

(1) 抗体の抗原に対する解離定数(以下、 K_D と記す)が $1 \times 10^{-9}M$ 以下であり、高いアフィニティーでヒトCD4の細胞外領域に結合し、かつ高い抗体依存性細胞傷害活性(Antibody-dependent cellular cytotoxicity、以下ADCC活性と記す)を有するヒトCD4に対するモノクローナル抗体および該抗体断片。

(2) 抗体が、高い補体依存性細胞傷害活性(complement dependent cellular cytotoxicity、CDC活性)を有する抗体である(1)記載のモノクローナル抗体および該抗体断片。

(3) 抗体が、ヒトCD4を発現しているヒト癌細胞細胞株に対してCDC活性を有する抗体である(2)記載のモノクローナル抗体および該抗体断片。

(4) モノクローナル抗体が、抗体の重鎖(以下、H鎖と記す)の相補性決定領域(complementarity determining region、以下CDRと記す)1～3が配列番号51～53で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の軽鎖(以下、L鎖と記す)のCDR1～3が配列番号54～56で表されるアミノ酸配列である抗体と競合して、CD4の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体である、(1)～(3)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(5) モノクローナル抗体が、抗体のH鎖のCDR1～3が配列番号51～53で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のL鎖のCDR1～3が配列番号54～56で表されるアミノ酸配列である抗体が結合するCD4の細胞外領域に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体である、(1)～(4)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(6) モノクローナル抗体が、抗体のH鎖のCDR1～3が配列番号27～29で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のL鎖のCDR1～3が配列番号30～32で表されるアミノ酸配列である抗体と競合して、CD4の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体である、(1)～(2)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(7) モノクローナル抗体が、抗体のH鎖のCDR1～3が配列番号27～29で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のL鎖のCDR1～3が配列番号30～32で表されるアミノ酸配列である抗体が結合するCD4の細胞外領域に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体である、(1)～(2)および(6)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(8) モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、(1)～(7)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片。

(9) 遺伝子組換え抗体が、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体から選ばれる遺伝子組換え抗体である、(8)に記載の抗体または該抗体断片。

(10) 抗体のH鎖可変領域(以下、VHと記す)および抗体のL鎖可変領域(以下、VLと記す)が、配列番号16および配列番号26、ならびに配列番号12および配列番号22から選ばれるいずれか1組のアミノ酸配列である(9)記載の遺伝子組換え抗体および該抗体断片。

(11) 抗体のH鎖のCDR1～3およびL鎖のCDR1～3が、配列番号51～53および配列番号54～56ならびに配列番号27～29および配列番号30～32から選ばれるいずれか1組のアミノ酸配列である(9)記載の遺伝子組換え抗体および該抗体断片。

(12) 抗体のVHおよびVLが、配列番号77および配列番号78、配列番号96および配列番号78、配列番号98および配列番号78、配列番号100および配列番号78、ならびに配列番号100お

10

20

30

40

50

よび配列番号102から選ばれるいずれか1組のアミノ酸配列である(9)記載のヒト化抗体。

(13) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(Diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である(1)~(12)のいずれか1項に記載の抗体断片。

(14) (1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片をコードするDNA。

(15) (14)に記載のDNAを含有する組換え体ベクター。

(16) (15)に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

(17) (16)に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に(1)~(14)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする(1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の製造方法。

10

(18) (1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるヒトCD4の免疫学的検出または測定方法。

(19) (1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるヒトCD4の検出または測定用試薬。

(20) (1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いるヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の診断薬。

(21) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、(20)に記載の診断薬。

(22) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、(20)に記載の診断薬。

20

(23) (1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を有効成分として含有するヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の治療薬。

(24) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、(23)に記載の治療薬。

(25) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、(23)に記載の治療薬。

(26) (1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いてヒトCD4陽性細胞を検出または測定することを含む、ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の診断方法。

(27) (1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片を用いてヒトCD4を検出または測定することを含む、ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の診断方法。

30

(28) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、(26)または(27)に記載の診断方法。

(29) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、(26)または(27)に記載の診断方法。

(30) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の診断薬を製造するための、(1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(31) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、(30)に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(32) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、(30)に記載の抗体または該抗体断片の使用。

40

(33) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患の治療薬を製造するための、(1)~(13)のいずれか1項に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(34) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患が癌である、(33)に記載の抗体または該抗体断片の使用。

(35) ヒトCD4陽性細胞が関与する疾患がアレルギー性疾患または自己免疫疾患である、(33)に記載の抗体または該抗体断片の使用。

【発明の効果】

【0011】

本発明により、ヒトCD4の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に高いアフィニティーで結合し、かつ高いADCC活性、または高いCDC活性を有するモノクローナル抗

50

体または該抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーム、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドームまたは該形質転換体を用いる抗体または該抗体断片の製造方法、抗体または該抗体断片を用いる治療薬および診断薬を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】CD4発現ベクターの造成工程を示す。

【図2】CD4-Fc発現ベクターの造成工程を示す。

【図3】FCM解析での、ヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALLに対する抗CD4ラットモノクローナル抗体および抗CD4マウス抗体OKT4の反応性を示す。グラフは抗体のサブクラスごとに

10

(A)～(D)に分けてあり、横軸に各抗体の濃度を、縦軸に平均蛍光強度MFI値を示す。
(A) は抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065、×は抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4069を示す。
(B) ×は抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4068を示す。
(C) は抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4066、 は抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4067を示す。
(D) は抗CD4マウスモノクローナル抗体OKT4を表す。

【図4】抗CD4ラットモノクローナル抗体および抗CD4マウスモノクローナル抗体OKT4のCD4発現トランスフェクタントに対する補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)を示す。図の縦軸は細胞傷害活性率(%)を、横軸は抗CD4モノクローナル抗体の抗体濃度を示す。 は抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4066を、 は抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4067を、 は抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4068を、 は抗CD4マウスモノクローナル抗体OKT4をそれぞれ表す。

20

【図5】抗CD4ラットモノクローナル抗体のクローニングの工程を示す。

【図6】抗CD4キメラ抗体発現ベクターの造成工程を示す。

【図7】抗CD4ヒト抗体6G5-1抗体および6G5-113F抗体の発現ベクター造成工程を示す。

【図8】バインディングELISAにおける各種抗CD4抗体の反応性を示す。横軸に各抗体の濃度を、縦軸に各抗体の結合活性を示す。リコンビナントヒトCD4に対する各抗体の反応性を示す。破線に はモノクローナル抗体6G5-1、実線に は抗CD4ヒト抗体6G5-P、 は抗CD4ヒト抗体6G5-113F、 は抗CD4キメラ抗体KM4045、 は抗CD4キメラ抗体KM4046、 は抗CD4キメラ抗体KM4047、破線に×は抗CD4キメラ抗体KM4048、実線に×は抗CD4キメラ抗体KM4049をそれぞれ表す。

30

【図9】各種抗CD4抗体の、各種ヒトT細胞株に対する抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)を示す。図の縦軸は細胞傷害活性率(%)を、横軸は各抗体の抗体濃度を表す。破線に はモノクローナル抗体6G5-1、実線に はモノクローナル抗体6G5-P、 はキメラ抗体6G5-113F、 はキメラ抗体KM4045、 はキメラ抗体KM4046、 はキメラ抗体KM4047、破線に×はキメラ抗体KM4048、実線に×はキメラ抗体KM4049をそれぞれ表す。(A)標的細胞にHPB-ALLを用いた際のADCC活性を示す。(B)標的細胞にHUT78を用いた際のADCC活性を示す。(C)標的細胞にSUP-T1を用いた際のADCC活性を示す。(D)標的細胞にHPB-ALLを用いた際のADCC活性を示す。

【図10】各種抗CD4抗体のCD4発現トランスフェクタントまたはヒトリンパ腫細胞株に対する補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)を示す。図の縦軸は細胞傷害活性率(%)を、横軸は各抗体の抗体濃度を示す。(A)CD4発現トランスフェクタントに対するCDC活性を示す。(B)ヒトリンパ腫細胞株HPB-ALLに対するCDC活性を示す。破線に は抗CD4ヒト抗体6G5-1、実線に は抗CD4ヒト抗体6G5-113F、 は抗CD4キメラ抗体KM4045、 は抗CD4キメラ抗体KM4046、 は抗CD4キメラ抗体KM4047、 は抗CD4キメラ抗体KM4048、 は抗CD4キメラ抗体KM4049、破線に は抗CD4マウス抗体OKT4をそれぞれ表す。

40

【図11】各種抗CD4抗体の、フローサイトメーターを用いたCD4陽性T細胞リンパ腫細胞株HPB-ALLへの反応性を示す。図の横軸は抗体濃度(μg/mL)を、縦軸は平均蛍光強度MFI値を示す。 はキメラ抗体KM4045、 はヒト化抗体HV0LV0、 はヒト化抗体HV2LV0、 はヒト化抗体HV3LV0、 はヒト化抗体HV4LV0、×はヒト化抗体HV4LV6、破線に はヒト抗体6G5-1、実線に はヒト抗体6G5-Pを表す。

50

【図12】各種抗CD4抗体の、各種ヒトT細胞リンパ腫株に対する抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）を示す。図の縦軸は細胞傷害活性率（%）を、横軸は抗体濃度（ng/mL）を表す。○はキメラ抗体KM4045、△はヒト化抗体KM8045、破線に□はヒト抗体6G5-1、実線に◇はヒト抗体6G5-Pを表す。（A）標的細胞にHPB-ALLを用いた際のADCC活性を示す。（B）標的細胞にHUT78を用いた際のADCC活性を示す。（C）標的細胞にCCRF-CEMを用いた際のADCC活性を示す。

【図13】SCIDマウスに移植したヒトT細胞リンパ腫細胞株HHに対する各抗体の抗腫瘍効果（初期癌モデル）を示す。横軸は腫瘍移植後の日数、縦軸は腫瘍体積をそれぞれ表す。×は陰性対照群、○はKM8045投与群、△は6G5-P投与群をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

【図14】C57BL/6マウスに移植したCD4/EL4細胞に対する各抗体の抗腫瘍効果（転移モデル）を示す。（A）縦軸は肝臓重量比率、（B）縦軸は腎臓重量比率を表す。バーは標準偏差を示す。

【図15】SCIDマウスに移植したHH細胞株に対する各抗体の抗腫瘍効果（進行癌モデル）を示す。横軸は腫瘍移植後の日数、縦軸は腫瘍体積をそれぞれ表す。×は陰性対照群、○はKM8045 20 μg/head投与群、△はKM8045 100 μg/head投与群、◇はKM8045 200 μg/head投与群をそれぞれ示す。バーは標準偏差を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、高いアフィニティーでCD4細胞外領域に結合し、これに伴い、高い抗体依存性細胞傷害活性（Antibody-dependent cellular cytotoxicity、以下ADCC活性と記す）を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片に関する。

本発明におけるCD4としては、配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換あるいは付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD4の機能を有するポリペプチド、ならびに配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、最も好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつCD4の機能を有するポリペプチドなどがあげられる。

【0014】

配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)]などを用いて、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個～数十個、例えば、1～20個、より好ましくは1個～数个、例えば、1～5個のアミノ酸である。

【0015】

CD4をコードする遺伝子としては、配列番号2またはEMBLアクセッション番号M12807で示される塩基配列があげられる。配列番号2またはEMBLアクセッション番号M12807で示される塩基配列において、1以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列からなり、かつCD4の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、配列番号2またはEMBLアクセッション番号M12807で示される塩基配列と少なくとも60%以上の同一性を有する塩基配列、好ましくは80%以上の同一性を有する塩基配列、さらに好ましくは95%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつCD4の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを

10

20

30

40

50

含む遺伝子、ならびに配列番号2またはEMBLアクセッション番号M12807で示される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAからなり、かつCD4の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子なども本発明のCD4をコードする遺伝子に包含される。

【0016】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、配列番号2またはEMBLアクセッション番号M12807で示される塩基配列を有するDNAをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、またはDNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAを意味し、具体的には、ハイブリダイズしたコロニーあるいはブランク由来のDNA、または該配列を有するPCR産物あるいはオリゴDNAを固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、0.7~1.0mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65 でハイブリダイゼーション[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)]を行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65 条件下でフィルターまたはスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号2またはEMBLアクセッション番号M12807で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

10

20

【0017】

真核生物の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明のCD4をコードする遺伝子に包含される。

本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST[J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、BLAST2[Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>]においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などがあげられる。

30

【0018】

デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap) が塩基配列の場合は5、アミノ酸配列の場合は11、-E (Cost to extend gap) が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、-q (Penalty for nucleotide mismatch) が-3、-r (reward for nucleotide match) が1、-e (expect value) が10、-W (wordsize) が塩基配列の場合は11残基、アミノ酸配列の場合は3残基、-y[Dropoff (X) for blast extensions in bits]がblastnの場合は20、blastn以外のプログラムでは7、-X (X dropoff value for gapped alignment in bits) が15および-Z (final X dropoff value for gapped alignment in bits) がblastn の場合は50、blastn以外のプログラムでは25である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

40

【0019】

配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製することができ、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製することができる。また、上記の方法で作製されるポリペプチドまたはDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることが

50

できる。さらに、配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチド、または配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換あるいは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)法、t-ブチルオキシカルボニル(tBoc)法などの化学合成法によって製造することもできる。

【0020】

本発明におけるCD4の細胞外領域としては、例えば配列番号1で示される該ポリペプチドのアミノ酸配列を公知の膜貫通領域予測プログラムSOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/SOSUI/SOSUI_submit)、TMHMM ver.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)またはExPASy Proteomics Server (<http://Ca.expasy.org/>)などを用いて予測された領域などがあげられる。具体的には、SOSUIにおいて予測される細胞外ドメインであるN末より394番目までがあげられる。細胞外ドメインは、D1~D4のイムノグロブリンスーパーファミリドメインを有しており、いずれのドメインも含まれる。

【0021】

本発明におけるCD4の細胞外領域としては、配列番号1またはEMBLアクセッション番号M12807で示されるアミノ酸配列を有するCD4の細胞外領域が天然状態でとりうる構造と同等の構造を有していればいずれの構造でもよい。CD4の細胞外領域が天然状態でとりうる構造とは、細胞膜上に発現しているCD4の天然型の立体構造のことをいう。

本発明においてCD4の機能としては、抗原提示細胞上に発現しているMHCクラスIIと抗原とが結合した複合体と、T細胞上に発現しているT細胞受容体を介して結合する際に、T細胞受容体の共因子として作用することにより、T細胞の活性化または分化を引き起こすことをいう。また、CD4の機能としては、T細胞の細胞膜上に発現するCD4が、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のエンベロープタンパク質の1つであるgp120と結合することで、HIVがT細胞へ感染する過程に関与することもあげられる。

【0022】

本発明の抗体またはその抗体断片が、CD4細胞外領域に結合することは、固相サンドイッチ法などを用いたラジオイムノアッセイ、または酵素免疫測定法(ELISA)などを用いたCD4を発現した細胞に対する公知の免疫学的検出法、好ましくは蛍光細胞染色法などの特定の抗原を発現した細胞と特定抗原に対する抗体の結合性を調べることができる方法により確認することができる。例えば、FMAT8100HTSシステム(アプライドバイオシステム社製)などを用いる蛍光抗体染色法[Cancer Immunol.Immunother., 36, 373 (1993)]、フローサイトメトリーを用いる蛍光細胞染色法、またはBiacoreシステム(ジージーヘルスケア社製)などを用いた表面プラズモン共鳴などの方法があげられる。また、公知の免疫学的検出法[Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック (1987)]などを組み合わせて確認することもできる。

【0023】

CD4を発現した細胞としては、該CD4を発現していればいずれの細胞でもよく、例えばヒト体内に天然に存在する細胞、ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株、または遺伝子組換え技術により得られた細胞などがあげられる。

ヒト体内に天然に存在する細胞としては、自己免疫疾患患者、アレルギー患者および癌患者体内において該ポリペプチドが発現している細胞があげられ、例えば、バイオプシーなどで得られた腫瘍細胞のうちで該CD4が発現している細胞などがあげられる。

【0024】

ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株としては、上記の癌患者から得られた該CD4が発現している細胞を株化して得られた細胞株のうち、該CD4を発現している細胞株があげられ、例えば、ヒトから樹立された細胞株であるヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALL[DSMZ番号:ACC483]またはHUT78(ATCC番号:TIB162)などがあげられる。

遺伝子組換え技術により得られた細胞としては、具体的には、該CD4をコードするcDNAを含む発現ベクターを昆虫細胞または動物細胞などに導入することにより得られる、該CD4を発現した細胞などがあげられる。

【0025】

本発明の抗体としては、抗体のCD4に対する解離定数（以下、 K_D と記す）が $1 \times 10^{-9}M$ 以下であり、高いアフィニティーでヒトCD4の細胞外領域に結合し、かつ高いADCC活性を有するヒトCD4に対するモノクローナル抗体および該抗体断片があげられる。

また、本発明の抗体としては、抗体の抗原に対する解離定数 K_D が $1 \times 10^{-9}M$ 以下であり、高いアフィニティーでヒトCD4の細胞外領域に結合し、高いADCC活性を有し、かつ高い補体依存性細胞傷害活性（complement-dependent cellular cytotoxicity、CDC活性）を有するモノクローナル抗体および該抗体断片があげられる。本発明の抗体としては、ヒトCD4を発現しているヒト癌細胞細胞株に対してCDC活性を有するモノクローナル抗体および該抗体断片も含まれる。

【0026】

本発明においてモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

モノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（1次構造）が均一である。

【0027】

本発明において、モノクローナル抗体は、2本のH鎖および2本のL鎖からなるヘテロテトラマーからなる構造を有し、H鎖はH鎖可変領域（以下、VHと記す）およびH鎖定常領域（以下、CHと記す）、L鎖はL鎖可変領域（以下、VLと記す）およびL鎖定常領域（CL）からなる。更に、CHは、CH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの4ドメインからなる。また、CH2ドメインおよびCH3ドメインを合わせて、抗体のFc領域、Fcドメインまたは単にFcと定義される。

【0028】

エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などがあげられる。本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープとして、好ましくはCD4の細胞外領域、配列番号1で示されるアミノ酸配列の1~394番目のアミノ酸配列からなるエピトープ、より好ましくはCD4の細胞外領域のD1またはD2ドメインからなるエピトープ、またはCD4の細胞外領域の細胞膜に近いD3またはD4ドメインからなるエピトープなどをあげることができる。

【0029】

本発明において、CD4に高いアフィニティーで結合する抗体とは、治療用抗体として十分なアフィニティーを有する抗体であり、好ましくは解離定数 K_D が $1 \times 10^{-9}M$ 以下、より好ましくは $7 \times 10^{-10}M$ 以下、さらに好ましくは $2 \times 10^{-10}M$ 以下のアフィニティーでCD4に結合することをいう。既に臨床試験が実施されているZanolimumab（6G5）は、解離定数 K_D が $7.1 \times 10^{-9}M$ のアフィニティーであり、高い治療効果を示していることから、本発明の抗体は、更に高い治療効果を示すことができる。

【0030】

アフィニティーとは、反応速度論的な解析により測定されるものであり、例えばBiacore T100（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）などを用いて測定することができる。

本発明において、解離が遅いとは、Biacore T100において算出される抗体の解離速度定数kdの値が、より小さな値を示すことである。解離速度定数が小さいことは、抗体が抗原を発現する細胞から解離しにくいことを示しており、細胞表面上に結合する抗体量を増加させることで抗体の薬効を延長させ、結果的に高い薬効を期待することができる。解離速度定数kdは、例えばBiacore T100（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を用いて測定さ

10

20

30

40

50

れ、付属ソフトウェアBiacore T100 evaluation software (Biacore社製)により算出することができる。

【0031】

本発明において、高いADCC活性を有する抗体とは、CD4発現細胞に対して、同時に複数の抗体のADCC活性を、公知の測定方法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]を用いて測定した場合、ADCC活性を有する事が報告されている抗CD4抗体6G5およびCE9.1と比べて、より高いADCC活性を有する抗体をいう。

ADCC活性とは、標的細胞上の抗原に結合した抗体が、抗体のFc領域を介して免疫細胞のFc受容体と結合することで免疫細胞(ナチュラルキラー細胞など)を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。

10

【0032】

Fc受容体(以下、FcRと記すこともある)とは、抗体のFc領域に結合する受容体であり、抗体の結合によりさまざまなエフェクター活性を誘導する。FcRは抗体のサブクラスに対応しており、IgG、IgE、IgA、IgMはそれぞれFc R、Fc R、Fc R、Fc μ Rに特異的に結合する。更にFc Rには、Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32)およびFc RIII (CD16)のサブタイプが存在し、それぞれFc RIA、Fc RIB、Fc RIC、Fc RIIA、Fc RIIB、Fc RII C、Fc RIIIA、Fc RIIIBのアイソフォームが存在する。これらの異なるFc Rは異なる細胞上に存在している(Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991))。ヒトにおいては、Fc RII IBは好中球に特異的に発現しており、Fc RIIIAは、単球、Natural Killer細胞(NK細胞)および一部のT細胞に発現している。Fc RIIIAを介した抗体の結合は、NK細胞依存的なADCC活性を誘導する。

20

【0033】

本発明において、高いCDC活性を有する抗体とは、CD4発現細胞に対して、同時に複数の抗体のCDC活性を、ヒト補体を用いて公知のCDC測定方法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]を用いて測定した場合、既存の抗CD4抗体と比べて、より高いCDC活性を有する抗体である。更に好ましくは、ヒト体内に天然に存在するCD4発現細胞あるいはCD4陽性癌細胞株に対して、上述と同様にして抗体のCDC活性を測定した場合、既存の抗CD4抗体と比べて、高いCDC活性を有する抗体である。より具体的には、既存の抗CD4抗体6G5やKT4に比べ、同一の実験系においてより強いCDC活性を示すことである。

【0034】

CDC活性とは標的細胞上の抗原に結合した抗体が血液中の補体関連タンパク質群からなる一連のカスケード(補体活性化経路)を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。また、補体の活性化により生じるタンパク質断片により免疫細胞の遊走、活性化を誘導することができる。

30

本発明の抗体は、ヒトCD4の細胞外領域のD1またはD2、またはヒトCD4の細胞外領域の細胞膜に近いD3またはD4ドメインのいずれかに結合するモノクローナル抗体および該抗体断片があげられる。

【0035】

本発明の抗体のうち、D1またはD2ドメインを認識する抗体としては、抗体の重鎖可変領域(以下、VHと記す)のCDR1~3が配列番号33~35で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の軽鎖可変領域(以下、VLと記す)のCDR1~3が配列番号36~38で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体、また本発明の具体的な抗体のうち、D3またはD4ドメインを認識する抗体としては、抗体のVHのCDR1~3が配列番号51~53で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLのCDR1~3が配列番号54~56で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体、抗体のVHのCDR1~3が配列番号27~29で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVL鎖のCDR1~3が配列番号30~32で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体、抗体のVHのCDR1~3が配列番号39~41で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVL鎖のCDR1~3が配列番号42~44で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体および抗体のVHのCDR1~3が配列番号45~47で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVL鎖のCDR1~3が配列番号48~50で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体があげられる

40

50

【0036】

また、本発明のモノクローナル抗体として具体的には、抗体のVHが配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号26で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体、抗体のVHが配列番号12で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号22で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体、抗体のVHが配列番号13で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号23で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体、抗体のVHが配列番号14で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号24で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体および抗体のVHが配列番号15で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号25で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体があげられる。

10

【0037】

更に、本発明のモノクローナル抗体としては、上述のモノクローナル抗体と競合して、CD4の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体および上述のモノクローナル抗体が結合するCD4の細胞外領域上に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するモノクローナル抗体をあげることができる。

さらに、本発明には、CD4に結合しアポトーシス誘導活性を有するモノクローナル抗体およびその抗体断片が包含される。

【0038】

ハイブリドーマは、例えば上記のCD4を発現した細胞などを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体生産細胞を誘導し、さらに、該抗体生産細胞と骨髄腫細胞とを融合させることにより、調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより抗CD4モノクローナル抗体を取得することができる。

20

【0039】

抗原を免疫する動物としてはハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、ニワトリまたはラビットなどが用いられる。また、このような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞に *in vitro* で免疫を施した後に、骨髄腫細胞と融合して作製したハイブリドーマが生産する抗体なども本発明の抗体に包含される。

30

【0040】

本発明において遺伝子組換え抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体〔ヒト型相補性決定領域 (complementarity determining region; CDRと記す) 移植抗体ともいう〕、ヒト抗体または該抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。遺伝子組換え抗体は、例えば上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものがあげられる。

【0041】

本発明の遺伝子組換え抗体のCHとしては、ヒト由来のものが望ましく、CH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。

40

また本発明の遺伝子組換え抗体のFc領域としては、Fc Rに対する結合活性を有していれば、1アミノ酸残基以上のアミノ酸残基改変を含んでいてもよい。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域VHおよび軽鎖可変領域VLとヒト抗体のCHおよびCLとからなる抗体をいう。本発明のヒト型キメラ抗体は、CD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0042】

50

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、好ましくはhIgGクラスのものを用いられ、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、クラスあるいは クラスのものを用いることができる。

【0043】

本発明のヒト型キメラ抗体として具体的には、抗体のVHが配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号26で表されるアミノ酸配列であるキメラ抗体、抗体のVHが配列番号12で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号22で表されるアミノ酸配列であるキメラ抗体、抗体のVHが配列番号13で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号23で表されるアミノ酸配列であるキメラ抗体、抗体のVHが配列番号14で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号24で表されるアミノ酸配列であるキメラ抗体および抗体のVHが配列番号15で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLが配列番号25で表されるアミノ酸配列であるキメラ抗体があげられる。

10

【0044】

更に、本発明のキメラ抗体としては、上述のキメラ抗体と競合して、CD4の細胞外領域に結合するキメラ抗体および上述のキメラ抗体が結合するCD4の細胞外領域上に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するキメラ抗体をあげることができる。

ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいう。本発明のヒト化抗体は、CD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するヒト以外の動物のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから産生されるヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

20

【0045】

ヒト化抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、好ましくはhIgGクラスのものを用いられ、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、またはhIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト化抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、 クラスあるいは クラスのものを用いることができる。

30

【0046】

本発明のヒト化抗体としては、抗体のVHのCDR1～3が配列番号51～53で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のVLのCDR1～3が配列番号54～56で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体、抗体のVHのCDR1～3が配列番号27～29で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のL鎖のCDR1～3が配列番号30～32で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体、抗体のVHのCDR1～3が配列番号33～35で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のL鎖のCDR1～3が配列番号36～38で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体、抗体のVHのCDR1～3が配列番号39～41で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のL鎖のCDR1～3が配列番号42～44で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体および抗体のVHのCDR1～3が配列番号45～47で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のL鎖のCDR1～3が配列番号48～50で表されるアミノ酸配列であるヒト化抗体があげられる。

40

【0047】

更に、本発明のヒト化抗体としては、具体的には以下に示すヒト化抗体があげられる。

抗体のVHのアミノ酸配列については、抗体のVHが配列番号77で表されるアミノ酸配列中の18番目のLeu、93番目のVal、97番目のAlaおよび114番目のThrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

好ましくは抗体のVHが配列番号77で表されるアミノ酸配列中の93番目のVal、97番目のAlaおよび114番目のThrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗

50

体。

【 0 0 4 8 】

好ましくは抗体のVHが配列番号77で表されるアミノ酸配列中の18番目のLeu、97番目のAlaおよび114番目のThrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体。

好ましくは97番目のAlaおよび114番目のThrが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を有するヒト化抗体などがあげられる。

【 0 0 4 9 】

上記のアミノ酸改変の結果得られる抗体VHのアミノ酸配列としては、配列番号77で表されるアミノ酸配列中の18番目のLeuをMetに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および114番目のThrをIleに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列があげられる。

4個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号77で表されるアミノ酸配列中の18番目のLeuをMetに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および114番目のThrをIleに置換したアミノ酸配列があげられる。

【 0 0 5 0 】

3個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号77で表されるアミノ酸配列中の

93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および114番目のThrをIleに置換したアミノ酸配列、

18番目のLeuをMetに、97番目のAlaをThrに、および114番目のThrをIleに置換したアミノ酸配列、

18番目のLeuをMetに、93番目のValをThrに、および114番目のThrをIleに置換したアミノ酸配列、ならびに

18番目のLeuをMetに、93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

などがあげられる。

【 0 0 5 1 】

2個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号77で表されるアミノ酸配列中の

18番目のLeuをMetに、および93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、

18番目のLeuをMetに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、

18番目のLeuをMetに、および114番目のThrをIleに置換したアミノ酸配列、

93番目のValをThrに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、

93番目のValをThrに、および114番目のThrをIleに置換したアミノ酸配列、ならびに

97番目のAlaをThrに、および114番目のThrをIleに置換したアミノ酸配列

などがあげられる。

【 0 0 5 2 】

1個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号77で表されるアミノ酸配列中の

18番目のLeuをMetに置換したアミノ酸配列、93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、および114番目のThrをIleに置換したアミノ酸配列、

があげられる。

【 0 0 5 3 】

抗体のVLについては、例えば配列番号78で表されるアミノ酸配列中の13番目のAla、15番目のVal、19番目のVal、47番目のAla、62番目のVal、および82番目のLeuが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列があげられる。

好ましくは、配列番号78で表されるアミノ酸配列中の13番目のAla、19番目のVal、62番目のVal、および82番目のLeuが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列があげられる。

【 0 0 5 4 】

上記のアミノ酸改変の結果得られるVLのアミノ酸配列としては、配列番号78で表されるアミノ酸配列中の13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列があげられる。

6個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号78で表されるアミノ酸配列中の13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列などがあげられる。

【 0 0 5 5 】

5個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号78で表されるアミノ酸配列中の

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、47番目のAlaをGlnに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、ならびに

15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

などがあげられる。

【 0 0 5 6 】

4個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号78で表されるアミノ酸配列中の

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、および47番目のAlaをGlnに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、47番目のAlaをGlnに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、47番目のAlaをGlnに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列

13番目のAlaをValに、19番目のValをAlaに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

10

20

30

40

50

15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、ならびに

19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

などがあげられる。

【0057】

3個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号78で表されるアミノ酸配列中の

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、および19番目のValをAlaに置換したアミノ酸配列、

10

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、および47番目のAlaをGlnに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、19番目のValをAlaに、および47番目のAlaをGlnに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、19番目のValをAlaに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

20

13番目のAlaをValに、19番目のValをAlaに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、47番目のAlaをGlnに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、47番目のAlaをGlnに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、および47番目のAlaをGlnに置換したアミノ酸配列、

15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

30

15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

15番目のValをLeuに、47番目のAlaをGlnに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

15番目のValをLeuに、47番目のAlaをGlnに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、ならびに

40

47番目のAlaをGlnに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、

などがあげられる。

【0058】

2個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号78で表されるアミノ酸配列中の

13番目のAlaをValに、および15番目のValをLeuに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、および19番目のValをAlaに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、および47番目のAlaをGlnに置換したアミノ酸配列、

13番目のAlaをValに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、

50

13番目のAlaをValに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、
 15番目のValをLeuに、および19番目のValをAlaに置換したアミノ酸配列、
 15番目のValをLeuに、および47番目のAlaをGlnに置換したアミノ酸配列、
 15番目のValをLeuに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、
 15番目のValをLeuに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、
 19番目のValをAlaに、および47番目のAlaをGlnに置換したアミノ酸配列、
 19番目のValをAlaに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、
 19番目のValをAlaに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、
 47番目のAlaをGlnに、および62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、
 47番目のAlaをGlnに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、ならびに
 62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸配列、
 などがあげられる。

【0059】

1個の改変が導入されたVLのアミノ酸配列としては、具体的には、配列番号78で表されるアミノ酸配列中の

13番目のAlaをValに置換したアミノ酸配列、15番目のValをLeuに置換したアミノ酸配列、
 19番目のValをAlaに置換したアミノ酸配列、47番目のAlaをGlnに置換したアミノ酸配列、
 62番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、および82番目のLeuをValに置換したアミノ酸
 配列、などがあげられる。

【0060】

また、本発明のヒト抗体の具体例としては、VHが配列番号77、96、98および100から選
 ばれるアミノ酸配列であり、および/またはVLが配列番号78および102から選ばれるアミノ
 酸配列であるヒト化抗体があげられる。

更に、本発明のヒト化抗体の具体例としてより具体的には、可変領域のH鎖が配列番号7
 7および/または可変領域のL鎖が配列番号78で表されるアミノ酸配列を有するヒト化抗体
 、VHが配列番号96および/またはVLが配列番号78で表されるアミノ酸配列を有するヒト化
 抗体、VHが配列番号98および/またはVLが配列番号78で表されるアミノ酸配列を有するヒ
 ト化抗体、VHが配列番号100および/またはVLが配列番号78で表されるアミノ酸配列を有す
 るヒト化抗体、ならびにVHが配列番号100および/またはVLが配列番号102で表されるアミ
 ノ酸配列を有するヒト化抗体などがあげられる。

【0061】

更に、本発明のヒト化抗体としては、上述のヒト化抗体と競合して、CD4の細胞外領域
 に結合するヒト化抗体および上述のヒト化抗体が結合するCD4の細胞外領域上に存在する
 エピトープと、同じエピトープに結合するヒト化抗体をあげることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細
 胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよ
 びヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

【0062】

ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルス
 などを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培
 養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝
 子に挿入することによりFab、scFvなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラ
 リーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として
 所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することがで
 きる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により2本の完全なH鎖および2本の完全
 なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

【0063】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を
 意味する。具体的には、例えば、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞をマ

10

20

30

40

50

ウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体は、通常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法を用い、ヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることにより作製できる。

【0064】

上述の抗体または抗体断片を構成するアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述の抗体またはその抗体断片と同様な活性を有するモノクローナル抗体またはその抗体断片も、本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片に包含される。

10

欠失、置換、挿入および/または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、部位特異的変異導入法[Molecular Cloning 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)]などの周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数である。例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

【0065】

上記の抗体のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、次のことを示す。即ち、同一配列中の任意、かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、またはL-システインなどがあげられる。

20

【0066】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

30

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

40

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本発明において、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどがあげられる。

【0067】

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素であるパパインで処理して得られる断片のうち(H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFabは、CD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体をパパインで処理して得ることができる。また、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるい

50

は真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することもできる。

【0068】

F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を蛋白質分解酵素であるペプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有する断片である。本発明のF(ab')₂は、CD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体をペプシンで処理して得ることができる。また、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することもできる。

【0069】

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFab'は、本発明のCD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するF(ab')₂をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することもできる。

【0070】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のscFvは、本発明のCD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0071】

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。本発明のdiabodyは、本発明のCD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAをペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0072】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は既知の方法[Protein Engineering, 7, 697 (1994)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のdsFvは、本発明のCD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0073】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明のCDRを含むペプチドは、本発明のCD4を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法、またはtBoc法などの化学合成法によって製造することもできる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

本発明のモノクローナル抗体には、本発明のCD4の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質、または抗体医薬などを化学的あるいは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明における、抗体の誘導体は、本発明のCD4の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片のH鎖あるいはL鎖のN末端側あるいはC末端側、抗体またはその抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらにはモノクローナル抗体またはその抗体断片中の糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、免疫賦活剤、蛋白質または抗体医薬などを化学的手法[抗体工学入門、地人書館(1994)]により結合させることにより製造することができる。

10

【 0 0 7 5 】

また、本発明のCD4の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体または抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質または抗体医薬をコードするDNAを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的手法より製造することができる。

放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 、または ^{211}At などがあげられる。放射性同位元素は、クロラミンT法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)などがあげられる。

20

【 0 0 7 6 】

低分子の薬剤としては、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマトラーゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤、あるいはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤[臨床腫瘍学、癌と化学療法社(1996)]、またはハイドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、あるいはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤[炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社(1982)]などがあげられる。抗癌剤としては、アミフォスチン(エチオール)、シスプラチン、ダカルバジン(DTIC)、ダクチノマイシン、メクロレタミン(ナイトロジェンマスタード)、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNU)、ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、エピルピシン、ゲムシタピン(ゲムザール)、ダウノルピシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラピン、エトポシド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、プレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル(タキソール)、ドセタキセル(タキソテア)、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、プスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリピン、カンプトテシン、10-ヒドロキシ-7-エチル-カンプトテシン(SN38)、フロクスウリジン、フルダラピン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルピシン、メスナ、イリノテカン(CPT-11)、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニボシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ピノレルピン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ピンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタピン、トムデックス、アザシチジン、UFT、オキサロプラチン、ゲフィチニブ(イレッサ)、イマチニブ(STI571)、エルロチニブ、FMS-like tyrosine kinase 3(Flt3)阻害剤、vascular endothelial growth factor receptor(VEGFR)阻害

30

40

50

剤、fibroblast growth factor receptor(FGFR)阻害剤、イレッサ、タルセバなどのepidermal growth factor receptor(EGFR)阻害剤、ラディシコール、17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール-トランスレチノイン酸、サリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D-ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリピン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン(ターグレチン)、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲステロン類、エストロゲン類、アナストロゾール(アリミデックス)、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリットマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコポリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、マイタンシノイド、またはその誘導体、などがあげられる。

10

【0077】

低分子の薬剤と抗体とを結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、または水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などがあげられる。

高分子の薬剤としては、ポリエチレングリコール(以下、PEGと表記する)、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどがあげられる。これらの高分子化合物を抗体または抗体断片に結合させることにより、(1)化学的、物理的あるいは生物的な種々の因子に対する安定性の向上、(2)血中半減期の顕著な延長、(3)免疫原性の消失または抗体産生の抑制、などの効果が期待される[バイオコンジュゲート医薬品, 廣川書店(1993)]。例えば、PEGと抗体を結合させる方法としては、PEG化修飾試薬と反応させる方法などがあげられる[バイオコンジュゲート医薬品, 廣川書店(1993)]。PEG化修飾試薬としては、リジンの -アミノ基への修飾剤(特開昭61-178926)、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤(特開昭56-23587)、またはアルギニンのグアニジノ基への修飾剤(特開平2-117920)などがあげられる。

20

【0078】

免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、(1)3)グルカン(レンチナン、シゾフィラン)、またはガラクトシルセラミドなどがあげられる。

30

蛋白質としては、NK細胞、マクロファージ、または好中球などの免疫担当細胞を活性化させるサイトカインあるいは増殖因子、または毒素蛋白質などがあげられる。

【0079】

サイトカインあるいは増殖因子としては、例えば、インターフェロン(以下、INFと記す)- α 、INF- β 、INF- γ 、インターロイキン(以下、ILと記す)-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、またはマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)などがあげられる。毒素蛋白質としては、リシン、ジフテリアトキシン、またはONTAKなどがあげられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

40

【0080】

抗体医薬としては、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原、病変部位の血管新生に関与する抗原に対する抗体があげられる。

抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、Cluster of differentiation(以下、CDと記載する)19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80(B7.1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86(B7.2)、human leukocyte antigen(HLA)-Class II、またはEpi

50

dermal Growth Factor Receptor (EGFR) などがあげられる。

【0081】

腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としてはCD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子(CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3、またはB7-H4)、B7ファミリー分子のリガンド(CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、またはBTLA)、OX-40、OX-40リガンド、CD137、tumor necrosis factor(TNF)受容体ファミリー分子(DR4、DR5、TNFR1、またはTNFR2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor(TRAIL)ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー(TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、またはTRAIL-R4)、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand(RANK)、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体4、サイトカイン[IL-1、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、transforming growth factor(TGF)、またはTNF など]、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン(SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、またはCTACKなど)、またはこれらのケモカインの受容体があげられる。

【0082】

病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、vascular endothelial growth factor(VEGF)、Angiopoietin、fibroblast growth factor(FGF)、EGF、platelet-derived growth factor(PDGF)、insulin-like growth factor(IGF)、erythropoietin(EPO)、TGF、IL-8、Ephrin、SDF-1、またはこれらの受容体などがあげられる。

蛋白質または抗体医薬との融合抗体は、モノクローナル抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

【0083】

上記抗体の誘導体を検出方法、定量方法、検出用試薬、定量用試薬または診断薬として使用する場合に、本発明のCD4の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片に結合する薬剤としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体があげられる。標識体としては、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ、あるいはルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル、あるいはロフィンなどの発光物質、またはフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、あるいはテトラメチルローダミンイソチオシアネート(RITC)などの蛍光物質などがあげられる。

【0084】

また、本発明は、CD4の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含有するCD4陽性細胞が関与する疾患の治療薬に関する。

CD4陽性細胞が関与する疾患としては、CD4が発現している細胞が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、感染症があげられる。

【0085】

CD4陽性細胞としては、CD4陽性T細胞であるTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞、制御性T細胞(regulatory T細胞ともいう)およびT細胞などがあげられる。また、癌や炎症性疾患である自己免疫疾患やアレルギー性疾患では、疾患の原因となる異常な細胞にCD4が発現していることから、これら疾患に関与するCD4陽性細胞をあげることができる。

癌としては、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌などがあげられ、好ましくは血液癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌または前立腺癌があげられる。血液癌としては、T細胞由来の癌、例えば皮膚T細胞性リンパ腫(Cutaneous T cell lymphoma,CTCL)、末梢T細胞性リンパ腫(peripheral T cell lymphoma,PTCL)、未分化大細胞型リンパ腫(Anaplastic large cell lymphoma,ALCL)、急性リンパ性白血病(Acute lymphatic leukemia,ALL)、その他リンパ性白血病、骨髄性白血病、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、または

10

20

30

40

50

非ホジキンリンパ腫などがあげられる。

【0086】

自己免疫疾患としては、関節リウマチ、乾癬、クローン病、強直性脊椎炎、多発性硬化症、I型糖尿病、肝炎、心筋炎、シェーグレン症候群、移植後拒絶反応などがあげられる。

アレルギー性疾患としては、急性または慢性気道過敏症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎などがあげられる。

【0087】

感染症としてはヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症などがあげられる。

本発明の治療剤としては、上述した本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を有効成分として含有する。

本発明の抗体または該抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0088】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内あるいは静脈内などの非経口投与があげられ、好ましくは静脈内投与をあげられる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、またはテープ剤などがあげられる。

【0089】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、および体重などにより異なるが、通常成人1日当たり10 μ g/kg~10mg/kgである。

さらに、本発明は、CD4の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含有する、CD4の免疫学的検出または測定方法、CD4の免疫学的検出用または測定用試薬、CD4が発現する細胞の免疫学的検出または測定方法、およびCD4陽性細胞が関与する疾患の診断薬に関する。

【0090】

本発明においてCD4の量を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法があげられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などがあげられる。

免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、酵素免疫測定法(EIAまたはELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、発光免疫測定法(luminescent immunoassay)、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などがあげられる。

【0091】

本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いてCD4が発現した細胞を検出または測定することにより、CD4が関連する疾患を診断することができる。

該ポリペプチドが発現している細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、免疫沈降法、蛍光細胞染色法、免疫組織染色法、または免疫組織染色法などが、好ましく用いられる。また、FMAT8100HTSシステム(アプライドバイオシステム社製)などの蛍光抗体染色法なども用いることができる。

【0092】

本発明においてCD4を検出または測定する対象となる生体試料としては、組織細胞、血液、血漿、血清、唾液、尿、糞便、組織液、または培養液など、CD4が発現した細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

本発明のモノクローナル抗体あるいはその抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩などがあげら

10

20

30

40

50

れる。検出用試薬としては、該モノクローナル抗体あるいはその抗体断片、またはこれらの誘導体を認識する標識された二次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬があげられる。

【0093】

以下に、本発明の抗体の製造方法、疾患の治療方法、および疾患の診断方法について、具体的に説明する。

1. モノクローナル抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

抗原となるCD4またはCD4を発現させた細胞は、CD4全長またはその部分長をコードするcDNAを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞などに導入することにより、得ることができる。また、CD4を多量に発現している各種ヒト腫瘍培養細胞、ヒト組織などからCD4を精製し、得ることが出来る。また、該腫瘍培養細胞、または該組織などをそのまま抗原として用いることもできる。さらに、Fmoc法、またはtBoc法などの化学合成法によりCD4の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。

【0094】

本発明で用いられるCD4は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やCurrent Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該CD4をコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

まず、CD4をコードする部分を含む完全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長cDNAの代わりに、完全長cDNAをもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を用いてもよい。次に、得られた該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

【0095】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製または染色体中への組込みが可能で、ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置に、適当なプロモーターを含有しているものであればいずれも用いることができる。

宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵母、昆虫細胞、または動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

【0096】

大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、CD4をコードする部分を含むDNA、および転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

【0097】

該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列(SD配列ともいう)と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

また、該CD4をコードするDNAの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするCD4の生産率を向上させることができる。

【0098】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2(以上、ロシュ・ダイアグノスティ

10

20

30

40

50

ックス社製)、pKK233 2(ファルマシア社製)、pSE280(インビトロジェン社製)、pGE MEX-1(プロメガ社製)、pQE-8(キアゲン社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)], pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)], pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)], pBluescript II SK(-)(ストラタジーン社製)、pTrs30[大腸菌JM109/pTrS30 (FERM BP-5407)より調製]、pTrs32[大腸菌JM109/pTrS32 (FERM BP-5408)より調製]、pGHA2[大腸菌IGHA2 (FERM BP-400)より調製、特開昭60-221091]、pGKA2[大腸菌IGKA2 (FERM BP-6798)より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX(ファルマシア社製)、pETシステム(ノバジェン社製)、またはpME18SFL3などがあげられる。

10

【0099】

プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、またはT7プロモーターなどの、大腸菌やファージなどに由来するプロモーターを挙げることができる。また、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、またはlet 1プロモーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

【0100】

宿主細胞としては、例えば、大腸菌XL1-Blue、大腸菌XL2-Blue、大腸菌DH1、大腸菌MC1000、大腸菌KY3276、大腸菌W1485、大腸菌JM109、大腸菌HB101、大腸菌No. 49、大腸菌W3110、大腸菌NY49、または大腸菌DH5 などがあげられる。

20

宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]があげられる。

【0101】

動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pcDNA1、pcDM8(フナコシ社製)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3(特開平2-227075)、pcDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp(インビトロジェン社製)、pcDNA3.1(インビトロジェン社製)、pREP4(インビトロジェン社製)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、またはpKANTEX93(WO97/10354)などがあげられる。

30

【0102】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のimmediate early(IE)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター、またはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーターあるいはエンハンサーがあげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

40

【0103】

宿主細胞としては、ヒト白血病細胞Namalwa細胞、サル細胞COS細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞CHO細胞 (Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (pp. 883-900);)、CHO/DG44、CHO-K1(ATCC CCL-61)、DUKXB11(ATCC CCL-9096)、Pro-5(ATCC CCL-1781)、CHO-S(Life Technologies, Cat # 11619)、Pro-3、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(またはYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞N

50

SO、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14、シリアンハムスター細胞BHKまたはHBT5637（特開昭63-000299）、などがあげられる。

【0104】

宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、またはリポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]などがあげられる。

以上のようにして得られるCD4をコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、または動物細胞などの由来の形質転換体を培地に培養し、培養物中に該CD4を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、CD4を製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

10

【0105】

真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたCD4を得ることができる。

誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドなどを、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを培地に添加してもよい。

20

【0106】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地[The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地[Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地[Virology, 8, 396 (1959)]、199培地[Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)]、Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)培地、またはこれら培地に牛胎児血清(FBS)などを添加した培地などがあげられる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下などの条件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

【0107】

CD4をコードする遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産または融合蛋白質発現などの方法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]を用いることができる。

CD4の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるCD4の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

30

【0108】

CD4が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法[J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、またはW094/23021などに記載の方法を用いることにより、CD4を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

40

また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系（特開平2-227075）を利用してCD4の生産量を上昇させることもできる。

【0109】

得られたCD4は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。

CD4が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、またはダイノミルなどを用いて細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル

50

(DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、または等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0110】

CD4が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該CD4の不溶体を回収する。回収した該CD4の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該CD4を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

10

【0111】

CD4またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該CD4またはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明において用いられるCD4は、Fmoc法、またはtBoc法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジーインストルメント社製、シンセセル-ベガ社製、パーセプチブ社製、または島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

20

(2) 動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウス、ラットまたはハムスターなどの動物に、(1)で得られる抗原を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で十分な抗体価の上昇が認められない場合には、CD4ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

【0112】

免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、例えば、フロインドの完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA (ウシ血清アルブミン)、またはKLH (Keyhole Limpet hemocyanin) などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

30

【0113】

抗原の投与は、1回目の投与の後、1~2週間おきに5~10回行う。各投与後3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法 [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

抗原の最終投与後3~7日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

40

(3) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を用い、例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)], P3-NS1/1-Ag41(NS-1) [European J. Immunology, 6, 511 (1976)], SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)], P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)], またはP3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)] などが用いられる。

【0114】

該骨髄腫細胞は、正常培地 [グルタミン、2-メルカプトエタノール、ジェンタマイシン

50

、FBS、および8-アザグアニンを加えたRPMI1640培地]で継代し、細胞融合の3～4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

(4) 細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

(2) で得られる融合用抗体産生細胞と(3) で得られる骨髓腫細胞をMinimum Essential Medium(MEM)培地またはPBS(リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髓腫細胞=5～10：1になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール-1000(PEG-1000)、MEM培地およびジメチルスルホキシドの混液を37℃で、攪拌しながら加える。さらに1～2分間毎にMEM培地1～2mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにする。遠心分離後、上清を除く。沈澱した細胞群をゆるやかにほぐした後、融合用抗体産生細胞にHAT培地[ヒポキサンチン、チミジン、およびアミノプテリンを加えた正常培地]中にゆるやかに細胞を懸濁する。この懸濁液を5%CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

10

【0115】

培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のバインディングアッセイなどのハイブリドーマの選択方法により、CD4を含む抗原に反応し、CD4を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す[1回目はHT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

(5) 精製モノクローナル抗体の調製

20

プリスタン処理[2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する]した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(4)で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。10～21日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、40～50%硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラムあるいはゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgGあるいはIgM画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

【0116】

また、(4)で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、10%FBS添加を添加したRPMI1640培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Hybridoma SFM培地に懸濁し、3～7日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテインA-カラムまたはプロテインG-カラムによる精製を行ない、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Hybridoma SFM培地には5%ダイゴGF21を添加することもできる。

30

【0117】

抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法または280nmでの吸光度より算出する。

(6) モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示す酵素免疫測定法によるバインディングアッセイ、およびBiacoreによるkinetics解析により行う。

40

【0118】

(6-a) バインディングアッセイ

抗原としては、(1)で得られるCD4をコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、あるいは動物細胞などに導入して得られた遺伝子導入細胞、リコンビナント蛋白質、またはヒト組織から得た精製ポリペプチドあるいは部分ペプチドなどを用いる。抗原が部分ペプチドである場合には、BSAまたはKLHなどのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製して、これを用いる。

【0119】

抗原を96ウェルプレートなどのプレートに分注し、固相化した後、第1抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反

50

応させる。PBSまたはPBS-Tweenなどで、よく洗浄した後、第2抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。PBS-Tweenでよく洗浄した後、第2抗体の標識物質に応じた反応を行ない、免疫原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

【0120】

また、本発明の抗CD4モノクローナル抗体と競合してCD4に結合するモノクローナル抗体は、上述のバインディングアッセイ系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被検抗体を加えた時にモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、CD4細胞外領域への結合について、取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

10

【0121】

更に、本発明のCD4の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体が認識するエピトープと、同じエピトープに結合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの、部分的な合成ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

【0122】

(6-b) Biacoreによるkinetics解析

Biacore T100を用い、抗原と被験物の間の結合におけるkineticsを測定し、その結果を機器付属の解析ソフトウェアで解析をする。抗マウスIgG抗体をセンサーチップCM5にアミンカップリング法により固定した後、ハイブリドーマ培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を流し、適当量結合させ、更に濃度既知の複数濃度の抗原を流し、結合、解離を測定する。得られたデータを機器付属のソフトウェアを用い、1:1バインディングモデルによりkinetics解析を行い、各種パラメータを取得する。または、ヒトCD4をセンサーチップ上に、例えばアミンカップリング法により固定した後、濃度既知の複数濃度の精製モノクローナル抗体を流し、結合、解離を測定する。得られたデータを機器付属のソフトウェアを用い、パイバレントバインディングモデルによりkinetics解析を行い、各種パラメータを取得する。

20

2. 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体の作製方法を示す。

30

(1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAが組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAをそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0123】

ヒト抗体のC領域は任意のヒト抗体のCHおよびCLを用いることができる。例えば、ヒト抗体の1サブクラスのCHおよびクラスのCLなどを用いる。ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAには、cDNAを用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体DNAを用いることもできる。動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107[Cyto technol., 3, 133 (1990)]、pAGE103[J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274[Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1bd2-4[Cytotechnology, 4, 173 (1990)]、またはpSE1UK1Sed1-3[Cytotechnology, 13, 79 (1993)]などを用いる。動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーには、SV40の初期プロモーター[J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血ウイルスLTR[Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、または免疫グロブリン鎖のプロモーター[Cell, 41, 479 (1985)]とエンハンサー[Cell, 33, 717 (1983)]などを用いる。

40

【0124】

遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ

50

、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体H鎖およびL鎖が同一のベクター上に存在するタイプ(タンデム型)の遺伝子組換え抗体発現用ベクター[J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]を用いるが、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプを用いることもできる。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、pKANTEX93(WO97/10354)、pEE18[Hybridoma, 17, 559 (1998)]などを用いる。

(2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のVH及びVLをコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。

【0125】

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージまたはプラスミドなどのベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体のC領域部分またはV領域部分をコードするDNAをプローブとして用い、VHあるいはVLをコードするcDNAを有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージまたは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVHあるいはVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVHまたはVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

【0126】

非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスター、またはラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

ハイブリドーマ細胞からの全RNAの調製には、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法[Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、またはRNA easy kit(キアゲン社製)などのキットなどを用いる。

【0127】

全RNAからのmRNAの調製には、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]、またはOligo-dT30<Super> mRNA Purification Kit(タカラバイオ社製)などのキットなどを用いる。また、Fast Track mRNA Isolation Kit(インビトロジェン社製)、またはQuickPrep mRNA Purification Kit(ファルマシア社製)などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からmRNAを調製することもできる。

【0128】

cDNAの合成およびcDNAライブラリーの作製には、公知の方法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)]、またはSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(インビトロジェン社製)、あるいはZAP-cDNA Synthesis Kit(ストラタジーン社製)などのキットなどを用いる。

【0129】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターには、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express[Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、ZAP II(Stratagene社製)、gt10、gt11[DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid(クローンテック社製)、ExCell、pT7T3-18U(ファルマシア社製)、pcD2[Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、またはpUC18[Gene, 33, 103 (1985)]などを用いる。

【0130】

ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌には、該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるもので

10

20

30

40

50

も用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600[Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090[Science, 222, 778 (1983)]、NM522[J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802[J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、またはJM105[Gene, 38, 275 (1985)]などを用いる。

【0131】

cDNAライブラリーからの非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAクローンの選択には、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、またはプラーク・ハイブリダイゼーション法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]などを用いる。

また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction法[以下、PCR法と表記する、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)]を行うことよりVHまたはVLをコードするcDNAを調製することもできる。

【0132】

選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (ストラタジーン社製)などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該cDNAの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]などの反応を行った後、ABI PRISM3700 (PEバイオシステムズ社製)またはA.L.F. DNAシーケンサー (ファルマシア社製)などの塩基配列自動分析装置などを用いる。

【0133】

決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]と比較することによって見出すことができる。

【0134】

また、得られたVHおよびVLの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、SWISS-PROTまたはPIR-Proteinなどの任意のデータベースに対してBLAST法[J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]などの同源性検索を行い、VHおよびVLの完全なアミノ酸配列が新規であるか否かを確認できる。

(3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子上流に、それぞれ非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

【0135】

非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAの3'末端側と、ヒト抗体のCHまたはCLの5'末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したVHおよびVLのcDNAを作製する。作製されたVHおよびVLのcDNAを、(1)で得られるヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子上流にそれらが適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

【0136】

また、非ヒト抗体VHまたはVLをコードするcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法によりそれぞれ増幅し、(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

(4) ヒト化抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。

【0137】

非ヒト抗体のVHまたはVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHまたはVLのフレームワーク領域(以下、FRと表記する)のアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するFRのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のFRのアミノ酸配列、またはヒト抗体のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]などを用いる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)のFRのアミノ酸配列を選択する。

10

【0138】

次に、選択したヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列に、もとの抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]を考慮してDNA配列に変換し、ヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列をそれぞれ設計する。

20

【0139】

設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR反応を行う。この場合、PCR反応での反応効率及び合成可能なDNAの長さから、好ましくはH鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計する。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1)で得られるヒト化抗体発現用ベクターに容易にヒト化抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをクローニングすることができる。

【0140】

30

または、設計したDNA配列に基づき、1本のDNAとして合成された各H鎖、L鎖全長合成DNAを用いることで実施できる。

PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK(-)(ストラタジーン社製)などのプラスミドにそれぞれクローニングし、(2)に記載の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0141】

(5) ヒト化抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。ヒト化抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に参与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に参与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

40

【0142】

抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を同定するために、X線結晶解析[J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)]またはコンピューターモデリング[Protein Engineering, 7, 1501 (1994)]などを用いることにより、抗体の立体構造の構築および解析を行うことができる。また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関

50

を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有する改変ヒト化抗体を取得できる。

【0143】

ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて(4)に記載のPCR反応を行うことにより、改変させることができる。PCR反応後の増幅産物について(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

(6) ヒト化抗体発現ベクターの構築

(1)で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

10

【0144】

例えば、(4)および(5)で得られるヒト化抗体のVHまたはVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1)で得られるヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

(7) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

(3)および(6)で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

20

【0145】

発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばCOS-7細胞[American Type Culture Collection(ATCC)番号:CRL1651]を用いる[Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991)]。

COS-7細胞への発現ベクターの導入には、DEAE-デキストラン法[Methods in Nucleic Acids Res., CRC press (1991)]、またはリポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]などを用いる。

【0146】

発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック (1987)]などを用いて測定する。

30

(8) 遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製

(3)および(6)で得られた遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

【0147】

宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法[特開平2-257891、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]などを用いる。

40

遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、CHO-K1(ATCC CCL-61)、DUKXB11(ATCC CCL-9096)、Pro-5(ATCC CCL-1781)、CHO-S(Life Technologies, Cat # 11619)、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(またはYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞NS0、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14(ATCC番号:CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC番号:CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(以下、dhfrと表記する)が欠損したCHO細胞[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)]、レクチン耐性を獲得したLec13[Somatic Cell and Molecular genetics, 1, 55 (1986)]、1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞(WO2005/035586、WO02/31140)、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC番号:CRL1662)などを用い

50

る。

【0148】

また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素などの蛋白質あるいはN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素などの蛋白質、または細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、例えば1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞(WO2005/035586、WO02/31140)などを用いることもできる。

【0149】

発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、G418硫酸塩(以下、G418と表記する)などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する(特開平2-257891)。

動物細胞培養用培地には、RPMI1640培地(インビトロジェン社製)、GIT培地(日本製薬社製)、EX-CELL301培地(ジェイアールエイチ社製)、IMDM培地(インビトロジェン社製)、Hybridoma-SFM培地(インビトロジェン社製)、またはこれら培地にFBSなどの各種添加物を添加した培地などを用いる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性はELISA法などにより測定できる。また、形質転換株は、DHFR増幅系(特開平2-257891)などを利用して遺伝子組換え抗体の発現量を上昇させることができる。

【0150】

遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインA-カラムを用いて精製する[*Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)*、*Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)*]。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過などの蛋白質の精製で用いられる方法を組み合わせることもできる。

【0151】

精製した遺伝子組換え抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法[*Nature, 227, 680 (1970)*]、またはウェスタンブロッティング法[*Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)*、*Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)*]などを用いて測定することができる。

3. 精製モノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価

精製した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。

【0152】

CD4発現細胞株に対する結合活性は、前述の1-(6a)記載のバインディングアッセイおよび(6b)記載のBiacoreシステムなどを用いた表面プラズモン共鳴法を用いて測定する。また、蛍光抗体法[*Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)*]などを用いて測定できる。

抗原陽性培養細胞株に対するCDC活性、またはADCC活性は公知の測定方法[*Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)*]により測定する。

4. 抗体のエフェクター活性を制御する方法

本発明の抗CD4モノクローナル抗体のエフェクター活性を制御する方法としては、抗体のFc領域の297番目のアスパラギン(Asn)に結合するN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に-1,6結合するフコース(コアフコースともいう)の量を制御する方法(WO2005/035586、WO2002/31140、WO00/61739)や、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明の抗CD4モノクローナル抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

【0153】

10

20

30

40

50

エフェクター活性とは、抗体のFc領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）、補体依存性傷害活性（CDC活性）や、マクロファージや樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Antibody-dependent phagocytosis, ADP活性）などが知られている。

抗体のFcのN結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。フコースが結合していない抗体は高いADCC活性を有する。一方、抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法として、1,6-フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いADCC活性を有する。

【0154】

また、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することでADCC活性やCDC活性を増加または低下させることができる。Fc領域のアミノ酸残基改変を行うことで、Fc Rへの結合活性を増加させるあるいは低下させることによりADCC活性を制御することができるし、Fc領域のアミノ酸残基改変を行うことで、補体の結合活性を増加させるあるいは低下させることによりCDC活性を制御することができる。例えば、US2007/0148165に記載のFc領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のCDC活性を増加させることができる。また、US6,737,056、US7,297,775、やUS7,317,091、WO2005/070963に記載のアミノ酸改変を行うことで、ADCC活性またはCDC活性を、増加させることも低下させることもできる。

【0155】

更に、上述の糖鎖を制御する方法とFc領域のアミノ酸残基改変を行う方法を組み合わせることにより、抗体のエフェクター活性が制御された抗体を取得することができる。

5. 本発明の抗CD4モノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片は、CD4陽性細胞が関与する疾患の治療に用いることができる。

【0156】

本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片、またはこれらの誘導体を含む治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

投与経路には、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内あるいは静脈内などの非経口投与があげられ、投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、またはテープ剤などがあげられる。

【0157】

経口投与に適当な製剤は、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、または顆粒剤などである。

乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトールあるいは果糖などの糖類、ポリエチレングリコールあるいはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油あるいは大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、またはストロベリーフレーバーあるいはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

【0158】

カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖あるいはマンニトールなどの賦形剤、デンプンあるいはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムあるいはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロースあるいはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

【0159】

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤または噴霧剤などである。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造する。

噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖またはグリセリンなどを用いる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。

【0160】

さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適切な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

6. 本発明の抗CD4モノクローナル抗体またはその抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明のモノクローナル抗体または該抗体断片を用いて、CD4またはCD4が発現した細胞を検出または測定することにより、CD4が関連する疾患を診断することができる。

【0161】

CD4が関連する疾患の一つである癌の診断は、例えば、以下のようにCD4の検出または測定して行うことができる。

患者体内の癌細胞に発現しているCD4をフローサイトメーターなどの免疫学的手法を用いて検出することにより診断を行うことができる。

免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射性物質標識免疫抗体法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などを用いる。

【0162】

放射性物質標識免疫抗体法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

酵素免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体または該抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する。例えばサンドイッチELISA法などを用いる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知[酵素免疫測定法, 医学書院 (1987)]の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、またはビオチン標識などを用いる。サンドイッチELISA法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該ELISA法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、第1の抗体または抗体断片を予めプレート(例えば、96ウェルプレート)に吸着させ、次に第2の抗体または抗体断片をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、またはビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破砕液、組織またはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、または眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、またはF(ab)₂などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチELISA法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体または抗体断片との組み合わせでもよい。

【0163】

10

20

30

40

50

蛍光免疫測定法は、文献[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)]などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知[蛍光抗体法、ソフトサイエンス社 (1983)]の蛍光標識を用いることができる。例えば、FITC、またはRITCなどを用いる。

【0164】

発光免疫測定法は文献[生物発光と化学発光 臨床検査42、廣川書店 (1998)]などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識があげられ、アクリジニウムエステル、ロフィンなどを用いる。

ウェスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)-PAGE[Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、またはビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。一例を以下に示す。配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として0.1~30 µgをSDS-PAGE法により泳動する。泳動されたタンパク質をPVDF膜にトランスファーし1~10%BSAを含むPBS(以下、BSA-PBSと表記する)に室温で30分間反応させブロッキング操作を行う。ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、0.05~0.1%のTween-20を含むPBS(以下、Tween-PBSと表記する)で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgGを室温で2時間反応させる。Tween-PBSで洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents(アマシャム社製)などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する。ウェスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

【0165】

物理化学的手法は、例えば、抗原であるCD4と本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法として、毛細管法、次元免疫拡散法、免疫比濁法あるいはラテックス免疫比濁法[臨床検査法提要、金原出版 (1998)]などを用いることもできる。ラテックス免疫比濁法は、抗体または抗原を感作させた粒径0.1~1 µm程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原あるいは抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度あるいは積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

【0166】

一方、CD4が発現している細胞の検出または測定は、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、好ましくは免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などを用いる。

免疫沈降法は、CD4を発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片と反応させた後、プロテインG-セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる。または以下のような方法によっても行なうことができる。ELISA用96ウェルプレートに上述した本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を固相化した後、BSA-PBSによりブロッキングする。抗体が、例えばハイブリドーマ培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリン、抗ラットイムノグロブリン、プロテイン-Aまたはプロテイン-GなどをあらかじめELISA用96ウェルプレートに固相化し、BSA-PBSでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清を分注して結合させる。次に、BSA-PBSを捨てPBSでよく洗浄した後、CD4を発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をSDS-PAGE用サンプルバッファーで抽出し、上記のウェスタンブロッティングにより検出

10

20

30

40

50

する。

【0167】

免疫細胞染色法または免疫組織染色法は、抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明のモノクローナル抗体と反応させ、さらにFITCなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片と反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法である。また、蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フロ-サイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法[Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック (1987)]により検出を行うこと
10

【0168】

また、蛍光抗体染色法のうち、FMAT8100HTSシステム(アプライドバイオシステム社製)などを用いた場合には、形成された抗体-抗原複合体と、抗体-抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定できる。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。
20

【実施例1】

【0169】

CD4トランスフェクタントの作製

(1) CD4発現ベクターの作製

ヒトCD4遺伝子配列が組み込まれたベクターは、ベクターpCMV-SPORT6にヒトCD4遺伝子が組み込まれたベクター(Open Biosystems社製、Clone No.5226427、以下pCMV-CD4と記す)から以下のようにして作製した。

【0170】

CD4遺伝子断片は、pCMV-CD4を鋳型とし、配列番号79、80で表される塩基配列を有するプライマーを用いて通常のPCR法により増幅した。PCR産物をPCR Purification Kit (QIAGEN社製)により精製し、EcoRIおよびSpeIで制限酵素処理した。ベクターpBluescript II sk(-)(ストラタジーン社製)(以下、pBSと記す)も同様にEcoRIおよびSpeIで制限酵素処理を行い、これら2種類の断片をLigation high (TOYOBO社製)を用いて添付の説明書に従って連結した。得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 株 (TOYOBO社製)を形質転換した。形質転換株のクローンよりプラスミドDNAを調製して制限酵素処理により確認し、CD4遺伝子が挿入されたプラスミドpBS/CD4を取得した。こうして得られたCD4遺伝子が組み込まれたpBS/CD4、および動物細胞用発現ベクターpKANTEX93 (WO97/10354)をEcoRIおよびSpeIで制限酵素処理した。その反応液をアガロースゲル電気泳動により分画し、CD4のEcoRI-SpeI断片およびpKANTEX93のEcoRI-SpeI断片をそれぞれ回収した。これら2種類の断片をLigation high (TOYOBO社製)を用いて添付の説明書に従って連結した
30
40

得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 株 (TOYOBO社製)を形質転換した。形質転換株のクローンよりプラスミドDNAを調製して制限酵素処理により確認し、CD4遺伝子が挿入されたプラスミドpKANTEX/CD4を取得した。該プラスミドに関して、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ社製)を用いて、添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。その結果、ヒトCD4をコードするcDNAがクローニングされたベクターpKANTEX/CD4を取得した。ベクター構築の概略図を図1に示した。

(2) CD4発現CHO/DG44細胞の作製

上記(1)で作製したCD4発現ベクターpKANTEX/CD4を、エレクトロポレーション法[Cyto technology, 3, 133(1990)]により、以下のようにしてCHO/DG44細胞[Somatic Cell and
50

Molecular Genetics, 12, 555 (1986)]へ導入した。細胞は、10%ウシ胎児血清（ライフテクノロジー社製）およびGentamicin（ナカライテスク社製、50 μg/mL）を添加したIMDM培地（インビトロジェン社製）（以下、A3培地と表記する）に、1×HT supplement（インビトロジェン社製）を添加した培地で継代したものをを用いた。CHO/DG44細胞を137nmol/L塩化カリウム、2.7nmol/L塩化ナトリウム、8.1mmol/Lリン酸一水素ナトリウム、1.5nmol/Lリン酸二水素ナトリウムおよび4mmol/L塩化マグネシウムを含む緩衝液（以下、K-PBSと表記する）に懸濁して8×10⁶細胞/mLとし、得られた細胞懸濁液200 μL（1.6×10⁶個の細胞）を発現プラスミドpKANTEX/CD4（8 μg）と混和した。この混和液をキュベット（電極間距離2mm）に移し、GenePulserII（パイオラッド社製）を用いてパルス電圧0.35 kV、電気容量250 μFの条件で遺伝子導入を行った。キュベットを氷上で静置後、キュベット中の細胞懸濁液を、A3培地を含む細胞培養用容器に懸濁し、37℃、5%炭酸ガス培養器中で培養した。その後、G418（インビトロジェン社製、0.5mg/mL）を添加した培地で培養し、G418に耐性を有する形質転換細胞株を取得した。更にメソトレキセートを培地に添加し、段階的に濃度を上昇させることにより、CD4を高発現するクローンを選択し、CD4発現CHO細胞株（CHO/CD4細胞、またはCD4トランスフェクタントと記す）を取得した。

10

【実施例2】

【0171】

CD4-Fcの作製

(1) CD4-Fc発現ベクターの作製

実施例1(1)で作製した、ヒトCD4遺伝子が入ったベクターpBS/CD4とベクターpKANTEX93を混合して鋳型とし、配列番号79、80、81、82で表される4種の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行った。この反応により、CD4タンパク質の細胞外領域をコードする遺伝子とFc領域の遺伝子を連結した遺伝子配列を合成した（以下CD4 Fc遺伝子と表す）。こうして得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動により分画し、目的のCD4 Fc遺伝子（約2kbp）を切り出して精製した。精製産物をテンプレートとして配列番号79、82で表される2種類のプライマーを用いて再度PCR反応を行うことにより、CD4-Fc遺伝子を増幅した。このPCR産物をアガロースゲル電気泳動により分画し、約2kbpの目的遺伝子CD4-Fcを切り出してEcoRIおよびSpeIで制限酵素処理することにより、CD4-Fc遺伝子のEcoRI-SpeI断片を取得した。同様にベクターpKANTEX93をEcoRおよびSpeIで制限酵素処理を行い、これら2種類の断片をLigation High（TOYOBO社製）を用いて連結した。得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株（TOYOBO社製）を形質転換した。形質転換株のクローンよりプラスミドDNAを調製して制限酵素処理により確認し、CD4 Fc遺伝子が挿入されたプラスミドpKANTEX/CD4 Fcを取得した。該プラスミドに関して、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（PEバイオシステムズ社製）を用いて、添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。その結果、CD4-FcをコードするcDNAがクローニングされたベクターpKANTEX/CD4-Fcを取得した。ベクター構築の概略図を図2に示した。

20

30

(2) CD4-Fcの発現

上記(1)で作製したpKANTEX/CD4 Fcを用いて、常法[Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company (1992)]により、CD4-Fcを発現させたCHO細胞を取得した（以下、CHO/CD4-Fcと記す）。

40

(3) 可溶性CD4-Fcの精製

上記(2)で作製したCHO/CD4-Fcを、実施例1(2)の方法と同様な培養条件で培養した後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4℃の条件で20分間の遠心分離を行い、培養上清を回収した後、0.22 μm孔径MillexGVフィルター（Millipore社製）を通して濾過滅菌した。得られた培養上清よりProtein A High-capacityレジン（Millipore社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、CD4-Fcタンパク質の精製を行った。

【実施例3】

【0172】

抗CD4モノクローナル抗体の作製

50

(1) 免疫原の調製

抗CD4モノクローナル抗体を取得するため、リコンビナントヒトCD4 (R&Dシステム社製、カタログ番号 514-CD/CF) 凍結乾燥品をダルベッコリン酸バッファー (Phosphate buffered saline: PBS) にて溶解したもの、または実施例2(3)で調整したヒトCD4-Fc融合蛋白 (以下CD4-Fcと表記する) を免疫原として用いた。

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

リコンビナントヒトCD4または実施例2(3)で作製したCD4-Fcの20 µgを水酸化アルミニウムアジュバント [Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99, 1988] 2mgを百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製) 1×10^9 細胞とともにSDラット (日本SLC社) に投与した。投与2週間後より、該CD4 20 µgと水酸化アルミニウムアジュバント2mgのみを1週間に1回、計4回投与した。該ラットの眼底静脈より部分採血し、その血清抗体価をCD4バインディングELISAで確認し、十分な抗体価を示したラットから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。脾臓をMEM (Minimum Essential Medium) 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、すりつぶして遠心分離 (1200 rpm、5分間) した。得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.6) を添加し、37 °Cで1分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分 (細胞画分) をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

(3) CD4バインディングELISA

アッセイには96ウェルのELISA用プレート (グライナー社) を用いた。実施例1(1)で調製した2 µg/mLリコンビナントヒトCD4をプレートに50 µL/ウェルで分注し、4 °Cで一晩静置して吸着させたものを用いた。該プレートをPBSで洗浄後、1%牛血清アルブミン (BSA) -PBS (以下、BSA-PBSと記す) を100 µL/ウェル加え、室温で1時間静置して残っている活性基をブロックした。その後、BSA-PBSを捨て、該プレートに一次抗体として被免疫ラット血清を適宜希釈して50 µL/ウェル分注し、2時間静置した。該プレートを0.05%ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート [(ICI社商標Tween 20相当品: 和光純薬工業社製)] /PBS (以下Tween PBSと表記) で洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラットIgG (H+L鎖) 抗体 (ZYMED社) を50 µL/ウェル加えて1時間室温で静置した。該プレートをTween PBSで洗浄し、ABTS [2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] 基質液 [1 mmol/L ABTS、.1 mol/L クエン酸バッファー (pH4.2)、0.1% H₂O₂] を50 µL/ウェル添加して発色させ、5% SDS (Sodium Lauryl Sulfate) 溶液を50 µL/ウェル添加して反応を止めてOD415nmの吸光度をプレートリーダーEmax (Molecular Devices社) を用いて測定した。

(4) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3X63Ag8U.1 (P3-U1: ATCCより購入) を10% ウシ胎児血清添加RPMI1640 (インビトロジェン社) で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

(5) FMAT法による培養上清の測定

実施例1で作製したCD4トランスフェクタントまたは陰性対象としてCHO/DC44細胞を、96ウェルFMAT用プレート (アプライドバイオシステム社製) に、 1×10^4 細胞/50 µL/ウェルの細胞数で播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。該プレートにハイブリドーマの培養上清を10 µL/ウェル添加し、すぐにBSA-PBSで希釈したAlexa-647標識ヤギ抗ラットIgG (H+L) 抗体 (インビトロジェン社製) を50 µL/ウェル加え、遮光して室温で3時間静置した。その後、レーザー光 633nm He/Neで励起される650nm ~ 685nmの波長を、8200 Cellular Detection System (アプライドバイオシステム社製) を用いて測定した。以下、この測定法をFMAT法とする。

(6) ハイブリドーマの作製

実施例3(2)で得られたマウス脾細胞と実施例3(4)で得られた骨髄腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離 (1200rpm、5分間) した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37 °Cで、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 1g、Minimum Essential Medium (以下、MEM培地) 1mL、およびDMSO (ジメチルスルホキシド) 0.

10

20

30

40

50

35mLの混液を 1×10^8 個のマウス脾細胞あたり0.5mL加え、該懸濁液に1分間毎にMEM培地1mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにした。該細胞懸濁液を遠心分離(900rpm、5分間)し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、HAT培地〔10%ウシ胎児血清添加RPMI1640培地にHAT Media Supplement(インビトロジェン社製)を加えた培地〕100mL中にゆるやかに懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200 μ L/ウェルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で10~14日間培養した。培養後、培養上清を実施例3(5)に記載のFMAT法で測定し、実施例1で作製したCHO/CD4には反応し、CHO/DG44細胞には反応しないウェルを選択した。次に、選択されたCD4特異的抗体を産生している細胞を、限界希釈法によるクローニングを2回繰り返して行い、抗CD4モノクローナル抗体産生ハイブリドーマKM4065、KM4066、KM4067、KM4068およびKM4069を確立した。

10

【実施例4】

【0173】

抗CD4ラットモノクローナル抗体の活性評価

(1) FCMを用いたヒトCD4陽性セルラインに対する抗CD4ラットモノクローナル抗体の反応性

1~5 $\times 10^5$ 細胞のヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALLに、ヒトIgG(シグマ社製)を1mg/mL加えて細胞をブロッキングし、抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065~KM4069および抗CD4マウス抗体OKT4(BioLegend社製)をBSA-PBSで適宜希釈して添加し、全量を50 μ Lとした。これらの細胞懸濁液を氷上で60分間反応させた後、BSA-PBSを用いて細胞を2回洗浄した。該細胞に、BSA-PBSで希釈調製したAlexa-488標識抗ラットIgG(H+L)ヤギ抗体(インビトロジェン社製)を50 μ L添加し、氷上で40分間反応させた。BSA-PBSで細胞を1回洗浄した後、BSA-PBSに懸濁して、フローサイトメーター(ベックマン・コールター社製)を用いて、蛍光強度を測定した。

20

【0174】

図3に、上記モノクローナル抗体を5、0.5および0.05 μ g/mLで反応させた場合の平均蛍光強度(MFI値)を示す。抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065~KM4069、および抗CD4マウス抗体OKT4はいずれも抗体濃度依存的にCD4陽性細胞株へ結合することが確認された。

(2) Biacoreを用いたリコンビナントヒトCD4に対する抗CD4ラットモノクローナル抗体の結合活性

30

抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065~KM4069および市販抗ヒトCD4マウス抗体の、リコンビナントヒトCD4に対する結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモン共鳴法(SPR法)を用いて結合活性測定を行った。以下の操作は全てBiacore T100(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いて行った。Mouse Antibody Capture Kit(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用い、添付のプロトコールに従い、抗マウスIgG抗体をアミンカップリング法によりCM5センサーチップ(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)に固着化した。抗マウスIgG抗体を固着化したチップに、抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065~KM4069、Leu-3a(BDバイオサイエンス)、OKT4(バイオレジェンド)および13B8.2(ベックマンコールター)をそれぞれ添加し、100RU(レゾナンスユニット)になるようにセンサーチップ上にキャプチャーさせた。その後2500ng/mLから5段階に希釈したリコンビナントヒトCD4(R&D社製)を、30 μ L/minの速度でチップ上に流し、各濃度におけるセンサーグラムを取得した。装置添付の解析ソフトを用い、1:1バインディングモデルを用いて解析し、各抗体のヒトCD4に対する結合速度定数ka及び解離速度定数kdを算出した。

40

【0175】

その結果、取得した各抗体の結合速度定数(以下、kaと記す)、解離速度定数(以下、kdと記す)および解離定数K_D(kd/ka)を表2に示した。

表2に示すように、抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065およびKM4066は既存抗体よりも高いアフィニティを示した。

【0176】

50

【表2】

抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
KM4065	3.57E+05	1.52E-06	4.26E-12
KM4066	1.34E+06	1.18E-04	8.82E-11
KM4067	8.75E+05	4.73E-04	5.41E-10
KM4068	1.85E+06	2.04E-03	1.10E-09
KM4069	1.21E+06	5.84E-04	4.82E-10
Leu-3a*	1.10E+06	1.29E-04	1.17E-10
OKT4**	1.05E+06	3.06E-03	2.90E-09
13B8.2***	4.44E+05	1.56E-04	3.52E-10

*BDバイオサイエンス社製、**バイオレジェンド社製、***ベックマンコールター社製

【0177】

(3) 抗CD4ラットモノクローナル抗体のCD4トランスフェクタントに対する補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)の評価

実施例1で作製したCD4トランスフェクタントに対する抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4066~KM4068および抗CD4マウス抗体OKT4のCDC活性を、ラットハイブリドーマの培養上清を用いて、以下に示す方法に従って測定した。

【0178】

CD4トランスフェクタントをPBSで洗浄後、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むRPMI1640培地(和光純薬工業社製)で洗浄し、同培地で至適濃度に調製して標的細胞懸濁液とした。1ウェル当たり 5×10^4 個となるよう、標的細胞懸濁液を96well平底プレート(住友ベークライト社製)に分注し、更に、適当な濃度に調製した抗CD4キメラ抗体溶液及び終濃度が25%のヒト補体(SIGMA社製)を添加し、全量100 μ L/ウェルに調製した。また、陰性対照として抗体を含まない反応ウェル(0%細胞傷害活性ウェル)、陽性対照として細胞を含まない反応ウェル(100%細胞傷害活性ウェル)をそれぞれ用意した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーターにおいて3時間反応を行った。反応終了後、各反応ウェルに10 μ LのWST-1試薬(ロシュ社製)を加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間程度反応させ、各ウェルにおけるOD450をプレートリーダーEmax(Molecular Devices社)を用いて測定した。各ウェルの吸光度より以下の式を用いてCDC活性(細胞傷害活性[%])を算出した。

(式)

CDC活性(細胞傷害活性[%]) = $100 \times \{1 - (\text{反応ウェルの吸光度} / 100\% \text{Lysisウェルの吸光度}) / (0\% \text{Lysisウェルの吸光度} / 100\% \text{Lysisウェルの吸光度})\}$

その結果を図4に示した。図4に示されるように、既存の抗CD4マウス抗体OKT4はCDC活性を有し、同様に本発明で取得した抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4066~KM4068は、いずれのクローンもCDC活性を示した。

【実施例5】

【0179】

抗CD4モノクローナル抗体の可変領域をコードするcDNAの単離、解析

(1) 抗CD4モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞からのmRNAの調製

実施例3で取得した各ハイブリドーマKM4065~KM4069それぞれ、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 個の細胞より、RNAeasy Mini kit(QIAGEN社製)およびOligotexTM-dT30<Super>mRNA Purificat

10

20

30

40

50

ion Kit (TaKaRa社製) を用いて、それぞれ添付の使用説明書に従い、各抗CD4ラットモノクローナル抗体のmRNAを調製した。

(2) 抗CD4モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖可変領域の遺伝子クローニング

実施例5(1)で取得したモノクローナル抗体のmRNA 0.5 µgから、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社製) を用いて、添付の使用説明書に従ってcDNAを取得した。取得したcDNAを鋳型として、キット添付のユニバーサルプライマーAmixと、ラットIgG1に特異的なプライマー(配列番号3)、ラットIgG2aに特異的なプライマー(配列番号4)、またはIgG2bに特異的なプライマー(配列番号5)とを用いて、それぞれPCR反応を行い、各抗体の重鎖可変領域(以下、VHと記す)のcDNA断片を増幅した。また抗体の各サブクラス特異的プライマーの代わりにラットIg()特異的プライマー(配列番号6)を用いてPCRを行い、各抗体の軽鎖可変領域(以下、VLと記す)のcDNA断片を増幅した。いずれの抗体サブクラスにおいても、PCR反応は、94 °Cで5分間加熱後、94 °Cで15秒間、72 °Cで3分間からなる反応サイクルを5回、94 °Cで15秒間、70 °Cで30秒間、72 °Cで3分間からなる反応サイクルを5回、94 °Cで15秒間、68 °Cで30秒間、72 °Cで3分間からなる反応サイクルを30回それぞれ行った後、72 °Cで10分間反応させて行った。PCR反応は、PTC-200 DNA Engine (BioRad社製) を用いて行った。

【0180】

次に、クローニングして塩基配列を決定するため、取得したPCR産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、VH遺伝子断片およびVL遺伝子断片をGel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、それぞれ抽出した。次に、Target Clone Plus (TOYOBO社製) を用いて、添付の説明書に従って、得られた抽出断片にデオキシアデニン(dA)を付加した後、pTA2ベクターに各抗体のVHまたはVLを組み込んだ。こうして得られたベクターを用いて、Competent Quick (TOYOBO社製) の付属の取扱説明書に従って大腸菌DH5 株を形質転換した。得られた形質転換体より自動プラスミド抽出機(クラボウ社製)を用いてプラスミドを抽出した。クローニングしたPCR産物の塩基配列は、抽出したプラスミドを、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ社製)を用いて、添付の説明書に従って反応させた後、同社のシーケンサーABI PRISM3700を用いて解析した。その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する、完全長のVHのcDNAを含むプラスミドおよびVLのcDNAを含むプラスミドが取得された。クローニングの概略を図5に示した。

(3) 抗CD4モノクローナル抗体可変領域の遺伝子配列の解析

実施例5(2)で得られたプラスミドに含まれていた、抗CD4モノクローナル抗体KM4065~KM4069のVHの全塩基配列を配列番号7~11に、該配列から推定されるシグナル配列を含んだVHの全アミノ酸配列を配列番号12~16に、またVLの全塩基配列を配列番号17~21に、該配列から推定されるシグナル配列を含んだVLの全アミノ酸配列を配列番号22~26にそれぞれ示した。既知のラット抗体の配列データ[SEQUENCES of Proteins of Immunological Interest、US Dept. Health and Human Services(1991)]との比較から、単離した各々のcDNAは分泌シグナル配列を含む抗CD4モノクローナル抗体KM4065~KM4069の可変領域(以下、V領域と記す)をコードする完全長cDNAであり、KM4065のH鎖については配列番号12に記載のアミノ酸配列の1から19番目が、KM4065のL鎖については配列番号22に記載のアミノ酸配列の1から20番目が分泌シグナル配列であり、KM4066のH鎖については配列番号13に記載のアミノ酸配列の1から19番目が、KM4066のL鎖については配列番号23に記載のアミノ酸配列の1から19番目が分泌シグナル配列であり、KM4067のH鎖については配列番号14に記載のアミノ酸配列の1から18番目が、KM4067のL鎖については配列番号24に記載のアミノ酸配列の1から20番目が分泌シグナル配列であり、KM4068のH鎖については配列番号15に記載のアミノ酸配列の1から19番目が、KM4068のL鎖については配列番号25に記載のアミノ酸配列の1から20番目が分泌シグナル配列であり、KM4069のH鎖については配列番号16に記載のアミノ酸配列の1から19番目が、KM4069のL鎖については配列番号26に記載のアミノ酸配列の1から20番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

【0181】

次に、抗CD4モノクローナル抗体KM4065～KM4069のVHおよびVLのアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとしてGCG Package (version 9.1、Genetics Computer Group社製)を用い、既存のタンパク質のアミノ酸配列データベースをBLASTP法[Nucleic Acids Res., 25,3389(1997)]により検索した。その結果、VH、VLともに完全に一致するアミノ酸配列は認められず、抗CD4モノクローナル抗体KM4065～KM4069のVHおよびVLは新規なアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0182】

また、各モノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗CD4モノクローナル抗体KM4065のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号27、28および29に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号30、31および32にそれぞれ示した。抗CD4モノクローナル抗体KM4066のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号33、34および35に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号36、37および38にそれぞれ示した。抗CD4モノクローナル抗体KM4067のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号39、40および41に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号42、43および44にそれぞれ示した。抗CD4モノクローナル抗体KM4068のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号45、46および47に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号48、49および50にそれぞれ示した。抗CD4モノクローナル抗体KM4069のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号51、52および53に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号54、55および56にそれぞれ示した。

【実施例6】

【0183】

抗CD4キメラ抗体の作製

(1) 抗CD4キメラ抗体発現ベクターの構築

本発明で作製するキメラ抗体は、実施例5(2)で得られた抗CD4ラットモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の変領域に、US2007/0148165に開示されているヒトIgG1抗体のFc領域の一部をヒトIgG3抗体のFcに置換したアミノ酸配列からなる、強いCDC活性を有する重鎖定常領域(以下、113F型と記す)およびヒトの軽鎖定常領域をそれぞれ連結したキメラ抗体である。方法としては、抗CD20抗体の変領域が含まれる高CDC型キメラ抗体発現ベクターPKTX93/113F(US2007/0148165に記載)と、実施例5(2)で得られた各モノクローナル抗体のVHまたはVLが含まれているpTA2ベクターを用いて、抗CD4キメラ抗体発現ベクターを以下のようにして構築した(図5、図6)。

【0184】

各モノクローナル抗体のVHまたはVLが含まれたTA2ベクターを鋳型として100ng使用し、10×KOD Plus緩衝液5μL、2mmol/L dNTP 5μL、25mmol/Lの塩化マグネシウムを2μL、DM SOを2.5μL、KOD plus polymerase (TOYOBO社製)を1μL、各抗CD4ラットモノクローナル抗体のVHおよびVLに特異的な10μmol/Lのプライマーを、それぞれ1μLを含む、全量50μLからなる溶液を調製した。該調製した溶液を用いて、94℃で2分間加熱後、94℃で15秒間、60.6℃で30秒間、68℃で1分間の反応を30サイクルのPCR反応を行った。KM4065のVHのプライマーは配列番号57および58、VLのプライマーは配列番号59および60、KM4066のVHのプライマーは配列番号61および62、VLのプライマーは配列番号63および64、KM4067のVHのプライマーは配列番号65および66、VLのプライマーは配列番号67および68、KM4068のVHのプライマーは配列番号69および70、VLのプライマーは配列番号71および72、KM4069のVHのプライマーは配列番号73および74、VLのプライマーは配列番号75および76に示す。

【0185】

それぞれのPCR反応産物をPCR Purification Kit(QIAGEN社製)を用いて精製した。得られた各抗体のVHは、ApaI (New England Biolabs社製)およびNotI (New England Biolabs社製)を用いて制限酵素処理を行い、VHのNotI-ApaI断片を取得した。また、各抗体のVLは、BsiWI (New England Biolabs社製)およびEcoRI (New England Biolabs社製)を用いて制限酵素処理を行い、VLのEcoRI-BsiWI断片を取得した。高CDC型キメラ抗体発現ベクター

—PKTX93/113Fも、同様にNotIおよびApaI、またはEcoRIおよびBsiWIで制限酵素処理を行った。以下は、実施例1(1)と同様の方法で行い、抗CD4モノクローナル抗体KM4065~KM4069のVHをコードするcDNAがクローニングされたベクターと、抗CD4モノクローナル抗体KM4065~KM4069のVLをコードするcDNAがクローニングされたベクターを取得した。取得した各抗体のVHまたはVLが組み込まれたPKTX93/113FベクターにEcoRIおよびNotIを加えて制限酵素処理を行い、VLのEcoRI-NotI断片と、VHが組み込まれたPKTX93/113FベクターのNotI-EcoRI断片を取得した。以下は、実施例1(1)と同様の方法で行い、抗CD4モノクローナル抗体KM4065~KM4069のVHおよびVLをコードするcDNAがそれぞれクローニングされた、抗CD4キメラ抗体発現ベクターを取得した。ベクター構築の概略図を図6に示した。また、抗CD4モノクローナル抗体KM4065~KM4069から作製した抗CD4キメラ抗体を、それぞれ抗CD4キ

10

【0186】

【表3】

ラットモノクローナル抗体	キメラ抗体
KM4065	KM4045
KM4066	KM4046
KM4067	KM4047
KM4068	KM4048
KM4069	KM4049

20

【0187】

(2) 動物細胞を用いた抗CD4キメラ抗体の発現

実施例6(1)で得られた抗CD4キメラ抗体発現ベクターを用いて抗CD4キメラ抗体の動物細胞での発現を、常法[Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company (1992)]により行い、抗CD4キメラ抗体を産生する形質転換株KM4045~KM4049を取得した。発現させる動物細胞株としては、1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)の遺伝子をダブルノックアウトしたCHO/DG44細胞株(以下、FUT8ノックアウトCHO細胞)を用いた。この宿主細胞株で発現させた抗体のN-結合型複合型糖鎖のコア部分には、フコースが付加されないことが知られている(WO2002/31140)。

30

(3) 精製キメラ抗体の取得

上記(2)で得られた形質転換株KM4045~KM4049を、通常の培養法で培養した後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4の条件で20分間の遠心分離を行い、培養上清を回収した後、0.22µm孔径MillexGVフィルター(Millipore社製)を通して濾過滅菌した。得られた培養上清よりProtein A High-capacityレジン(Millipore社製)カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗CD4キメラ抗体KM4045~KM4049を精製した。

(4) 抗CD4ヒト抗体6G5のIgG1型抗体および113F型抗体の作製

本発明の抗CD4モノクローナル抗体の活性と比較するために、既存の抗CD4ヒト抗体6G5の可変領域と、通常のヒトIgGFc領域または高CDC活性型113F型Fc領域を有する2種類の抗体(以下、6G5-1、6G5-113Fと略記する)を作製した。

40

【0188】

抗CD4ヒト抗体6G5のVHおよびVLをコードする遺伝子は、US2006/0183195に開示されている配列情報に基づき、それぞれ配列番号89~92の合成オリゴDNA、配列番号83~88の合成オリゴDNAと、可変領域の両端に位置するT3プライマーおよびT7プライマーを用いて、PCR反応を行って作製した。PCR反応で増幅した6G5抗体のVHまたはVL遺伝子断片をpBluescript II sk(-)ベクター(ストラタジーン社製)と連結してサブクローニングを行った。これ以降は、実施例1または実施例6(2)と同様にして行い、6G5.1-1発現ベクターおよび6G5.1-113F発現ベクターを作製した(図7)。作製した6G5.1-1発現ベクターは、CHO/DG44細胞およびFUT8ノックアウトCHO細胞(WO2002/31140)の両方で発現させ、6G5.1-113F

50

発現ベクターは、FUT8ノックアウトCHO細胞で発現させた。発現ベクターの導入、発現株の取得、細胞培養および抗体精製は、上述実施例6(2)および(3)と同様にして行い、その結果、抗体のN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンにフコースが1,6結合している6G5-1抗体(以下、6G5-1と記す)、フコースが結合していない6G5-1抗体(以下、6G5-Pと記す)および抗体のFc領域のN結合複合型糖鎖にフコースが結合していない6G5-113F抗体(以下、6G5-113Fと記す)を取得した。

(5) 抗CD4キメラ抗体のフコース含量測定

WO2002/31140に記載の方法に従い、各抗CD4キメラ抗体および6G5-1抗体のFc領域のN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合していない糖鎖の割合を調べた。結果を表4に示す。

【0189】

この結果から、実施例6(3)で作製したキメラ抗体にはフコースが付加していないことが明らかになった。

【0190】

【表4】

抗CD4キメラ抗体のフコース含量

KM4045 0%

KM4046 0%

KM4047 0%

KM4048 0%

KM4049 0%

6G5-1 100%

【実施例7】

【0191】

抗CD4キメラ抗体の活性評価

以下の(1)から(4)では、実施例6で得られた抗CD4キメラ抗体KM4045~KM4049、実施例6(5)で作製した6G5-1、6G5-Pおよび6G5-113Fの活性評価を行った。

(1) バインディングELISA法による抗CD4キメラ抗体のリコンビナントヒトCD4への結合活性評価

バインディングELISAは、実施例2(3)と同様にして行った。1次抗体には実施例6で取得した抗CD4キメラ抗体KM4045~KM4049、および6G5-1、6G5-P、6G5-113Fを、1μg/mLから5倍希釈で段階的に希釈したものをを用いた。結果を図8に示した。

【0192】

その結果、抗CD4キメラ抗体KM4045~KM4049、6G5-1、6G5-Pおよび6G5-113Fは、いずれもリコンビナントヒトCD4に結合した。また、抗CD4キメラ抗体KM4045、KM4046、KM4048およびKM4049は、6G5-1、6G5-Pおよび6G5-113Fよりも、非常に強くリコンビナントCD4に結合した。

(2) ピアコアによる抗CD4キメラ抗体のリコンビナントヒトCD4への結合活性評価

抗CD4キメラ抗体KM4045~KM4049、6G5-1および6G5-PのリコンビナントヒトCD4に対する結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモン共鳴法(SPR法)を用いて結合活性測定を行った。以下の操作は全てBiacore T100(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いて行った。Human Antibody Capture Kit(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用い、添付のプロトコールに従い、抗ヒトIgG抗体をアミンカップリング法によりCM5センサーチップ(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)に固層化した。抗ヒトIgG抗

10

20

30

40

50

体を固層化したチップに測定サンプル（抗CD4キメラ抗体KM4045～KM4049）を添加し、100 RU（resonance ユニット）になるようにキャプチャーさせた。その後、2500ng/mLから5段階に希釈したりコンビナントヒトCD4（R&D社製）を30 μ L/minの速度でチップ上に流し、各濃度におけるセンサーグラムを取得した。装置添付の解析ソフトBiacore T100 Evaluation software（Biacore社製）を用い、1:1バインディングモデルを用いて解析し、各抗体のヒトCD4に対する結合速度定数ka及び解離速度定数kdを算出した。

【0193】

その結果得られた各抗体の結合速度定数ka、解離速度定数kdおよび解離定数 K_D （kd/ka）を表5に示した。

表5に示すように、キメラ抗体KM4045～KM4049はいずれも、既存の抗CD4ヒト抗体6G5-1を上回る高いアフィニティーを示した。

【0194】

【表5】

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)
KM4045	3.60E+05	2.97E-08*	8.24E-14
KM4046	8.34E+05	5.12E-05	6.14E-11
KM4047	1.33E+06	4.88E-04	3.69E-10
KM4048	5.85E+06	3.81E-03	6.51E-10
KM4049	5.77E+06	1.16E-03	2.00E-10
6G5-1	5.95E+05	8.72E-04	1.46E-09

【0195】

*KM4045は解離が遅く、本システムにおける、メーカーが示す解離速度定数kdの測定限界値（ 1×10^{-5} ）を越えていた。

(3) 抗CD4キメラ抗体のヒト血液癌細胞株に対する抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）の評価

ヒトT細胞リンパ腫細胞株に対する抗CD4キメラ抗体KM4045～KM4049、6G5-1、6G5-P、および6G5-113FのADCC活性を、以下に示す方法に従って測定した。

(3)-1 標的細胞懸濁液の調製

ヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALL、HUT78およびT細胞性リンパ芽球性リンパ腫細胞株SUP-T1をPBSで洗浄後、5%透析済みウシ胎児血清（dFBS）（社製）を含むフェノールレッド不含有RPMI1640培地（インビトロジェン社製）（以下、ADCC用培地と記す）で洗浄し、同培地で至適濃度に調製して標的細胞懸濁液とした。

(3)-2 エフェクター細胞懸濁液の調製

末梢血単核球（Peripheral blood mononuclear cell:PBMC）は、健常人末梢血から以下に示した方法により分離した。ヘパリンナトリウム注N「シミズ」（清水製薬社製）を0.5mL加えたシリンジを用いて、健常人から健常人末梢血50mLを採血した。採取した末梢血に同量の生理食塩水（大塚製薬製）を加えて希釈し、良く攪拌した。15mLチューブ（Greiner社製）に4.7mLずつ分注したLymphoprep（Axis-Shield社製）の上に、10mLの希釈末梢血を静かに重層し、2000rpm、ブレーキオフ、室温の条件で20分間遠心分離して、単核球層を分離した。こうして得られた単核球画分を、ADCC用培地を用いて2回洗浄し、同培地により至適な細胞数に調製してエフェクター細胞懸濁液とした。

(3)-3 ADCC活性の測定

CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega社製)を用い、付属の説明書に従い以下の手順で測定した。

【0196】

96ウェルU底プレート(FALCON社製)の各ウェルに、各抗体を2 μ g/mLまたは1 μ g/mLから段階的に20倍希釈した抗体液を50 μ L分注し、次に(3)-1で調製した標的細胞懸濁液を2.5 $\times 10^4$ 細胞/50 μ L/ウェルで分注し、最後に(3)-2で調製したエフェクター細胞懸濁液をは2 $\times 10^5$ 細胞/50 μ L/ウェルで分注して、全量を150 μ Lとし、37 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。よって、エフェクター細胞(E)と標的細胞(T)の比は8で実験を行った。ADCC活性は次式により求めた。結果を図9に示す。

(式)

ADCC活性(%) = { ([検体の吸光度] - [標的細胞自然遊離の吸光度] - [エフェクター細胞自然遊離の吸光度]) / ([標的細胞全遊離の吸光度] - [標的細胞自然遊離の吸光度]) } \times 100

その結果、既存の抗CD4ヒト抗体6G5-1は、ヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALLに対し、ADCC活性が認められなかったが、抗体のFc領域のN結合複合型糖鎖にコアフコースが結合していない6G5-Pおよび6G5-113Fは、高いADCC活性が認められ、かつ6G5-Pおよび6G5-113FのADCC活性はほぼ同等の活性であった(図9A)。この結果は、US7,214,775およびCancer Res 2008;68:(10):3863-72に開示されている結果と一致している。

【0197】

また、本発明の抗CD4キメラ抗体KM4045、KM4046、KM4047、KM4048およびKM4049はいずれも、ヒトT細胞リンパ腫細胞株HUT78およびヒトT細胞リンパ芽球性リンパ腫細胞株SUP-T1に対して、6G5-Pと同等以上の高いADCC活性を有しており(図9B、C)、更に抗CD4キメラ抗体KM4045、KM4046、KM4048およびKM4049はいずれも、ヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALLに対して、6G5-113Fよりも高いADCC活性を有していた(図9D)。

【0198】

以上の結果、本発明の抗CD4キメラ抗体KM4045、KM4046、KM4047、KM4048およびKM4049はいずれも、既存の抗CD4ヒト抗体と同等以上の高いADCC活性を有することが明らかになった。

(4) CD4トランスフェクタントおよびヒトT細胞リンパ腫細胞株に対する抗CD4キメラ抗体の補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)の評価

実施例1で作製したCD4トランスフェクタントおよびヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALLに対する、抗CD4キメラ抗体KM4045~KM4049のCDC活性を、実施例4(3)と同様にして測定した。

【0199】

その結果、既存の抗CD4ヒト抗体6G5-1およびIgG1のFcの一部がIgG3のFcにドメイン交換された113F型のFcを有する6G5-113Fは、CD4トランスフェクタントに対してCDC活性をまったく有していなかったのに対し、本発明の抗CD4キメラ抗体KM4045、KM4046、KM4047、KM4048およびKM4049はいずれも、CDC活性を有していた(図10A)。一方、ヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALLに対しては、IgG1のFcの一部がIgG3のFcにドメイン交換された113F型のFcを有する既存の抗CD4ヒト抗体6G5-113F、既存の抗CD4マウス抗体OKT4および本発明の抗CD4キメラ抗体KM4045、KM4046はいずれもCDC活性を有しておらず、本発明の抗CD4キメラ抗体KM4049のみがヒトT細胞リンパ腫細胞株に対してCDC活性を示した(図10B)。

【実施例8】

【0200】

ヒト化抗体の作製

(1) 抗CD4ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

抗CD4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

初めに、配列番号27~29でそれぞれ表される抗CD4ラットモノクローナル抗体抗体KM4065VHのCDR1~3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列を選択した。配列解析システムとしてGCG Package (Genetics Computer Group社製)を用いて、既存の蛋白質のアミノ酸データベースをBLASTP法(Nucleic Acid Res., 25,

10

20

30

40

50

3389 (1997))により抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065と相同性の高いヒト抗体を検索した。相同性スコアと実際のアミノ酸配列の相同性を比較したところ、SWISSPROTデータベースアクセションナンバーAAC18328、Autoreactivity and immunoglobulin VH gene expression in aging humans (以下、AAC18328と称す)が84.2%を示し、最も相同性の高いヒト抗体であったため、この抗体のFRのアミノ酸配列を選択した。ただしAAC18328のFRアミノ酸配列においては、カバットら[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]により報告されている分泌型抗体のN末端の1アミノ酸残基(1番目)の欠損が認められた。そこで、1番目については、抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065に見られるアミノ酸残基であるGluを選択した。また、11番目のValについては、ヒト抗体の配列において出現頻度が高く、抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065に見られるアミノ酸残基であるLeuへ置換した。これらのアミノ酸残基は、任意のヒト抗体の配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]においても高頻度に認められることから、ヒト抗体配列から逸脱するものではない。

10

【0201】

以上のようにして決定したヒト抗体のFRのアミノ酸配列の適切な位置に配列番号27~29で示した抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065のVHのCDRのアミノ酸配列を移植した。このようにして、配列番号77で表される抗CD4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0を設計した。

次に、抗CD4ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

20

【0202】

配列番号30~32でそれぞれ表される抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065VLのCDR1~3のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ(HSG I~IV)に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]。そこで、ヒト抗体のVLのサブグループI~IVの共通配列のFRのアミノ酸配列と抗CD4ラット抗体KM4065のVLのFRのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

【0203】

相同性を検索した結果、HSGIと72.2%と高い相同性を有していた。

30

以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065のVLのCDRのアミノ酸配列を移植した。しかし、配列番号22に記載の抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065のVLのアミノ酸配列中の24番目のLeu、および128番目のLeuは、カバットらがあげるヒト抗体FRのアミノ酸配列の相当する部位において、最も使用される頻度が高いアミノ酸残基ではないが、比較的高い頻度で使用されるアミノ酸残基であるため、上記の抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065のアミノ酸配列で認められるアミノ酸残基を用いることとした。このようにして、配列番号78で表される抗CD4ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列LV0を設計した。

【0204】

上記で設計した抗CD4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0およびVLのアミノ酸配列LV0は、選択したヒト抗体のFRのアミノ酸配列に抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065のCDRのアミノ酸配列のみを移植した配列である。しかし、一般に、ヒト化抗体を作製する場合には、単なるヒト抗体のFRへのマウス抗体のCDRのアミノ酸配列の移植のみでは結合活性が低下してしまうことが多い。このため、結合活性の低下を回避するため、CDRのアミノ酸配列の移植とともに、ヒト抗体とマウス抗体で異なっているFRのアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基を改変することが行われている。そこで、本実施例でも、結合活性に影響を与えると考えられるFRのアミノ酸残基を以下のようにして同定した。

40

【0205】

まず、上記で設計した抗CD4ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HV0およびVLのアミノ酸配列

50

LV0よりなる抗体V領域（HV0LV0）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェアAbM（Oxford Molecular社製）を、三次元構造の表示についてはソフトウェアPro-Explore（Oxford Molecular社製）、あるいはViewerLite（Accelrys社製）を用いてそれぞれ添付の使用説明書に従い、行った。また、抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065のV領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HV0LV0のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、抗CD4ラット抗体KM4065と異なっているアミノ酸残基を選択し、抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065のアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列を作製し、同様に三次元構造モデルを構築した。これら作製した抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065、HV0LV0および改変体のV領域の三次元構造を比較し、抗体の結合活性に影響を与えると予測されるアミノ酸残基を

10

【0206】

その結果、HV0LV0のFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、HV0では18番目のLeu、93番目のVal、97番目のAla、および114番目のThrを、LV0では13番目のAla、15番目のVal、19番目のVal、47番目のAla、62番目のVal、および82番目のLeuをそれぞれ選択した。これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上のアミノ酸配列を抗CD4ラットモノクローナル抗体KM4065の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト化抗体のVHおよびVLを設計した。具体的には、抗体VHについては、配列番号77で表されるアミノ酸配列の18番目のLeuをMetに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および114番目のThrをIleに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。また、VLについては、配列番号78で表されるアミノ酸配列の13番目のAlaをValに、15番目のValをLeuに、19番目のValをAlaに、47番目のAlaをGlnに、62番目のValをIleに、および82番目のLeuをValに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。

20

【0207】

HV0LV0のFRに存在する、少なくとも1つのアミノ酸残基を改変したHV2LV0、HV3LV0、HV4LV0およびHV4LV6の可変領域のアミノ酸配列を設計し、H鎖可変領域HV2、HV3、HV4およびL鎖可変領域LV6のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号96、98、100および102に示した。

(2) 抗CD4ヒト化抗体の作製および評価

抗CD4ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードするDNAは、抗CD4モノクローナルラット抗体KM4065のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNAで用いられているコドンを利用し、アミノ酸改変を行う場合は、哺乳動物細胞で高頻度で使用されるコドンを用いて、作製した。抗CD4ヒト化抗体のHV0およびLV0のアミノ酸配列をコードするDNA配列を配列番号93、94にそれぞれ示し、またアミノ酸改変を行った可変領域HV2、HV3、HV4およびLV6のアミノ酸配列をコードするDNA配列を、配列番号95、97、99および101にそれぞれ示した。各DNA配列は全合成により作製した。以下は、実施例6と同様にして、各可変領域をコードする全合成DNAを、ヒト化抗体発現ベクターpKANTEX93に挿入して、抗CD4ヒト化抗体発現ベクターを作製した。作製した抗CD4ヒト化抗体発現ベクターを動物細胞に導入しヒト化抗体を発現させ、抗CD4ヒト化抗体HV0LV0、HV2LV0、HV3LV0、HV4LV0およびHV4LV6を作製した。

30

40

【0208】

取得した抗CD4ヒト化抗体の結合活性をBiacore T100を用いて、抗体の結合活性を測定した結果、作製した抗CD4ヒト化抗体HV2LV0、HV3LV0、HV4LV0およびHV4LV6はいずれも、抗CD4キメラ抗体KM4045と同等または1/2以上の結合活性であった。よって、高い結合活性を有する抗CD4ヒト化抗体が作製された。

【実施例9】

【0209】

ヒト化抗体の結合活性評価

実施例8に記載の方法で作製した抗CD4ヒト化抗体HV0LV0、HV2LV0、HV3LV0、HV4LV0およびHV4LV6の結合活性評価を行った。

50

(1) ビアコアによる抗CD4ヒト化抗体のリコンビナントヒトCD4への結合活性評価
実施例7(2)に記載の方法で測定した。その結果得られた各抗体の結合速度定数ka、解離速度定数kdおよび解離定数KD(kd/ka)を表6に示した。

【0210】

その結果、ヒト化抗体HV0LV0、HV2LV0、HV3LV0、HV4LV0、HV4LV6は 1×10^{-10} M以上の非常に強い結合活性を保持していた。これはキメラ抗体KM4045と同等の結合活性であり、6G5-1を上回っていた。

【0211】

【表6】

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
KM4045	$5.41E+05$	$< 1E-05^*$	$< 1.84E-11^*$
HV0LV0	$1.47E+06$	$2.86E-05$	$1.95E-11$
HV2LV0	$1.14E+06$	$< 1E-05^*$	$< 8.77E-12^*$
HV3LV0	$1.33E+06$	$< 1E-05^*$	$< 7.52E-12^*$
HV4LV0	$7.91E+05$	$< 1E-05^*$	$< 1.26E-11^*$
LV4LV6	$4.03E+05$	$< 1E-05^*$	$< 2.48E-11^*$
6G5-1	$5.34E+05$	$8.24E-04$	$1.54E-09$

【0212】

* KM4045、HV2LV0、HV3LV0、HV4LV0、HV4LV6は解離が遅く、本システムにおける、メーカーが示す解離速度定数kdの測定限界値(1×10^{-5})を越えていた。

(2) フローサイトメーターを用いたCD4陽性T細胞リンパ腫細胞株への結合活性の評価

各種抗CD4抗体の細胞への反応性を評価した。抗体としては、キメラ抗体KM4045、ヒト化抗体HV0LV0、HV2LV0、HV3LV0、HV4LV0、HV4LV6、ヒト抗体6G5-1、6G5-Pを用いた。

【0213】

$1 \sim 5 \times 10^5$ 細胞のヒトT細胞リンパ腫細胞株HPB-ALLに、被検抗体の非特異的な結合を阻害するためヒトIgG(シグマ社製)を終濃度1mg/mLで添加し、更に各種抗CD4抗体をBSA-PBSで適宜希釈して添加し、全量を50 μ Lとした。これらの細胞懸濁液を氷上で90分間反応させた後、BSA-PBSを用いて細胞を2回洗浄した。該細胞に、BSA-PBSで希釈調製したFITC標識抗ヒトIgG Fc抗体(Acris社製)を50 μ L添加し、氷上で90分間反応させた。BSA-PBSで細胞を1回洗浄した後、細胞をBSA-PBSに懸濁して、フローサイトメーター(ベックマン・コールター社製)を用いて、蛍光強度を測定した。図11に、上記抗体を6.7、0.67および0.067 μ g/mLで反応させた場合の平均蛍光強度(MFI値)を示す。抗CD4ヒト化抗体は、いずれも抗体濃度依存的にCD4陽性細胞株へ結合し、その程度はキメラ抗体KM4045と同等であった。

【実施例10】

【0214】

ヒト化抗体HV2LV0のin vitro薬効評価

実施例8で作製した抗CD4ヒト化抗体HV2LV0を、以後KM8045とする。抗CD4ヒト化抗体のヒト血液癌細胞株に対する抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)の評価を、実施例7(3)に記載の方法で行った。標的細胞にはヒトT細胞リンパ腫細胞株であるHPB-ALL、HUT78、CCRF-CEMの3種類を用いた。また、抗体はヒト化抗体KM8045、キメラ抗体KM4045、ヒト抗体6G5-1および6G5-Pを用いた。

【0215】

その結果、ヒト化抗体KM8045はいずれの細胞株に対してもキメラ抗体KM4045と同等の高いADCC活性を示し、また6G5-Pと同等以上のADCC活性を示した。6G5-1は、HPB-ALLおよびHUT78に対しては弱いADCC活性しか示さず、CCRF-CEMに対してはADCC活性を示さなかった(図12)。

【実施例11】

10

20

30

40

50

【 0 2 1 6 】

ヒト化抗体KM8045のin vivo薬効評価

(1) ヒトT細胞リンパ腫細胞株HHを標的としたマウス初期癌モデル

In vitroで培養したヒトT細胞リンパ腫細胞株HHを 1×10^8 個/mLでRPMI1640培地 (Gibco BRL) に懸濁し、SCIDマウス (日本クレア、雄、8週齢) の右側腹側部皮下に100 μ L移植した (1×10^7 個/mouse)。抗CD4ヒト化抗体KM8045または抗CD4ヒト抗体6G5-Pを、1 μ g/100 μ L/headになるように希釈し、Day0、3、5に、計3回静脈内投与した。陰性対照群はPBSのみを投与した。腫瘍を移植した日をDay0とし、経日的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、次式より腫瘍体積を算出した。

腫瘍体積 = 短径 × 短径 × 長径 × 0.5

各群の腫瘍体積の平均値の経日的推移を図13に示す。図13に示すように、6G5-P投与群では、陰性対照群と比べて弱い抗腫瘍効果しか観察されなかったが、KM8045投与群では顕著な抗腫瘍効果が観察された。

【 0 2 1 7 】

以上より、HH細胞を標的としたマウス初期癌モデルにおいて、抗CD4ヒト化抗体KM8045は6G5-Pよりも強い抗腫瘍効果を有することが明らかになった。

(2) CD4発現EL4を標的としたマウス転移モデル

実施例1(3)で作製したCD4/EL4をin vitroで培養し、 1×10^6 個/mLでRPMI1640培地 (Gibco BRL) に懸濁した細胞懸濁液を、C57BL/6マウス (日本クレア、雄、8週齢) の尾静脈内に100 μ L/head移植した (1×10^5 個/head)。腫瘍を移植した日をDay0とし、Day1に抗CD4ヒト化抗体KM8045、抗CD4ヒト抗体6G5-P、6G5-1を、0.2 μ g/100 μ L/headおよび2 μ g/100 μ L/headになるようにそれぞれ調製し、100 μ L/headで静脈内投与した。陰性対照群はPBSのみ、またはアイソタイプコントロール抗体を投与した。Day14に全てのマウスの体重を測定し、エーテル麻酔下、放血を行った後に頸椎脱臼して安楽死させた。その後、肝臓および腎臓を摘出して重量を測定し、各個体の体重に対する肝臓および腎臓重量の割合 (以降、肝臓重量比率および腎臓重量比率と称する) を百分率で算出した。抗腫瘍効果の評価は、同時に測定した腫瘍を移植していない健康なマウスの肝臓および腎臓重量比率 (3匹の平均値) に対し、腫瘍細胞の転移によって増加した各群の肝臓および腎臓重量比率を比較することにより行った。

【 0 2 1 8 】

各群の肝臓重量比率を図14(A)、腎臓重量比率を図14(B)に示す。図14(A)、(B)に示すように、6G5-1投与群においては陰性対照群に対して抗腫瘍効果は全く見られなかったのに対し、6G5-P投与群およびKM8045投与群においては抗腫瘍効果が観察された。さらに6G5-P投与群よりKM8045投与群において強い抗腫瘍効果が認められた。

以上より、CD4/EL4を標的としたマウス転移モデルにおいて、KM8045は6G5-1および6G5-Pよりも強い抗腫瘍効果を有することが明らかになった。

(3) ヒトT細胞リンパ腫細胞株HHを標的としたマウス進行癌モデル

実施例11(3)と同様に、in vitroで培養したHH細胞株を 1×10^8 個/mLでRPMI1640培地 (Gibco BRL) に懸濁し、SCIDマウス (日本クレア、雄、8週齢) の右側腹側部皮下に100 μ L/head移植した (1×10^7 個/head)。腫瘍体積が平均60mm³になったDay6に群分けを行い、抗CD4ヒト化抗体KM8045を20、100、200 μ g/100 μ L/headになるようにPBSで希釈し、1週間に2回、計6回静脈内投与した。陰性対照群はPBSのみを投与した。腫瘍を移植した日をDay0とし、経日的にノギスによる腫瘍径の測定を行い、次式より腫瘍体積を算出した。

【 0 2 1 9 】

腫瘍体積 = 短径 × 短径 × 長径 × 0.5

各群の腫瘍体積の平均値の経日的推移を図15に示す。図15に示したように、KM8045投与群において抗腫瘍効果が観察され、20 μ g/headおよび100 μ g/head群よりも200 μ g/head群で強い抗腫瘍効果が認められたことから、用量依存的な抗腫瘍効果が確認された。

以上より、抗CD4ヒト化抗体KM8045はHH細胞を標的とした進行癌モデルにおいても抗腫

10

20

30

40

50

瘍効果を有することが明らかになった。

【産業上の利用可能性】

【0220】

本発明によれば、CD4の細胞外領域を特異的に認識し、該細胞外領域に高いアフィニティで結合し、かつ高いADCC活性またはCDC活性を発揮するモノクローナル抗体またはその抗体断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含んでなるベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体またはその抗体断片の製造方法、該抗体またはその抗体断片を用いる治療薬、および該抗体またはその抗体断片を用いる診断薬を提供することができる。

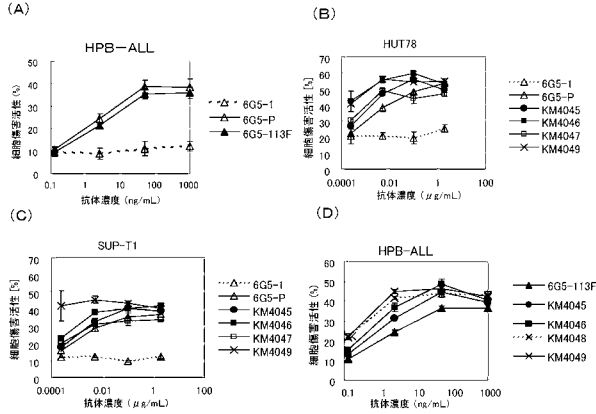
【配列表フリーテキスト】

【0221】

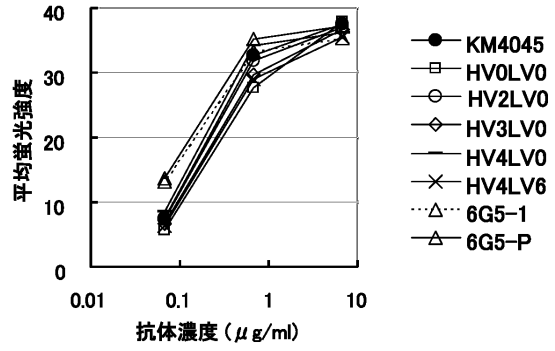
配列番号27 : KM4065	HCDR1			
配列番号28 : KM4065	HCDR2			
配列番号29 : KM4065	HCDR3			
配列番号30 : KM4065	LCDR1			
配列番号31 : KM4065	LCDR2			
配列番号32 : KM4065	LCDR3			
配列番号33 : KM4066	HCDR1			
配列番号34 : KM4066	HCDR2			
配列番号35 : KM4066	HCDR3			20
配列番号36 : KM4066	LCDR1			
配列番号37 : KM4066	LCDR2			
配列番号38 : KM4066	LCDR3			
配列番号39 : KM4067	HCDR1			
配列番号40 : KM4067	HCDR2			
配列番号41 : KM4067	HCDR3			
配列番号42 : KM4067	LCDR1			
配列番号43 : KM4067	LCDR2			
配列番号44 : KM4067	LCDR3			
配列番号45 : KM4068	HCDR1			30
配列番号46 : KM4068	HCDR2			
配列番号47 : KM4068	HCDR3			
配列番号48 : KM4068	LCDR1			
配列番号49 : KM4068	LCDR2			
配列番号50 : KM4068	LCDR3			
配列番号51 : KM4069	HCDR1			
配列番号52 : KM4069	HCDR2			
配列番号53 : KM4069	HCDR3			
配列番号54 : KM4069	LCDR1			
配列番号55 : KM4069	LCDR2			40
配列番号56 : KM4069	LCDR3			
配列番号57 : KM4065VH	キメラ	プライマー1		
配列番号58 : KM4065VH	キメラ	プライマー2		
配列番号59 : KM4065VL	キメラ	プライマー1		
配列番号60 : KM4065VL	キメラ	プライマー2		
配列番号61 : KM4066VH	キメラ	プライマー1		
配列番号62 : KM4066VH	キメラ	プライマー2		
配列番号63 : KM4066VL	キメラ	プライマー1		
配列番号64 : KM4066VL	キメラ	プライマー2		
配列番号65 : KM4067VH	キメラ	プライマー1		50

配列番号66 : KM4067VH	キメラ	プライマー-2	
配列番号67 : KM4067VL	キメラ	プライマー-1	
配列番号68 : KM4067VL	キメラ	プライマー-2	
配列番号69 : KM4068VH	キメラ	プライマー-1	
配列番号70 : KM4068VH	キメラ	プライマー-2	
配列番号71 : KM4068VL	キメラ	プライマー-1	
配列番号72 : KM4068VL	キメラ	プライマー-2	
配列番号73 : KM4069VH	キメラ	プライマー-1	
配列番号74 : KM4069VH	キメラ	プライマー-2	
配列番号75 : KM4069VL	キメラ	プライマー-1	10
配列番号76 : KM4069VL	キメラ	プライマー-2	
配列番号77 : KM4065	HV0	アミノ酸配列	
配列番号78 : KM4065	LV0	アミノ酸配列	
配列番号79 : CD4発現ベクターのプライマー-1			
配列番号80 : CD4発現ベクターのプライマー-2			
配列番号81 : CD4-Fc発現ベクターのプライマー-1			
配列番号82 : CD4-Fc発現ベクターのプライマー-2			
配列番号83 : 6G5VLのプライマー-1			
配列番号84 : 6G5VLのプライマー-2			
配列番号85 : 6G5VLのプライマー-3			20
配列番号86 : 6G5VLのプライマー-4			
配列番号87 : 6G5VLのプライマー-5			
配列番号88 : 6G5VLのプライマー-6			
配列番号89 : 6G5VHのプライマー-1			
配列番号90 : 6G5VHのプライマー-2			
配列番号91 : 6G5VHのプライマー-3			
配列番号92 : 6G5VHのプライマー-4			
配列番号93 : KM4065	HV0	DNA配列	
配列番号94 : KM4065	LV0	DNA配列	
配列番号95 : HV2		DNA配列	30
配列番号96 : HV2		アミノ酸配列	
配列番号97 : HV3		DNA配列	
配列番号98 : HV3		アミノ酸	
配列番号99 : HV4		DNA配列	
配列番号100 : HV4		アミノ酸	
配列番号101 : LV6		DNA配列	
配列番号102 : LV6		アミノ酸	

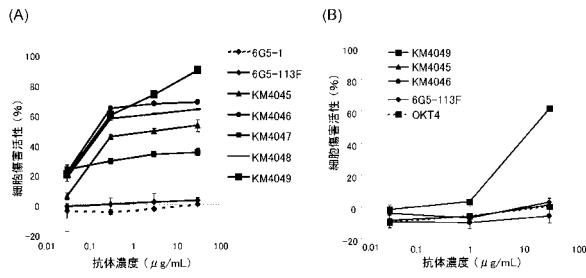
【 図 9 】



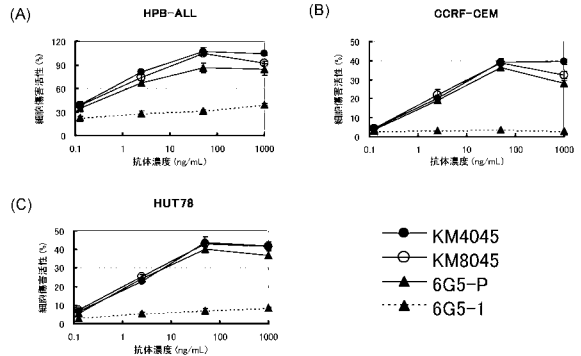
【 図 1 1 】



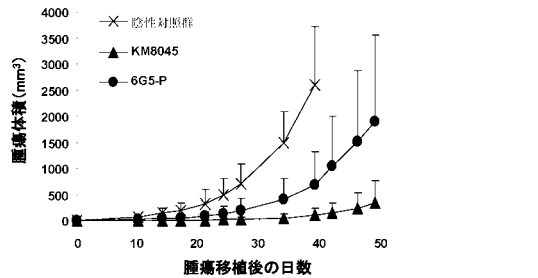
【 図 1 0 】



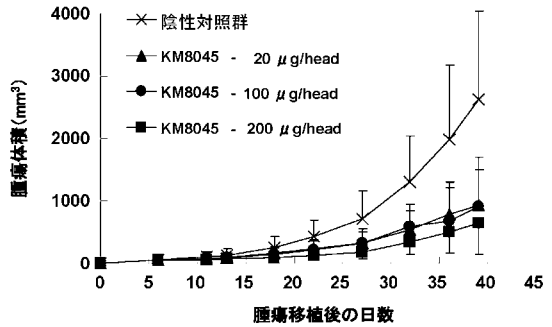
【 図 1 2 】



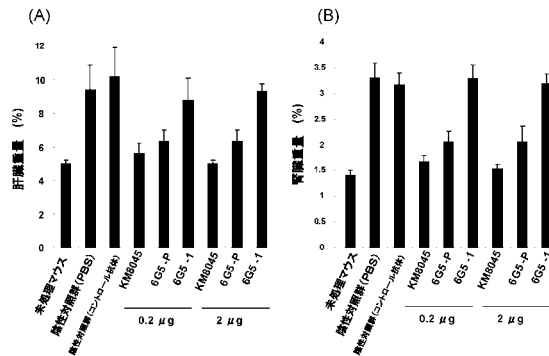
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【 図 1 4 】



【配列表】

0005511686000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00 1 0 1</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53 (2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53 V</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/531 (2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/531 A</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/574 (2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/574 D</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395 (2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/574 B</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395 N</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/02 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>35/00</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08 (2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>37/02</i>
		<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08</i>
		<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395 G</i>

- (72)発明者 丹羽 倫平
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内
- (72)発明者 久保田 麗夫
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内
- (72)発明者 榎田 和宏
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内
- (72)発明者 中村 和靖
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第07/011041(WO, A1)
Biotechnology, (1992), 10, [11], p.1455-1460

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00 - 15/90
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
PubMed

专利名称(译)	抗CD4抗体		
公开(公告)号	JP5511686B2	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	JP2010544182	申请日	2009-12-25
申请(专利权)人(译)	协和発酵キリン株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和発酵キリン株式会社		
[标]发明人	中川 知明 堀 紗也香 丹羽 倫平 久保田 麗夫 榊田 和宏 中村 和靖		
发明人	中川 知明 堀 紗也香 丹羽 倫平 久保田 麗夫 榊田 和宏 中村 和靖		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/46 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/574 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08		
CPC分类号	C07K16/2812 A61K2039/505 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/72 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/92 C07K2319/30 G01N2333/70514		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K16/46 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 G01N33/53.V G01N33/531.A G01N33/574.D G01N33/574.B A61K39/395.N A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61K39/395.G		
代理人(译)	山崎 朋子		
优先权	2008331904 2008-12-26 JP		
其他公开文献	JPWO2010074266A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

对于涉及CD4表达细胞的疾病，CD4以高亲和力结合CD4并具有效应活性，例如抗体依赖性细胞毒性（ADCC活性）或高补体依赖性细胞毒性（CDC活性）需要高抗CD4抗体。根据本发明，特异性识别CD4细胞外结构域的单克隆抗体或其抗体片段以高亲和力结合细胞外结构域，并发挥高ADCC活性或CDC活性，并产生抗体杂交瘤，编码抗体的DNA，包含DNA的载体，通过导入载体获得的转化体，使用杂交瘤或转化体产生抗体或抗体片段的方法，抗体或者，可以提供使用抗体片段的治疗剂和使用该抗体或其抗体片段的诊断剂。

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
KM4045	$5.41E+05$	$< 1E-05^*$	$< 1.84E-11^*$
HV0LV0	$1.47E+06$	$2.86E-05$	$1.95E-11$
HV2LV0	$1.14E+06$	$< 1E-05^*$	$< 8.77E-12^*$
HV3LV0	$1.33E+06$	$< 1E-05^*$	$< 7.52E-12^*$
HV4LV0	$7.91E+05$	$< 1E-05^*$	$< 1.26E-11^*$
LV4LV6	$4.03E+05$	$< 1E-05^*$	$< 2.48E-11^*$
6G5-1	$5.34E+05$	$8.24E-04$	$1.54E-09$