

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-515430

(P2008-515430A)

(43) 公表日 平成20年5月15日 (2008.5.15)

|                                     |                       |             |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                       | F I                   | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>      | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4   |
| <b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>       | C 1 2 N 5/00 B        | 4 B O 6 3   |
| <b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>       | C 1 2 Q 1/68 A        | 4 B O 6 4   |
| <b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>      | C 1 2 P 21/08         | 4 B O 6 5   |
| <b>C O 7 K 16/18 (2006.01)</b>      | C O 7 K 16/18         | 4 C O 8 5   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く |                       |             |

|               |                              |          |                       |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2007-535779 (P2007-535779) | (71) 出願人 | 507393469             |
| (86) (22) 出願日 | 平成17年10月5日 (2005.10.5)       |          | エラン ファーマ インターナショナル    |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成19年4月5日 (2007.4.5)         |          | リミテッド                 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2005/035854            |          | アイルランド共和国 カントリー ウェス   |
| (87) 国際公開番号   | W02006/041934                |          | トミーズ アスローン モンクスランド    |
| (87) 国際公開日    | 平成18年4月20日 (2006.4.20)       | (71) 出願人 | 598014180             |
| (31) 優先権主張番号  | 60/616,474                   |          | ワイス                   |
| (32) 優先日      | 平成16年10月5日 (2004.10.5)       |          | アメリカ合衆国ニュージャージー州079   |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 40マデイソン・ファイブジラルダファームス |
|               |                              | (74) 代理人 | 100092783             |
|               |                              |          | 弁理士 小林 浩              |
|               |                              | (74) 代理人 | 100095360             |
|               |                              |          | 弁理士 片山 英二             |
| 最終頁に続く        |                              |          |                       |

(54) 【発明の名称】 組換えタンパク質製造を改良するための方法および組成物

## (57) 【要約】

組換えタンパク質発現、例えば A  $\beta$  ペプチド結合抗体の発現を高め、かつ / または誤ってスプライスされたおよび / 若しくはイントロンリードスルー ( I R T ) 副生成物を減少若しくは排除するように改変された核酸分子が開示される。本発明はまた、組換えの A  $\beta$  ペプチド結合抗体の発現に適する細胞培養条件下でのこうした核酸分子の発現による、誤ってスプライスされたおよび / 若しくはイントロンリードスルー副生成物を欠く A  $\beta$  ペプチド結合抗体の製造方法も提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

天然に存在するゲノム配列に比較して最低 1 個のイントロン配列が誤ってスプライスされた若しくはイントロンリードスルー ( I R T ) 副生成物を減少させるように欠失されている、1 個若しくはそれ以上のイントロンおよびエキソン配列を有するヌクレオチド配列を含んでなる、A  $\beta$  抗体鎖をコードする核酸分子。

**【請求項 2】**

天然に存在するゲノム配列に比較して最低 1 個のイントロン配列がタンパク質発現を高めるように欠失されている、1 個若しくはそれ以上のイントロンおよびエキソン配列を含んでなるヌクレオチド配列を含んでなる、A  $\beta$  抗体鎖をコードする核酸分子。

10

**【請求項 3】**

最低 3 個のイントロン配列が欠失されている、請求項 1 若しくは 2 に記載の核酸分子。

**【請求項 4】**

抗体鎖が H 鎖若しくはそのフラグメントである、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸分子。

**【請求項 5】**

抗体 H 鎖若しくはそのフラグメントが、ヒト免疫グロブリン G サブタイプの H 鎖可変領域、ヒンジ領域、第一の定常領域 ( C H 1 )、第二の定常領域 ( C H 2 ) および第三の定常領域 ( C H 3 ) を含んでなる、請求項 4 に記載の核酸分子。

**【請求項 6】**

免疫グロブリン G サブタイプがヒト I g G 1 若しくはヒト I g G 4 である、請求項 5 に記載の核酸分子。

20

**【請求項 7】**

ヒト I g G 1 若しくはヒト I g G 4 が変異されている、請求項 6 に記載の核酸分子。

**【請求項 8】**

免疫グロブリン H 鎖定常領域の C H 2 領域と C H 3 領域の間のイントロンが欠失されている、請求項 5 に記載の核酸分子。

**【請求項 9】**

C H 1 領域とヒンジ領域の間のイントロンの欠失をさらに含んでなる、請求項 8 に記載の核酸分子。

30

**【請求項 10】**

ヒンジ領域と C H 2 領域の間のイントロンの欠失をさらに含んでなる、請求項 8 に記載の核酸分子。

**【請求項 11】**

H 鎖可変領域と C H 1 領域の間の 1 個のイントロンを含んでなる H 鎖を有する、請求項 5 に記載の核酸分子。

**【請求項 12】**

H 鎖ヒンジ領域、ならびに第一、第二および第三の定常領域をコードするヌクレオチド配列が、図 8 に示されるヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 ) に最低 95 % 同一の配列を含んでなる、請求項 5 に記載の核酸分子。

40

**【請求項 13】**

H 鎖ヒンジ領域、ならびに第一、第二および第三の定常領域をコードするヌクレオチド配列が、図 9 に示されるヌクレオチド配列 ( 配列番号 3 ) に最低 95 % 同一の配列を含んでなる、請求項 5 に記載の核酸分子。

**【請求項 14】**

C H 2 と C H 3 の間のイントロンの欠失が、図 8 ( 配列番号 1 ) に示されるところのヒト I g G 1 のほぼヌクレオチド 1409 ないし 1505 に対応する、請求項 8 に記載の核酸分子。

**【請求項 15】**

C H 2 と C H 3 の間のイントロンの欠失が、図 9 ( 配列番号 3 ) に示されるところのヒ

50

ト I g G 4 のほぼヌクレオチド 1 4 0 1 ないし 1 4 9 7 に対応する、請求項 8 に記載の核酸分子。

【請求項 1 6】

C H 1 とヒンジ領域の間のイントロンの欠失が、図 8 (配列番号 1) に示されるところのヒト I g G 1 のほぼヌクレオチド 5 2 5 ないし 9 1 5 に対応する、請求項 9 に記載の核酸分子。

【請求項 1 7】

C H 1 とヒンジ領域の間のイントロンの欠失が、図 9 (配列番号 3) に示されるところのヒト I g G 4 のほぼヌクレオチド 5 2 5 ないし 9 1 6 に対応する、請求項 9 に記載の核酸分子。

10

【請求項 1 8】

ヒンジ領域と C H 2 の間のイントロンの欠失が、図 8 (配列番号 1) に示されるところのヒト I g G 1 のほぼヌクレオチド 9 6 1 ないし 1 0 7 8 に対応する、請求項 1 0 に記載の核酸分子。

【請求項 1 9】

ヒンジ領域と C H 2 の間のイントロンの欠失が、図 9 (配列番号 3) に示されるところのヒト I g G 4 のほぼヌクレオチド 9 5 3 ないし 1 0 7 0 に対応する、請求項 1 0 に記載の核酸分子。

【請求項 2 0】

ヒト I g G 1 をコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子であって、前記ヌクレオチド配列が、図 1 0 に示される配列 (配列番号 5) に最低 9 0 % 同一である、上記分子。

20

【請求項 2 1】

ヒト I g G 4 をコードするヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子であって、前記ヌクレオチド配列が、図 1 1 に示される配列 (配列番号 6) に最低 9 0 % 同一である、上記分子。

【請求項 2 2】

ヒト H 鎖定常領域若しくはその変異された形態をコードするゲノムヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチド配列が、天然に存在するゲノム配列中に存在する最低 1 個のイントロンを欠いており、かつ、前記イントロンがイントロンリードスルーを助長する、上記配列。

30

【請求項 2 3】

ヒト I g G 1 若しくはその変異された形態をコードするゲノムヌクレオチド配列であって、前記ヌクレオチド配列が、天然に存在するゲノム配列中に存在する最低 1 個のイントロンを欠いており、かつ、前記イントロンがイントロンリードスルーを助長する、上記配列。

【請求項 2 4】

最低 1 個のイントロンが、定常領域の C H 2 と C H 3 の間のイントロンである、請求項 2 2 若しくは 2 3 のいずれかに記載のヌクレオチド配列。

【請求項 2 5】

ヒト I g G 4 若しくはその変異された形態をコードするゲノムヌクレオチド配列であって、前記ゲノム配列が、天然に存在するゲノム配列中に存在する 3 個のイントロンを欠いている、上記配列。

40

【請求項 2 6】

イントロンが、C H 1 とヒンジ領域の間のイントロン、ヒンジ領域と C H 2 の間のイントロン、および C H 2 と C H 3 の間のイントロンである、請求項 2 5 に記載のヌクレオチド配列。

【請求項 2 7】

式：

$V_H - Int1 - C_H1 - Int2 - Hinge - Int3 - C_H2 - C_H3$

50

式中、 $V_H$  は H 鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列であり；  
 $C_H 1$ 、 $C_H 2$  および  $C_H 3$  は対応する H 鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列であり；  
 $Hinge$  は H 鎖定常領域のヒンジ領域をコードするヌクレオチド配列であり；ならびに  
 $Int 1$ 、 $Int 2$  および  $Int 3$  は H 鎖ゲノム配列からのイントロンである、  
により表されるヌクレオチド配列を含んでなる、 $A\beta$  ペプチドを選択的に結合する抗体を  
コードする核酸分子。

【請求項 28】

ヌクレオチド配列がヒト免疫グロブリン G H 鎖をコードする、請求項 27 に記載の核酸分子。

10

【請求項 29】

式：

$V_H - Int 1 - C_H 1 - Hinge - C_H 2 - C_H 3$

式中、 $V_H$  は H 鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列であり；  
 $C_H 1$ 、 $C_H 2$  および  $C_H 3$  は対応する H 鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列であり；  
 $Hinge$  は H 鎖定常領域のヒンジ領域をコードするヌクレオチド配列であり；ならびに  
 $Int 1$  は H 鎖ゲノム配列からのイントロンである、  
により表されるヌクレオチド配列を含んでなる、 $A\beta$  ペプチドを選択的に結合する抗体を  
コードする核酸分子。

20

【請求項 30】

ヌクレオチド配列がヒト免疫グロブリン G H 鎖をコードする、請求項 29 に記載の核酸分子。

【請求項 31】

請求項 5 に記載の核酸分子を含んでなる発現カセット。

【請求項 32】

請求項 5 に記載の核酸分子を含んでなる発現ベクター。

【請求項 33】

宿主細胞中での複製、選択、mRNA 転写、mRNA の安定性、タンパク質発現若しくはタンパク質分泌を高める 1 種若しくはそれ以上のヌクレオチド配列をさらに含んでなる、請求項 32 に記載の発現ベクター。

30

【請求項 34】

請求項 5 に記載の核酸分子を含んでなる宿主細胞。

【請求項 35】

請求項 31 に記載の発現カセットを含んでなる宿主細胞。

【請求項 36】

請求項 32 に記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 37】

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項 36 に記載の宿主細胞。

【請求項 38】

請求項 5 に記載の核酸分子を哺乳動物宿主細胞に導入すること；  
該組換え抗体若しくはそのフラグメントの発現を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養して、それにより宿主細胞の培養物を生じさせること；および  
宿主細胞の培養物から組換え抗体若しくはそのフラグメントを得ること  
を含んでなる、 $A\beta$  ペプチドを選択的に結合しかつイントロンリードスルー (IRT) 生成物を実質的に含まない組換え抗体若しくはそのフラグメントの発現方法。

40

【請求項 39】

宿主細胞からの核酸サンプル中の IRT 生成物を同定する段階をさらに含んでなる、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

50

同定段階が、

宿主細胞の培養物から核酸サンプルを得ること；

核酸サンプルと、イントロンおよび隣接エキソン配列に相補的な核酸プローブの間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、前記核酸サンプルを該プローブと接触させること；

生じる複合体を検出することであって、イントロン配列に相補的な核酸プローブを使用し、前記サンプル中の複合体の検出が、I T R生成物の存在を暗示する、を含んでなる、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記宿主細胞が、L鎖可変領域および定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 38 に記載の方法。

10

【請求項 42】

請求項 5 に記載の核酸分子を哺乳動物宿主細胞に導入すること；

組換え抗体の発現を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養して、それにより宿主細胞の培養物を生じさせること；および

宿主細胞の培養物から組換え抗体を得ること

を含んでなる、Aβペプチドを選択的に結合する組換え抗体若しくはそのフラグメントの発現を高める方法。

【請求項 43】

前記宿主細胞が、L鎖可変領域および定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 42 に記載の方法。

20

【請求項 44】

請求項 5 に記載の核酸分子、および Aβペプチドを選択的に結合する抗体の抗体 L鎖をコードする核酸を含んでなる哺乳動物宿主細胞を、HおよびL鎖が発現されるような条件下で培養すること

を含んでなる、Aβペプチドを選択的に結合しかつイントロンリードスルー（I R T）H鎖副生成物を実質的に欠く組換え抗体若しくはそのフラグメントの製造方法。

【請求項 45】

培養物からHおよびL鎖を精製することをさらに含んでなる、請求項 44 に記載の方法。

30

【請求項 46】

請求項 5 に記載の核酸分子、および Aβペプチドを選択的に結合する抗体の抗体 L鎖をコードする核酸を含んでなる哺乳動物宿主細胞を、HおよびL鎖が発現されるような条件下で培養すること

を含んでなる、Aβペプチドを選択的に結合する組換え抗体若しくはそのフラグメントの発現を高める方法。

【請求項 47】

培養物からHおよびL鎖を精製することをさらに含んでなる、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

核酸サンプルを組換え細胞から得ること；

該核酸サンプルならびにイントロンおよび隣接エキソン配列に相補的な核酸プローブのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、前記核酸サンプルを該プローブと接触させること；

生じる複合体を検出することであって、イントロン配列に相補的な核酸プローブを使用し、前記サンプル中の複合体の検出が、I R T生成物の存在を暗示する、

を含んでなる、サンプル中の I R T生成物の検出方法。

【請求項 49】

抗体若しくはフラグメントの発現および集成を可能にするのに適する条件下で、請求項 40 に記載の段階を含んでなる方法により作成された、Aβペプチドを選択的に結合する

40

抗体若しくはその抗原結合フラグメント。

【請求項 50】

キメラ、ヒト化、CDR 移植若しくは *in vitro* で生成された抗体である、請求項 49 に記載の抗体。

【請求項 51】

ヒト化抗体である、請求項 50 に記載の抗体。

【請求項 52】

ヒト 5 T 4 に結合する、請求項 51 に記載の抗体。

【請求項 53】

請求項 49 に記載の抗体および製薬学的に許容できる担体を含んでなる製薬学的組成物 10

【請求項 54】

改変された効果的に関連付けられているヒトゲノムイントロンおよびエキソン配列を含んでなり、該イントロンおよびエキソン配列の天然の効果的関連の改変が、イントロンリードスルー H 鎖副生成物の発現を減少若しくは排除する、A $\beta$  ペプチドを選択的に結合する抗体 H 鎖をコードする単離された核酸分子。

【請求項 55】

前記 H 鎖の発現が、天然の効果的関連にあるヒトゲノムイントロンおよびエキソン配列を含んでなる核酸分子に関して高められる、請求項 54 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 56】

ゲノムエキソン配列が、可変領域、ヒンジ領域、ならびに第一、第二および第三の定常領域をコードする、請求項 55 に記載の核酸分子。 20

【請求項 57】

第一、第二および第三の定常領域が IgG1 定常領域である、請求項 56 に記載の核酸分子。

【請求項 58】

第一、第二および第三の定常領域が IgG4 定常領域である、請求項 56 に記載の核酸分子。

【請求項 59】

可変領域がヒト化可変領域である、請求項 56 に記載の核酸分子。 30

【請求項 60】

可変領域が A $\beta$  ペプチドに特異的に結合する、請求項 56 ~ 59 に記載の核酸分子。

【請求項 61】

可変領域が、マウス 3 D 6 抗体からの相補性決定領域 (CDR) を含んでなる、請求項 56 ~ 59 に記載の核酸分子。

【請求項 62】

1 個のイントロン配列を含んでなる、請求項 54 に記載の核酸分子。

【請求項 63】

2 個のイントロン配列を含んでなる、請求項 54 に記載の核酸分子。

【請求項 64】

3 個のイントロン配列を含んでなる、請求項 54 に記載の核酸分子。 40

【請求項 65】

第一、第二および第三の定常領域をコードするエキソンに作動可能に連結された可変領域をコードするエキソンを含んでなる、A $\beta$  ペプチド結合抗体の H 鎖をコードする核酸分子であって、前記核酸分子は最低 1 個のイントロン配列をさらに含んでなり、前記イントロン配列は、前記イントロンを含まない A $\beta$  ペプチド結合抗体の H 鎖をコードする核酸分子に関して、前記核酸分子からの前記 H 鎖の発現を高め、また、前記核酸分子がイントロンリードスルー (IRT) H 鎖副生成物の翻訳に至らない、上記核酸分子。

【請求項 66】

先行する請求項のいずれか 1 つに記載の核酸分子を含んでなる発現カセット。 50

## 【請求項 67】

先行する請求項のいずれか 1 つに記載の核酸分子を含んでなる発現ベクター。

## 【請求項 68】

選択可能なマーカーをコードする遺伝子および配列内リボソーム進入部位配列 (IRES) をさらに含んでなる、請求項 67 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 69】

請求項 54 ~ 68 のいずれか 1 つに記載の核酸分子を含んでなる細胞。

## 【請求項 70】

請求項 66 に記載のカセットを含んでなる哺乳動物細胞。

## 【請求項 71】

請求項 67 若しくは 68 に記載のベクターを含んでなる哺乳動物細胞。

## 【請求項 72】

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項 70 若しくは 71 に記載の細胞。

## 【請求項 73】

以下の式：

$V_H - Int1 - C_H1 - Int2 - Hinge - Int3 - C_H2 - C_H3$ 、

式中、 $V_H$  はいずれかの H 鎖可変領域をコードするエキソンであり；

$C_H1$ 、 $C_H2$  および  $C_H3$  は、天然に存在する IgG1 H 鎖遺伝子由来のヒト H 鎖定常領域をコードするエキソンであり；

$Int1$ 、 $Int2$  および  $Int3$  は前記遺伝子由来の対応するイントロンであり、かつ、 $Int2$  および  $Int3$  は場合によっては存在し；ならびに

$Hinge$  は前記遺伝子由来のヒンジをコードするエキソンである、

を有する、IgG1 H 鎖をコードするヌクレオチド配列。

## 【請求項 74】

$Int2$  および  $Int3$  が存在する、請求項 73 に記載の配列。

## 【請求項 75】

H および L 鎖がイントロンリードスルー (IRT) H 鎖副生成物の非存在下で発現されかつ効果的に関連するような条件下で、A $\beta$  ペプチド結合抗体の L 鎖をコードする核酸分子をさらに含んでなる請求項 70 ~ 72 のいずれか 1 つに記載の細胞を培養することを含んでなる、イントロンリードスルー (IRT) H 鎖副生成物を実質的に欠く抗体調製物の製造方法。

## 【請求項 76】

抗体鎖が配列番号 12 として示される配列を有する、請求項 1 若しくは 2 に記載の核酸分子。

## 【請求項 77】

抗体鎖が配列番号 13 として示される配列を有する、請求項 1 若しくは 2 に記載の核酸分子。

## 【請求項 78】

配列番号 6 ~ 11 のいずれか 1 つの核酸によりコードされる定常領域、および配列番号 2 の核酸によりコードされる可変領域を含んでなる H 鎖を含んでなる A $\beta$  抗体。

## 【請求項 79】

配列番号 6 ~ 11 のいずれか 1 つの核酸によりコードされる定常領域、および配列番号 4 の核酸によりコードされる可変領域を含んでなる H 鎖を含んでなる A $\beta$  抗体。

## 【請求項 80】

配列番号 6 ~ 11 のいずれか 1 つの核酸によりコードされる定常領域、および図 12 - 14 若しくは 16 C - D のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する可変領域を含んでなる H 鎖を含んでなる A $\beta$  抗体。

## 【請求項 81】

図 15 若しくは 16 A - B の 1 つに示されるところの対応する L 鎖をさらに含んでなる

10

20

30

40

50

、請求項 78～80 のいずれか 1 つに記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との関係

本出願は、2004年10月5日出願の米国特許出願第60/616,474号（その内容全体はここに引用することにより組み込まれる）に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

組換えタンパク質の製造のための発現ベクターは、少なくとも1980年代中期以降存在している。典型的には、組換えタンパク質発現のためのベクターに基づく戦略は、主として、基礎研究において、およびタンパク質調製物の絶対的な純度が決定的でない小スケール実験のため使用されてきた。対照的に、組換えタンパク質を治療的応用に使用する場合は、少量の汚染物質であっても、例えば誤ってスプライスされた（mis-spliced）若しくはイントロンリードスルー（read through）副生成物の存在は、生じる治療的タンパク質の活性および収量を低下させ得る。誤ってスプライスされた若しくはリードスルータンパク質配列を有する治療的タンパク質の患者への投与は、望ましくない副作用の可能性を増大させうる。

10

【0003】

こうした副生成物はまた製造にとっても厄介である。副生成物の存在は精製工程を損ない得る。こうした副生成物は、典型的に、大きさ、親和性若しくは生物活性に関して所望のタンパク質に類似であるためである。なおさらに、組換え宿主細胞を使用するタンパク質発現をスケールアップすることは、典型的には、とりわけ最適未満の細胞培養条件下で細胞を培養する場合に、所望の生成物に比較して増大する量の副生成物をもたらす。こうした最適以下の細胞培養条件は、大スケールのタンパク質製造、例えば生物醗酵槽の運転の最後で、若しくは他の理由から大スケール培養の健全な状態が劣化する場合に頻繁に存在する。

20

【0004】

従って、とりわけ治療的タンパク質の大スケール生産のための組換えタンパク質の製造の改良方法に対する必要性が存在する。

30

【発明の開示】

【0005】

[発明の要約]

本発明は、組換えタンパク質若しくはペプチドの発現および/若しくは製造を改良するための方法および組成物を提供する。一態様において、誤ってスプライスされたおよび/若しくはイントロンリードスルー副生成物を減少若しくは排除し、かつ/または組換えタンパク質の発現を高めるよう改変されている核酸分子が提供される。ある態様において、該核酸は組換え抗体（本明細書で免疫グロブリンともまた称される）若しくはそれらのフラグメントをコードする。

40

【0006】

本発明はさらに、誤ってスプライスされたおよび/若しくはイントロンリードスルー副生成物を減少若しくは排除しかつ/または組換えタンパク質発現を高めるよう改変されたベクター（例えば発現ベクター）；こうした核酸分子およびベクターを包含する宿主細胞、例えば哺乳動物宿主細胞；ならびに例えば大スケールで組換えタンパク質若しくはペプチドを製造するためのこうした細胞の培養方法を包含する。誤ってスプライスされたおよび/若しくはイントロンリードスルー生成物を実質的に含まない組換えタンパク質若しくはペプチド、例えば抗体の組成物、例えば製薬学的組成物もまた開示される。これらの組成物は、例えば神経変性および悪性の障害の処置を包含する治療的使用に適する。

【0007】

とりわけ、本発明は、神経変性疾患の処置における使用のための治療的抗体を発現させ

50

るための組成物および方法を提供する。例えば単位用量あたりの該分子の治療活性が維持されかつ精製が向上されるような、こうした抗体の完全性はとりわけ重要である。特化された機能、すなわち、ある種の生物学的適応症、例えば、治療的ポリペプチドが血液脳関門（BBB）を横断しかつ脳中の標的抗原を結合する神経変性状態の処置における使用に意図されるこうしたタンパク質の純度を向上させるための緊急の所望が存在する。本発明により製造される例示的抗体は、神経変性疾患の標的、例えばアルツハイマー病のアミロイドタンパク質、すなわちアミロイドβペプチド（Aβ）を結合するための高純度で製造される抗体である。

#### 【0008】

従って、一局面において、本発明は1個若しくはそれ以上のイントロンおよびエキソン配列を有するヌクレオチド配列を包含する核酸分子（例えば改変若しくは組換え核酸分子）を特徴とし、最低1個のイントロン配列は、タンパク質発現を高めかつ／または誤ってスプライスされた若しくはイントロンリードスルー（ITR）副生成物（1種若しくは複数）を減少若しくは排除するために天然に存在する配列に比較して改変されている。一態様において、該核酸分子は、天然に存在する配列（例えばゲノム配列）に関して、所望のタンパク質若しくはペプチド、例えば抗体若しくはそのフラグメント（例えば免疫グロブリンH鎖）の高められた発現を指図しかつ／またはそのイントロンリードスルー（ITR）副生成物（1種若しくは複数）を減少若しくは排除する。該タンパク質若しくはペプチドは哺乳動物起源、例えばヒト若しくはネズミ、典型的にはヒト起源のものであり得る。本明細書に記述される核酸分子は、天然に存在する配列から改変された形態を指すことが理解される。いくつかの態様において、該核酸分子は単離若しくは精製されている。他の態様において、それは組換え分子である。

#### 【0009】

一態様において、核酸分子は、天然に存在する配列（例えばゲノム配列）に比較して最低1、2、3個のイントロン、若しくは1個を除き全部までのイントロンが欠失されている。例えば、イントロンリードスルー（IRT）を助長するイントロンを、天然に存在する配列から欠失させ得る。他の態様において、核酸分子は：イントロン／エキソンの構成（例えばイントロン／エキソンの5'から3'の順序）を再配列すること；1個若しくはそれ以上のイントロンの一部分を欠失すること；または1個のイントロン若しくはその一部分を異種イントロン配列で置換することの1種若しくはそれ以上により改変されて、その結果、高められたタンパク質発現および／または誤ってスプライスされた若しくはイントロンリードスルー（IRT）副生成物（1種若しくは複数）の減少若しくは排除が起こる。

#### 【0010】

関係する一態様において、該核酸分子は、抗体H鎖若しくはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列（例えばヒトゲノム配列）を包含する。例えば、ヌクレオチド配列は、免疫グロブリンの1サブタイプ、例えば免疫グロブリンGサブタイプ（例えばIgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4抗体サブタイプ）のH鎖可変領域、ヒンジ領域、ならびに第一、第二および第三の定常領域（例えばC<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3）をコードする1種若しくはそれ以上のヌクレオチド（例えばエキソン）配列を包含し得る。典型的には、免疫グロブリンサブタイプは哺乳動物起源、例えばネズミ若しくはヒトからである。一態様において、ヒトIgG1若しくはIgG4、またはそれらの変異されたバージョンが選ばれる。例えば、免疫グロブリンの定常領域を：増大された安定性、低下されたエフェクター機能若しくは低下された補体固定の1種若しくはそれ以上をもたらすように変異させ得る。一態様において、ヒトIgG4を、安定性を増大させる（例えばヒンジ領域の安定性を増大させるための残基241のセリンからプロリンへの置換を有する）ように変異させる。他の態様において、定常領域はグリコシル化を低下させるように変異させる。

#### 【0011】

一態様において、核酸分子は、該配列のイントロンリードスルーを助長する最低1個の

10

20

30

40

50

イントロンを欠失させるよう改変される。例えば、免疫グロブリンH鎖定常領域の $C_H 2$ と $C_H 3$ の間のイントロンを欠失させ得る。個別に若しくは組合せで欠失させ得る他のH鎖免疫グロブリンイントロンの例は、H鎖可変領域と免疫グロブリンH鎖定常領域の $C_H 1$ の間のイントロン、 $C_H 1$ とヒンジ領域の間のイントロン、およびヒンジ領域と $C_H 2$ の間のイントロンを包含する。前述のイントロンの2、3個のイントロン、若しくは1個を除き全部までのイントロンの組合せを包含する、先行するイントロンのいずれの組合せも欠失させ得る。いくつかの態様において、H鎖定常領域の3個のイントロン、例えば、 $C_H 1$ とヒンジ領域の間のイントロン、ヒンジ領域と $C_H 2$ の間のイントロン、および $C_H 2$ と $C_H 3$ の間のイントロンを欠失させる。H鎖免疫グロブリンのイントロン欠失の以下の例示的組合せ、すなわち、免疫グロブリンH鎖定常領域の $C_H 1$ とヒンジ領域の間のイントロン、および $C_H 2$ と $C_H 3$ の間のイントロン； $C_H 1$ とヒンジ領域の間のイントロン、およびヒンジ領域と $C_H 2$ の間のイントロン；ヒンジ領域と $C_H 2$ の間のイントロン、および $C_H 2$ と $C_H 3$ の間のイントロンもまた本発明の範囲内にある。

10

#### 【0012】

いくつかの態様において、核酸分子は、式：

$V_H - Int 1 - C_H 1 - Int 2 - Hinge - Int 3 - C_H 2 - Int 4 - C_H 3$

、式中、 $V_H$ はH鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列であり；

$C_H 1$ 、 $C_H 2$ および $C_H 3$ は、対応するH鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列、例えば天然に存在するか若しくは変異された形態のヒトIgG1若しくはIgG4 H鎖遺伝子であり；

20

$Hinge$ は、H鎖定常領域のヒンジ領域をコードするヌクレオチド配列、例えば天然に存在するか若しくは変異された形態のヒトIgG1若しくはIgG4 H鎖遺伝子であり；ならびに

$Int 1$ 、 $Int 2$ 、 $Int 3$ および $Int 4$ はH鎖ゲノム配列からのイントロンである、

により表されるヌクレオチド配列を包含する。一態様において、本明細書で $Int 4$ として表される $C_H 2$ と $C_H 3$ の間のイントロンが欠失される。他の態様において、本明細書で $Int 2$ 、 $Int 3$ および $Int 4$ として表される、 $C_H 1$ とヒンジ領域の間、ヒンジ領域と $C_H 2$ の間、および/若しくは $C_H 2$ と $C_H 3$ の間のイントロンの1、2若しくは典型的には3個が欠失される。H鎖ゲノム配列のイントロン/エキソンの配置の付加的な図解を、図1、5および7に示す。

30

#### 【0013】

典型的には、最低1個のイントロン、例えば、本明細書で $Int 1$ として表されるH鎖可変領域と $C_H 1$ の間のイントロンが、該核酸分子中に存在する。個別に若しくは組合せで存在し得る他のH鎖免疫グロブリンイントロンの例は、免疫グロブリンH鎖定常領域の $C_H 1$ とヒンジ領域の間のイントロン；ヒンジ領域と $C_H 2$ の間のイントロン；および $C_H 2$ と $C_H 3$ の間のイントロンを包含する。改変した核酸分子中に最低1個のイントロンを包含することがしばしば望ましい。理論により束縛されることなく、イントロンは、転写速度、ポリアデニル化、mRNAの輸出、翻訳効率およびmRNAの崩壊を包含するタンパク質産生過程の多数の事象に影響すると考えられる。

40

#### 【0014】

一態様において、核酸分子は、式：

$V_H - Int 1 - C_H 1 - Int 2 - Hinge - Int 3 - C_H 2 - C_H 3$ 、

式中、 $V_H$ はH鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列であり；

$C_H 1$ 、 $C_H 2$ および $C_H 3$ は、対応するH鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列、例えば天然に存在するか若しくは変異された形態のヒトIgG1若しくはIgG4 H鎖遺伝子であり；

$Hinge$ は、H鎖定常領域のヒンジ領域をコードするヌクレオチド配列、例えば天然に存在するか若しくは変異された形態のヒトIgG1若しくはIgG4 H鎖遺伝子であり

50

; ならびに

I n t 1、I n t 2 および I n t 3 は H 鎖ゲノム配列からのイントロンである、  
により表されるヌクレオチド配列を包含する。一態様において、ヌクレオチド配列は、例  
えば構造若しくは機能を変える介在配列を伴わない、上で描かれた構成要素より本質的に  
なる。

#### 【 0 0 1 5 】

他の態様において、核酸分子は、式：

$V_H - I n t 1 - C_H 1 - H i n g e - C_H 2 - C_H 3$ 、

式中、 $V_H$  は H 鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列であり；

$C_H 1$ 、 $C_H 2$  および  $C_H 3$  は、対応する H 鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列、  
例えば天然に存在するか若しくは変異された形態のヒト I g G 1 若しくは I g G 4 H 鎖  
遺伝子であり；

H i n g e は、H 鎖定常領域のヒンジ領域をコードするヌクレオチド配列、例えば天然に  
存在するか若しくは変異された形態のヒト I g G 1 若しくは I g G 4 H 鎖遺伝子であり  
； ならびに

I n t 1 は H 鎖ゲノム配列からのイントロンである、

により表されるヌクレオチド配列を包含する。一態様において、ヌクレオチド配列は、例  
えば構造若しくは機能を変える介在配列を伴わない、上に描かれた構成要素より本質的に  
なる。

#### 【 0 0 1 6 】

ヒト I g G 1 のゲノムヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列を図 8（それぞれ配列  
番号 1 および 2）に示す。 $C_H 1$ 、ヒンジ領域、 $C_H 2$  および  $C_H 3$  をコードするエキソ  
ンは、それぞれ、図 8（配列番号 1）のほぼヌクレオチド 2 3 1 ないし 5 2 4、9 1 6 ない  
し 9 6 0、1 0 7 9 ないし 1 4 0 8 および 1 5 0 6 ないし 1 8 2 9 に位置する。I n t  
1、I n t 2、I n t 3 および I n t 4 は、それぞれ、図 8（配列番号 1）のほぼヌク  
レオチド 1 から 2 3 0 まで、ほぼヌクレオチド 5 2 5 ないし 9 1 5、ほぼヌクレオチド 9 6  
1 ないし 1 0 7 8、およびほぼヌクレオチド 1 4 0 9 ないし 1 5 0 5 に位置するヒト I g  
G 1 H 鎖ゲノム配列からのイントロンに対応する。

#### 【 0 0 1 7 】

変異されたヒト I g G 4 のゲノムヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列を図 9（そ  
れぞれ配列番号 3 および 4）に示す。 $C_H 1$ 、ヒンジ領域、 $C_H 2$  および  $C_H 3$  をコード  
するエキソンは、それぞれ、図 9（配列番号 3）のほぼヌクレオチド 2 3 1 ないし 5 2 4  
、9 1 6 ないし 9 5 2、1 0 7 1 ないし 1 4 0 0、および 1 4 9 8 ないし 1 8 2 0 に位置  
する。I n t 1、I n t 2、I n t 3 および I n t 4 は、それぞれ、図 9（配列番号 3）  
のほぼヌクレオチド 1 から 2 3 0 まで、ほぼヌクレオチド 5 2 5 ないし 9 1 6、ほぼヌク  
レオチド 9 5 3 ないし 1 0 7 0、およびほぼヌクレオチド 1 4 0 1 ないし 1 4 9 7 に位置  
するヒト I g G 4 H 鎖ゲノム配列からのイントロンに対応する。

#### 【 0 0 1 8 】

本発明の改変された核酸分子の例は、図 8（配列番号 1）のほぼヌクレオチド 1 4 0 9  
ないし 1 5 0 5 に対応するヒト I g G 1、若しくは図 9（配列番号 3）のほぼヌクレオチ  
ド 1 4 0 1 ないし 1 4 9 7 に対応する変異されたヒト I g G 4 の  $C_H 2$  と  $C_H 3$  の間のイ  
ントロンの欠失を有するヒトゲノム H 鎖定常領域配列を包含する。個々に若しくは組合せ  
で欠失し得る他の H 鎖免疫グロブリンイントロンの例は、図 8（配列番号 1）のほぼヌク  
レオチド 1 ないし 2 3 0 に対応するヒト I g G 1、若しくは図 9（配列番号 3）のほぼヌ  
クレオチド 1 ないし 2 3 0 に対応する変異されたヒト I g G 4 の H 鎖可変領域と  $C_H 1$  の  
間のイントロン；図 8（配列番号 1）のほぼヌクレオチド 5 2 5 ないし 9 1 5 に対応する  
ヒト I g G 1、若しくは図 9（配列番号 3）のほぼヌクレオチド 5 2 5 ないし 9 1 6 に対  
応する変異されたヒト I g G 4 の  $C_H 1$  とヒンジ領域の間のイントロン；および、図 8（  
配列番号 1）のほぼヌクレオチド 9 6 1 ないし 1 0 7 8 に対応するヒト I g G 1、若しく  
は図 9（配列番号 3）のほぼヌクレオチド 9 5 3 ないし 1 0 7 0 に対応する変異されたヒ

10

20

30

40

50

ト I g G 4 のヒンジ領域と C H 2 の間のイントロンを包含する。前述のイントロンの 2、3、4 個のイントロン若しくは 1 個を除き全部までのイントロンの組合せを包含する、先行するイントロンのいかなる組合せも欠失し得る。いくつかの態様において、H 鎖定常領域の 3 個のイントロン、例えば、C H 1 とヒンジ領域の間、ヒンジ領域と C H 2 の間、および C H 2 と C H 3 の間のイントロンが欠失される。いくつかの態様において、核酸分子は、本明細書に開示されるヒト I g G 1 若しくは I g G 4 のエキソンのヌクレオチド配列の 1 種若しくはそれ以上およびイントロンのヌクレオチド配列の 1 種若しくはそれ以上（しかし全部ではない）、またはそれらに実質的に同一の配列を包含する。関連する一態様において、核酸分子は、本明細書に開示されるヒト I g G 1 若しくは I g G 4 のイントロンのヌクレオチド配列の 1 種若しくはそれ以上（しかし全部ではない）またはそれらに実質的に同一の配列に 1 個の欠失を有する。

10

#### 【0019】

一態様において、改変された核酸分子は、図 10（配列番号 5）として示されるヒト I g G 1 をコードするヌクレオチド配列、あるいはそれに実質的に同一の配列（例えば、配列番号 5 に最低 85%、90%、95% 若しくは 99% 同一の、または配列番号 5 のヌクレオチド配列に比較して 1、5、10、50 若しくはそれ以上のヌクレオチド変化を有する配列）を包含する。

#### 【0020】

別の態様において、改変された核酸分子は、図 11（配列番号 6）として示される改変されたヒト I g G 4 のヌクレオチド配列、あるいはそれに実質的に同一の配列（例えば、配列番号 6 に最低 85%、90%、95% 若しくは 99% 同一、または配列番号 6 のヌクレオチド配列に比較して 1、5、10、50 若しくはそれ以上のヌクレオチド変化を有する配列）を包含する。

20

#### 【0021】

改変された核酸分子は、L および H 鎖抗体若しくは免疫グロブリン配列をコードするヌクレオチド配列を包含し得る。こうした配列は、同一核酸分子（例えば同一の発現ベクター）中に存在し得るか、若しくは、あるいは、別個の核酸分子（例えば別個の発現ベクター）から発現させ得る。典型的には、コードされる抗体若しくは免疫グロブリンまたはそれらのフラグメントは、最低 1、および好ましくは 2 個の完全長 H 鎖、ならびに最低 1、および好ましくは 2 個の L 鎖を包含し得る。あるいは、コードされる免疫グロブリン若しくはそれらのフラグメントは、抗原結合フラグメント（例えば F a b、F（a b'）<sub>2</sub>、F v 若しくは一本鎖 F v フラグメント）のみを包含し得る。抗体若しくはそのフラグメントはモノクローナルすなわち単一特異性抗体であり得る。抗体若しくはそのフラグメントは、ヒト、ヒト化、キメラ、C D R 移植、若しくは *i n v i t r o* で生成された抗体でもまたあり得る。なお他の態様において、抗体は、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D および I g E から選ばれた；より具体的には例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 から選ばれた H 鎖定常領域を有する。別の態様において、抗体は例えば κ 若しくは λ から選ばれた L 鎖を有する。

30

#### 【0022】

別の態様において、核酸分子は、可変領域、例えばヒト化、キメラ、C D R 移植若しくは *i n v i t r o* で生成された可変領域を包含する。典型的には、可変領域は、予め決められた抗原、例えば障害、例えば神経変性若しくは悪性障害と関連する抗原に特異的に結合する。

40

#### 【0023】

一態様において、障害は神経変性障害であり、そして、抗体は、アミロイドタンパク質、例えば A β ペプチド（例えばヒト A β ペプチド）に結合する。例えば、抗体は、ネズミの抗体、例えばマウス抗 A β 3 D 6 抗体、若しくはマウス抗 A β 1 2 A 1 1 抗体、若しくはマウス抗 A β 1 0 D 5 抗体、若しくはマウス抗 A β 1 2 B 4 抗体からの 1 個若しくはそれ以上の相補性決定領域（C D R）を含有する H 鎖および L 鎖可変領域を有する A β ペプチドに対するヒト化抗体であり得る。ヒト化抗体の可変領域は、典型的に、ヒト

50

若しくは実質的にヒトのフレームワーク領域を包含する。一態様において、核酸分子は、ヒト化抗 A  $\beta$  ペプチド抗体の H および L 鎖可変領域を包含する。

【 0 0 2 4 】

別の局面において、本発明は、前述の改変された核酸分子の 1 種若しくはそれ以上を包含するベクター（例えば発現ベクター）を特徴とする。該ベクターは、付加的に：宿主細胞中での複製、選択、mRNA 転写、mRNA の安定性、タンパク質発現若しくはタンパク質分泌の 1 種若しくはそれ以上を高めるヌクレオチド配列を包含し得る。例えば、ベクターは、複製若しくはエンハンサーの発現を司るヌクレオチド配列、エンハンサープロモーター要素、リーダー配列をコードするヌクレオチド配列、選択可能なマーカー（例えば DHFR）をコードする遺伝子、配列内リボソーム進入部位配列（IRES）およびポリ

10

【 0 0 2 5 】

別の局面において、本発明は、前述の核酸分子および／若しくはベクター、例えば発現ベクターの 1 種を包含する細胞、例えば真核生物宿主細胞、例えば哺乳動物宿主細胞（例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）を提供する。該細胞は、本発明の核酸配列で一過性に若しくは安定にトランスフェクトし得る。

【 0 0 2 6 】

別の局面において、本発明は、参照、例えば天然に存在するゲノム配列に比較して、組換えタンパク質若しくはペプチド、例えば抗体の発現を高める方法、または組換えタンパク質若しくはペプチド、例えば誤ってスプライスされたおよび／若しくはイントロンリードスルー生成物の低下されたレベルを有する（例えばそれらを実質的に含まない）抗体の発現方法を提供する。該方法は、本明細書に記述されるところの核酸分子を宿主細胞、例えば哺乳動物宿主細胞（例えば CHO 細胞）に導入すること；該組換えタンパク質若しくはペプチドの発現を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養して宿主細胞の培養物を生じさせること；および、場合によっては、宿主細胞の培養物（例えば宿主細胞上清）から該組換えタンパク質若しくはペプチドを得る、例えば精製することを包含する。

20

【 0 0 2 7 】

該方法はさらに、核酸サンプルを、イントロンおよび隣接エキソン配列に相補的な、若しくは、あるいは、隣接エキソン配列に相補的な核酸プローブと、該核酸サンプルおよび該プローブのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で接触させること；生じる複合体を、例えば該プローブ配列の PCR 増幅により検出することによる、核酸サンプル、例えば宿主細胞からの mRNA サンプル中の IRT 若しくは IRT 生成物を同定する（例えば検出および／若しくはそのレベルを測定する）段階を包含し得る。イントロン配列に相補的な核酸プローブを含有するサンプル中の複合体の検出、例えば PCR 増幅生成物は、IRT 若しくは IRT 生成物の存在を暗示する。IRT 生成物のレベルは例えば実施例 1 に記述されたとおり定量し得る。

30

【 0 0 2 8 】

別の局面において、標準的参照、例えば天然に存在するゲノム配列に比較して減少されたイントロンリードスルー（IRT）H 鎖副生成物を有する（例えばそれを実質的に欠く）抗体若しくはそのフラグメントの製造方法が提供される。該方法は、本明細書に記述されるところの核酸分子、および場合によっては抗体 L 鎖をコードする核酸を含有する細胞、例えば哺乳動物細胞（例えば CHO 細胞）を、該 H および L 鎖が発現されかつ場合によっては効果的に関連するような条件下で培養することを包含する。該抗体若しくはそのフラグメントは場合によっては細胞培養物から精製する。典型的には、抗体若しくはそのフラグメントは、減少された誤ってスプライスされた若しくはイントロンリードスルー（IRT）H 鎖副生成物を有する。

40

【 0 0 2 9 】

該方法は、宿主細胞からのサンプル、例えば mRNA サンプル中の IRT 若しくは IRT 生成物を検出かつ／若しくはそのレベル測定する段階；前記サンプルを、イントロンおよび隣接エキソン配列に相補的な、若しくは、あるいは、隣接エキソン配列に相補的な核

50

酸プローブと、該核酸サンプルおよびプローブのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で接触させる段階；生じる複合体を、例えば該プローブ配列のPCR増幅により検出する段階をさらに包含し得る。イントロン配列に相補的な核酸プローブを含有するサンプル中の複合体、例えばPCR増幅産物の検出は、IRT若しくはIRT生成物の存在を暗示する。IRT生成物のレベルは例えば実施例1に記述されるとおり定量し得る。

【0030】

別の局面において、本発明は、ゲノムH鎖配列から最低1個のイントロン（前記イントロンはIRTを助長する）を欠失させることにより前記配列から発現されるイントロンリードスルー（IRT）抗体H鎖副生成物の減少方法を提供する。

【0031】

別の局面において、本発明は、サンプル、例えば核酸サンプル中のIRT若しくはIRT生成物の同定（例えば検出および/若しくはそのレベルの測定）方法の特徴とする。該方法は：細胞、例えば組換え細胞（例えば本明細書に記述されるところの宿主細胞）から核酸サンプル、例えばmRNAサンプルを得ること；前記核酸サンプルを、イントロンおよび隣接エキソン配列に相補的な、若しくは、あるいは、隣接エキソン配列に相補的な核酸プローブと、該核酸サンプルおよび該プローブのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で接触させること；生じる複合体を、例えば該プローブ配列のPCR増幅により検出することを包含する。イントロン配列に相補的な核酸プローブを含有するサンプル中の複合体、例えばPCR増幅生成物の検出は、IRT若しくはIRT生成物の存在を暗示する。IRT生成物のレベルは、例えば実施例1に記述されるとおり定量し得る。

【0032】

別の局面において、本発明は、本明細書に開示される方法により製造される、参照、例えば天然に存在するゲノム配列に比較して減少された誤ってスプライスされたおよび/若しくはイントロンリードスルー生成物を有する（例えばそれらを実質的に含まない）、抗体（例えば組換え抗体）若しくはそのフラグメントの特徴とする。一態様において、該抗体若しくはそのフラグメントはキメラ、ヒト化、CDR移植、若しくは*in vitro*で生成された抗体である。典型的には、該抗体若しくはそのフラグメントは、予め決められた抗原、例えば障害、例えば神経変性障害と関連する抗原に特異的に結合する可変領域を有する。

【0033】

別の局面において、本発明は、参照、例えば天然に存在するゲノム配列に比較して減少された誤ってスプライスされたおよび/若しくはイントロンリードスルー生成物を有する（例えばそれらを実質的に含まない）組換えタンパク質若しくはペプチド、例えば抗体、ならびに製薬学的に許容できる担体を含有する組成物、例えば製薬学的組成物を提供する。これらの組成物は、例えば神経変性障害の処置を包含する治療的使用に適する。

【0034】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な記述および請求の範囲から明らかであろう。

【0035】

[発明の詳細な記述]

多数のアプローチを発現ベクターの設計および構築に採用することができ、そして、該過程は、典型的に、合理的なレベルのタンパク質が産生される前に実質的な試行錯誤実験を必要とする。設計過程での重大な考慮は、ベクターの構築におけるイントロン配列の使用に関する。一アプローチにおいては、遺伝子配列全体を、それが天然に存在する（イントロンおよびエキソン双方の配列の完全な相補物を含有する）ように利用しうる。こうした場合、細胞内の翻訳後スプライシング機構がイントロン配列を摘出して該遺伝子のエキソン配列のみを含有する成熟mRNAを生じることができることが期待される。第二のアプローチは、遺伝子のcDNAのみに対応する配列を利用することである。この場合、スプライシング事象が起こらず、かつ、pre-mRNA配列はタンパク質をコードする内容物（content）中のmRNA配列と実質的に同一であることが予測される。なお第三

10

20

30

40

50

の場合には、ベクター構築は、元の遺伝子配列を通常は伴わないイントロンの選択および配置を必要とする。

【0036】

ベクターの状況内での遺伝子の発現に対するイントロン配列の影響は不完全に理解されている。イントロンが、転写速度、ポリアデニル化、mRNAの輸出、翻訳効率およびmRNAの崩壊を包含するタンパク質産生の過程の多数の事象を遂げることが報告された(Nottら(2003)RNA 9:607-617)。mRNA発現の状況内で、ベクターからのタンパク質の収量に対するイントロンの成果に関する予測可能性の明白な線は存在しなかった。例えば、多様なイントロン配列を包含することが、発現の大きな増大を引き起こし得るか、影響を有し得ないか、若しくはmRNA発現を低下させ得ることが多様に報告された(Bergら(1988)Mol. Cell. Biol. 8:4395-4405; Bourdonら(2001)EMBO Rep. 2:394-398)。大部分のより高等な真核生物遺伝子はイントロンを含有するため、不必要なリードスルー副生成物の非存在下で、イントロンを含有する遺伝子を、高レベルでかつ該遺伝子のエキソン配列に対する近接した忠実度を伴い予測可能に発現するのに使用しうる系の開発は、明らかに、タンパク質発現系の予測可能な開発に対する補助である。

10

【0037】

イントロン配列と関連する予測不可能性は信頼できる発現ベクターの設計に障害をもたらす一方、大きな設計の利益は、遺伝子工学技術の影響を受けやすいモジュラー形態を目的のタンパク質が有する場合に実現され得る。抗体は、イントロン配列の包含が発現ベクターの設計を助長するこうした一例を提供する。

20

【0038】

本明細および請求の範囲で使用されるある種の用語を下に定義する。

【0039】

本明細書で使用されるところの「イントロン」という用語は、転写されるがしかしそのいずれかの側の配列(エキソン)と一緒にスプライスされることによりRNA転写物から除去されるDNAのセグメントを包含する。イントロンは、遺伝子のタンパク質コーディング領域内の介在配列であるとみなされており、そして、一般には、該遺伝子から産生されるタンパク質中に表される情報を含有しない。

30

【0040】

「エキソン」という用語は、成熟RNA産物中に表される介在配列を含有する遺伝子のいかなるセグメントも包含する。エキソンは、タンパク質に翻訳される遺伝子内の情報を含んでなる。

【0041】

「プレmRNA」という用語は、RNAポリメラーゼによる遺伝子の転写から生じる最初のRNA産物を包含する。プレmRNAと呼称されるRNAはイントロンおよびエキソン双方の配列を含有し、そしてこれゆえに細胞のスプライシング機構によりプロセッシングされていない。

【0042】

「mRNA」という用語は、イントロンを除去するようにプロセッシングされておりかつポリペプチドに翻訳されることが可能であるRNA転写物を包含する。

40

【0043】

「スプライシング」という用語は、イントロンがプレmRNA種から除去される、真核生物細胞の核で発生する細胞事象を包含する。一般に、該過程は、5'スプライスドナー部位が3'スプライスアクセプター部位との近接にもたらされかつ介在イントロン配列が転写物から除去される、スプライソソーム複合体の形成を必要とする。

【0044】

「ベクター」という用語は、目的の遺伝子(1個若しくは複数)をしばしば含んでなりかつ核酸が宿主細胞中で複製しかつ/若しくは転写されるために必須の最小要素をさらに含んでなる核酸構築物を包含する。こうした構築物は染色体外要素として存在しうるか、

50

若しくは宿主細胞のゲノム中に組込まれうる。

【0045】

「イントロンリードスルー」(「IRT」)という句は、それによりブレ mRNA 転写物の異常なスプライシングが代替の大きさ若しくはアミノ酸の構成要員 (constituent) のタンパク質若しくはペプチドを生じる過程を指す。誤ってスプライスされた転写物から産生される最終的なタンパク質に関して変動する結果が起こりうる。例えば、予測されたより大きいタンパク質若しくは不正確な終止コドンをもつタンパク質が発生することがあり、この場合、該タンパク質はそれぞれ予測されたより長い若しくは短いことができる。さらに、タンパク質はまた、グリコシル化、ミリスチル化、リン酸化、ユビキチン化のためのタンパク質修飾、若しくは他の翻訳後修飾を助長する不正確な若しくは付加的な残基も有しうる。

10

【0046】

「イントロンリードスルー副生成物」という用語は、イントロンリードスルーに由来する異常にスプライスされた mRNA から翻訳されるタンパク質若しくはペプチド、例えば予測されない大きさ若しくはアミノ酸構成要員のタンパク質を指す。イントロンリードスルー副生成物は、遺伝子既知のアミノ酸配列により予測されかつ/若しくは該遺伝子の cDNA により予測されるポリペプチドより短いことも若しくは長いこともある。イントロンリードスルー副生成物はまた、該遺伝子の正確にスプライスされた mRNA から生じるタンパク質の受け入れられている分子量と異なる見かけの分子量も有しうる。さらに、「イントロンリードスルー副生成物」という用語は、目的のタンパク質と通常は関連しないタンパク質分解性プロセッシング事象から発生するタンパク質を包含し、前記タンパク質分解性プロセッシングは、潜在的に、イントロン - エキソン接合部のリードスルーによりフレームシフトしたタンパク質生成物から生じる。

20

【0047】

「H鎖副生成物」という用語は、イントロンリードスルーに由来する異常にスプライスされた免疫グロブリンH鎖の mRNA から翻訳されるポリペプチド、例えば予測されない大きさ若しくはアミノ酸構成要員のH鎖タンパク質を指す。H鎖副生成物は、免疫グロブリン遺伝子の既知のアミノ酸配列により予測されかつ/若しくは該遺伝子の cDNA により予測されるポリペプチドより短いことも若しくは長いこともある。H鎖副生成物はまた、H鎖遺伝子の正確にスプライスされた mRNA から生じるタンパク質の受け入れられている分子量と異なる見かけの分子量も有しうる。さらに、「H鎖副生成物」という用語は、該タンパク質と通常は関連しないタンパク質分解性プロセッシング事象から発生するポリペプチドを包含する。

30

【0048】

「天然に存在する配列」若しくは「天然に存在するゲノム配列」という句は、その天然のすなわち自然の状態で見出される遺伝子のイントロンおよびエキソンの構成を指す。天然に存在する配列は、例えばその天然の染色体位置に見出し得るか、若しくは、該配列のイントロンおよびエキソンの構成が保持される限りはベクター中にクローン化し得る。

【0049】

「免疫グロブリン」若しくは「抗体」(本明細書で互換可能に使用される)という用語は、2個のHおよび2個のL鎖よりなる4ポリペプチド鎖構造を有するタンパク質を指し、前記鎖は、例えば鎖間ジスルフィド結合により安定化され、該免疫グロブリン若しくは抗体は抗原を選択的若しくは特異的に結合する能力を有する。

40

【0050】

Aβ免疫グロブリン若しくはAβ抗体という用語は、Aβペプチドを選択的若しくは特異的に結合する抗体を指す。

【0051】

「一本鎖免疫グロブリン」若しくは「一本鎖抗体」(本明細書で互換可能に使用される)という用語は、1個のHおよび1個のL鎖よりなる2ポリペプチド鎖構造を有するタンパク質を指し、前記鎖は例えば鎖間ペプチドリinkerにより安定化され、該免疫グロブリ

50

ン若しくは抗体は抗原を特異的に結合する能力を有する。

【0052】

「免疫グロブリン若しくは抗体ドメイン」という用語は、例えばβブリーツシートおよび/若しくは鎖内ジスルフィド結合により安定化されているペプチドループを包含する（例えば3ないし4個のペプチドループを包含する）H若しくはL鎖ポリペプチド内の球状領域を指す。ドメインはさらに本明細書で「定常」若しくは「可変」と称され、「定常」という用語は、「定常」ドメインの場合に多様なクラスメンバーのドメイン内の配列の変動の相対的欠如を指し、また、「可変」という用語は、「可変」ドメインの場合に多様なクラスメンバーのドメイン内の有意の変動を指す。抗体若しくはポリペプチドの「ドメイン」は、しばしば、当該技術分野で抗体若しくはポリペプチドの「領域」と互換可能に称される。抗体L鎖の「定常」ドメインは、「L鎖定常領域」、「L鎖定常ドメイン」、「CL」領域若しくは「CL」ドメインと互換可能に称される。抗体H鎖の「定常」ドメインは、「H鎖定常領域」、「H鎖定常ドメイン」、「CH」領域若しくは「CH」ドメインと互換可能に称される。抗体L鎖の「可変」ドメインは、「L鎖可変領域」、「L鎖可変ドメイン」、「VL」領域若しくは「VL」ドメインと互換可能に称される。抗体H鎖の「可変」ドメインは、「H鎖定常領域」、「H鎖定常ドメイン」、「VH」領域若しくは「VH」ドメインと互換可能に称される。

10

【0053】

「領域」という用語はまた、抗体鎖若しくは抗体鎖ドメインの一部若しくは一部分（例えば本明細書で定義されるところのH若しくはL鎖の一部若しくは一部分、または定常若しくは可変ドメインの一部若しくは一部分）、ならびに前記鎖若しくはドメインのより分離した一部若しくは部分も指すことができる。例えば、LおよびH鎖若しくはLおよびH鎖可変ドメインは、本明細書に定義されるところの「フレームワーク領域」すなわち「FR」間に散在された「相補性決定領域」すなわち「CDR」を包含する。

20

【0054】

免疫グロブリン若しくは抗体は単量体若しくは重合体で存在し得る（例えば、五量体の形態で存在するIgM抗体、および/または単量体、二量体若しくは多量体の形態で存在するIgA抗体）。「フラグメント」という用語は、無傷のすなわち完全な抗体若しくは抗体鎖より少ないアミノ酸残基を包含する抗体若しくは抗体鎖の一部若しくは一部分を指す。フラグメントは、無傷すなわち完全な抗体若しくは抗体鎖の化学的若しくは酵素的処理を介して得ることができる。フラグメントは組換え手段によってもまた得ることができる。例示的フラグメントはFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabcおよび/若しくはFvフラグメントを包含する。「抗原結合フラグメント」という用語は、抗原を結合するか若しくは抗原結合（すなわち特異的結合）について無傷の抗体と（すなわちそれらが由来した無傷の抗体と）競合する免疫グロブリン若しくは抗体のポリペプチドフラグメントを指す。

30

【0055】

「コンホメーション」という用語は、タンパク質若しくはポリペプチド（例えば抗体、抗体鎖、それらのドメイン若しくは領域）の三次構造を指す。例えば、「L（若しくはH）鎖のコンホメーション」という句はL（若しくはH）鎖可変領域の三次構造を指し、また、「抗体のコンホメーション」若しくは「抗体フラグメントのコンホメーション」という句は抗体若しくはそのフラグメントの三次構造を指す。「コンホメーション」という用語はまた、1若しくは数個のタンパク質若しくはペプチド鎖の三次元の関係から生じる四次構造も指すことがある。抗原決定子に関して、「高次構造エピトープ」という句は、緊密な並置に存在する1若しくは数種のタンパク質内のアミノ酸の特定の空間的配置を包含する抗原決定子を指す。抗体の多機能の性質（すなわち、同時に1種以上のタンパク質分子上の数個のエピトープを結合するIgG分子の能力）を考えれば、抗体は、数個のアミノ酸鎖により含まれる高次構造エピトープを結合する生得の能力を有するとみなし得る。例えば、斑を形成するA□の沈着は、1個の抗体が数個の緊密に配置されたA□ペプチドを結合しうる高次構造エピトープを提供する。

40

50

## 【0056】

結合フラグメントは、組換えDNA技術、または無傷の免疫グロブリンの酵素的若しくは化学的切断により生じられる。結合フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv、一本鎖および一本鎖抗体を包含する。「二特異性」若しくは「二官能性」免疫グロブリン若しくは抗体以外に、免疫グロブリン若しくは抗体は、同一のその結合部位のそれぞれを有することが理解される。「二特異性」若しくは「二官能性抗体」は、2個の異なるH/L鎖対および2個の異なる結合部位を有する人工のハイブリッド抗体である。二特異性抗体は、ハイブリドーマの融合若しくはFab'フラグメントの連結を包含する多様な方法により製造し得る。例えば、Song sivilaiとLachmann、Clin. Exp. Immunol. 79: 315 - 321 (1990); Kosteelnyら、J. Immunol. 148、1547 - 1553 (1992)を参照されたい。

10

## 【0057】

抗体の「特異的結合」若しくは「選択的結合」は、抗体が特定の抗原若しくはエピトープに対する認識可能な親和性を表しかつ一般に有意の交差反応性を表さないことを意味している。「認識可能な」すなわち好ましい結合は、最低 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  M<sup>-1</sup>若しくは $10^{10}$  M<sup>-1</sup>の親和性を伴う結合を包含する。 $10^7$  M<sup>-1</sup>以上、好ましくは $10^8$  M<sup>-1</sup>以上の親和性がより好ましい。本明細書に示されるものの中間の値もまた本発明の範囲内にあることを意図しており、そして、好ましい結合親和性は親和性のある範囲、例えば $10^6$ ないし $10^{10}$  M<sup>-1</sup>、好ましくは $10^7$ ないし $10^{10}$  M<sup>-1</sup>、より好ましくは $10^8$ ないし $10^{10}$  M<sup>-1</sup>として示され得る。「有意の交差反応性を表さない」抗体は、望ましくない実体（例えば望ましくないタンパク質性の実体）に認識可能に結合しないことができるものである。例えば、Aβに特異的に結合する抗体は、Aβを認識可能に結合することができるが、しかしAβ以外のタンパク質若しくはペプチド（例えば斑に包含されるAβ以外のタンパク質若しくはペプチド）と有意に反応しないことができる。特定の1エピトープに特異的な抗体は、例えば、同一のタンパク質若しくはペプチド上の離れたエピトープと有意に交差反応しないことができる。例示的態様において、抗体は交差反応性を表さない（例えば、Aβ以外のペプチド若しくはAβ上の離れたエピトープと交差反応しない）。特異的結合は、こうした結合を測定するためのいずれかの技術に認識された手段により測定し得る。好ましくは、特異的結合はスキャッチャード分析および/若しくは競合結合アッセイにより測定する。

20

30

## 【0058】

「有意な同一性」という用語は、2配列、例えば2種のポリペプチド配列が、デフォルトのギャップ重み（gap weight）を使用してプログラムGAP若しくはBESTFITによるように至適に整列される場合に、最低50～60%の配列同一性、好ましくは最低60～70%の配列同一性、より好ましくは最低70～80%の配列同一性、より好ましくは最低80～90%の配列同一性、なおより好ましくは最低90～95%の同一性、およびなおより好ましくは最低95%の配列同一性若しくはそれ以上（例えば99%の配列同一性若しくはそれ以上）を共有することを意味している。「実質的同一性」若しくは「実質的に同一の」という用語は、2配列、例えば2種のポリペプチド配列が、デフォルトのギャップ重みを使用してプログラムGAP若しくはBESTFITによるように至適に整列される場合に、最低80～90%の配列同一性、好ましくは最低90～95%の配列同一性、およびより好ましくは最低95%の配列同一性若しくはそれ以上（例えば99%の配列同一性若しくはそれ以上）を共有することを意味している。配列の比較のため、典型的には、1配列が試験配列を比較する参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験および参照配列をコンピュータに入力し、必要な場合は下位配列座標を指定し、そして配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。配列比較アルゴリズムがその後、指定したプログラムパラメータに基づき、参照配列に関して試験配列（1種若しくは複数）について配列同一性のパーセントを計算する。

40

## 【0059】

50

比較のための配列の至適の整列は、例えば、SmithとWaterman、Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより、NeedlemanとWunsch、J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アライメントアルゴリズムにより、PearsonとLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の相同性検索方法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化した実装(Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)により、若しくは目視(全般として、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい)により実施し得る。配列同一性および配列類似性パーセントの決定に適するアルゴリズムの一例は、Altschulら、J. Mol. Biol. 215: 403 (1990)に記述されるBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)を通じて公的に入手可能(国立保健研究所(National Institute of Health)のNCBIインターネットサーバーを通じて公的にアクセス可能)である。典型的にはデフォルトのプログラムパラメータを使用して配列比較を実施し得るとは言え、カスタマイズしたパラメータもまた使用し得る。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルトとして3の語長(word length)(W)、10の期待(expectation)(E)およびBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用する(HenikoffとHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)を参照されたい)。

#### 【0060】

好ましくは、同一でない残基位置は保存的アミノ酸置換により異なる。アミノ酸置換を保存的若しくは非保存的と分類する目的上、アミノ酸を後に続くとおりグループ分けする：群I(疎水性側鎖)：leu、met、ala、val、ile；群II(中性の親水性側鎖)：cys、ser、thr；群III(酸性側鎖)：asp、glu；群IV(塩基性側鎖)：asn、gln、his、lys、arg；群V(鎖の方向に影響する残基)：gly、pro；および群VI(芳香族側鎖)：trp、tyr、phe。保存的置換は同一分類のアミノ酸間の置換を伴う。非保存的置換は、これらの分類の1つの1メンバーを別のものの1メンバーで交換することを構成する。

#### 【0061】

##### 抗体

本発明の方法論は、不必要な若しくは望ましくない副生成物が検出される多様な抗体製造方法で応用可能である。とりわけ、該方法論は、製造されている抗体の配列が既知であるキメラおよびヒト化モノクローナル抗体のような組換え抗体の製造に応用可能である。

#### 【0062】

「ヒト化免疫グロブリン」若しくは「ヒト化抗体」という用語は、最低1個のヒト化免疫グロブリン若しくは抗体鎖(すなわち最低1個のヒト化L若しくはH鎖)を包含する免疫グロブリン若しくは抗体を指す。「ヒト化免疫グロブリン鎖」若しくは「ヒト化抗体鎖」(すなわち、「ヒト化免疫グロブリンL鎖」若しくは「ヒト化免疫グロブリンH鎖」という用語は、実質的にヒト免疫グロブリン若しくは抗体からの可変フレームワーク領域および実質的にヒト以外の免疫グロブリン若しくは抗体からの相補性決定領域(CDR)(例えば最低1個のCDR、好ましくは2個のCDR、より好ましくは3個のCDR)を包含する可変領域を有し、そしてさらに定常領域(例えば、L鎖の場合は最低1個の定常領域若しくはその部分、およびH鎖の場合は好ましくは3個の定常領域)を包含する免疫グロブリン若しくは抗体鎖(すなわちそれぞれL若しくはH鎖)を指す。「ヒト化可変領域」(例えば「ヒト化L鎖可変領域」若しくは「ヒト化H鎖可変領域」という用語は、実質的にヒト免疫グロブリン若しくは抗体からの可変フレームワーク領域および実質的に

ヒト以外の免疫グロブリン若しくは抗体からの相補性決定領域（CDR）を包含する可変領域を指す。

【0063】

「実質的にヒト免疫グロブリン若しくは抗体から」または「実質的にヒト」という句は、比較の目的上ヒト免疫グロブリン若しくは抗体のアミノ酸配列に整列される場合に、該領域が、例えば保存的置換、コンセンサス配列置換、生殖系列置換、逆突然変異などを見込、み、ヒトフレームワーク若しくは定常領域配列と最低80～90%、90～95%若しくは95～99%の同一性（すなわち局所配列同一性）を共有することを意味している。保存的置換、コンセンサス配列置換、生殖系列置換、逆突然変異などの導入はしばしば、ヒト化抗体若しくは鎖の「至適化」と称される。「実質的にヒト以外の免疫グロブリン若しくは抗体から」または「実質的にヒト以外」という句は、ヒト以外の生物体、例えばヒト以外の哺乳動物の配列に最低80～95%、好ましくは最低90～95%、より好ましくは96%、97%、98%若しくは99%同一の免疫グロブリン若しくは抗体配列を有することを意味している。

10

20

【0064】

従って、ヒト化免疫グロブリン若しくは抗体、またはヒト化免疫グロブリン若しくは抗体鎖の全部の領域若しくは残基は、おそらくCDRを除き、1種若しくはそれ以上の天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する領域若しくは残基に実質的に同一である。「対応する領域」若しくは「対応する残基」という用語は、第一および第二の配列を比較の目的上至適に整列する場合に、第一のアミノ酸若しくはヌクレオチド配列上の1領域若しくは残基と同一の（すなわち同等な）位置を占有する第二のアミノ酸若しくはヌクレオチド配列上の領域若しくは残基を指す。

【0065】

好ましくは、ヒト化免疫グロブリン若しくは抗体は、対応するヒト化されていない抗体の親和性の3、4若しくは5の係数内である親和性で抗原を結合する。例えば、ヒト化されていない抗体が $10^9 \text{ M}^{-1}$ という結合親和性を有する場合、ヒト化抗体は最低 $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、 $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 若しくは $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ という結合親和性を有することができる。免疫グロブリン若しくは抗体鎖の結合特性を記述する場合、鎖は「抗原（例えばAβ若しくは5T4）結合を指図する」その能力に基づき記述し得る。鎖は、それが無傷の免疫グロブリン若しくは抗体（またはその抗原結合フラグメント）に特異的結合特性若しくは結合親和性を賦与する場合に「抗原結合を指図する」と言われる。突然変異（例えば逆突然変異）は、それが前記突然変異を欠く同等の鎖を含んでなる抗体（若しくはその抗原結合フラグメント）の親和性に比較して、前記鎖を含んでなる無傷の免疫グロブリン若しくは抗体（またはその抗原結合フラグメント）の結合親和性に最低1桁影響を及ぼす（例えば低下させる）場合に、抗原結合を指図するH若しくはL鎖の能力に実質的に影響を及ぼすと言われる。突然変異は、それが前記突然変異を欠く同等の鎖を含んでなる抗体（若しくはその抗原結合フラグメント）の親和性の2、3若しくは4の係数のみ、前記鎖を含んでなる無傷の免疫グロブリン若しくは抗体（またはそれらの抗原結合フラグメント）の結合親和性に影響を及ぼす（例えば低下させる）場合に、「抗原結合を指図する鎖の能力に実質的に影響しない（例えば低下させない）」。

30

40

【0066】

「キメラ免疫グロブリン」若しくは抗体という用語は、その可変領域が第一の種由来でありかつその定常領域が第二の種由来である免疫グロブリン若しくは抗体を指す。キメラ免疫グロブリン若しくは抗体は、例えば異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから遺伝子工作することにより構築し得る。「ヒト化免疫グロブリン」若しくは「ヒト化抗体」という用語は、本明細書に定義されるところのキメラ免疫グロブリン若しくは抗体を包含することを意図していない。ヒト化免疫グロブリン若しくは抗体はそれらの構築においてキメラである（すなわち、1種以上のタンパク質からの領域を含んでなる）とは言え、それらは、本明細書に定義されるところのキメラ免疫グロブリン若しくは抗体中に見出されない付加的な特徴（すなわち、ドナーのCDR残基およびアクセプターのフレー

50

ムワーク残基を含んでなる可変領域)を包含する。

【0067】

こうしたキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野で既知の組換えDNA技術により、例えば、Robinsonら 国際特許出願第PCT/US86/02269号明細書；Akiraら 欧州特許出願第184,187号明細書；Taniguchi, M.、欧州特許出願第171,496号明細書；Morrisonら 欧州特許出願第173,494号明細書；Neubergerら PCT国際特許公開第WO 86/01533号明細書；Cabillyら 米国特許第4,816,567号明細書；Cabillyら 欧州特許出願第125,023号明細書；Betterら (1988) Science 240:1041-1043；Liuら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liuら (1987) J. Immunol. 139:3521-3526；Sunら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimuraら (1987) Canc. Res. 47:999-1005；Woodら (1985) Nature 314:446-449；およびShawら (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559)；Morrison, S. L. (1985) Science 299:1202-1207；Oiら (1986) BioTechniques 4:214；Winter 米国特許第5,225,539号明細書；Jonesら (1986) Nature 321:552-525；Verhoeyanら (1988) Science 239:1534；およびBeidlerら (1988) J. Immunol. 141:4053-4060に記述されている方法を使用して製造し得る。

【0068】

抗体の他の部分、例えば定常領域を例えば欠失、付加若しくは置換することにより改変されたモノクローナル、キメラおよびヒト化抗体もまた本発明の範囲内にある。例えば、抗体は後に続くとおり、すなわち、(i)定常領域を別の定常領域、例えば抗体の半減期、安定性若しくは親和性を増大させることを意味されている定常領域、または別の種若しくは抗体クラスからの定常領域で置換することにより；あるいは(ii)例えば、とりわけグリコシル化部位の数、エフェクター細胞機能、Fc受容体(FcR)結合、補体固定を変えるように定常領域中の1個若しくはそれ以上のアミノ酸を改変することにより、改変し得る。抗体定常領域を変える方法は当該技術分野で既知である。変えられた機能、例えば、細胞上のFcR若しくは補体のC1成分のようなエフェクターリガンドに対する変えられた親和性をもつ抗体は、抗体の定常部分の最低1アミノ酸残基を異なる残基で置換することにより製造し得る(例えば、第EP 388,151 A1号明細書、米国特許第5,624,821号および米国特許第5,648,260号明細書(それらの全部の内容はここに引用することにより組み込まれる)を参照されたい)。ネズミ若しくは他の種に適用される場合に免疫グロブリンがこれらの機能を低下若しくは排除するとみられる類似の型の変化が記述され得る。

【0069】

例えば、FcR(例えばFcγR1)若しくはC1q結合に対する抗体(例えばヒトIgGのようなIgG)のFc領域の親和性を、その側鎖に適切な官能性を有する残基(1個若しくは複数)で指定された残基(1個若しくは複数)を置換することにより、あるいは、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸のような荷電した官能基、またはおそらくフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン若しくはアラニンのような芳香族の非極性残基を導入することにより、変えることが可能である(例えば米国特許第5,624,821号明細書を参照されたい)。

【0070】

トランスジェニック動物およびファージディスプレイからのヒト抗体

あるいは、免疫化に際して、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを産生することが可能であるトランスジェニック動物(例えばマウス)を製

造することが今や可能である。例えば、キメラおよび生殖系列変異体マウスにおける抗体 H 鎖結合領域 (J<sub>H</sub>) 遺伝子のホモ接合性の欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記述されている。こうした生殖系列変異体マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原攻撃に際してヒト抗体の産生をもたらす。例えば米国特許第 6,150,584 号；同第 6,114,598 号；および同第 5,770,429 号明細書を参照されたい。

#### 【0071】

完全にヒトの抗体はまたファージディスプレイライブラリーにも由来し得る (Hoogenboomら、J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marksら、J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))。

10

#### 【0072】

二特異性抗体、抗体融合ポリペプチドおよび一本鎖抗体

二特異性抗体 (BsAb) は、最低 2 種の異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。こうした抗体は、完全長抗体若しくは抗体フラグメント (例えば F(ab)<sub>2</sub> 二特異性抗体) に由来し得る。二特異性抗体の作成方法は当該技術分野で既知である。完全長二特異性抗体の伝統的製造は、2 種の鎖が異なる特性を有する 2 種の免疫グロブリン H 鎖 - L 鎖対の共発現に基づく (Millssteinら、Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン H および L 鎖の無作為な取り合わせ (assortment) のため、これらのハイブリドーマ (クアドローマ) は多様な抗体分子の潜在的混合物を生じる (第 WO 93/08829 号明細書および Trauneckerら、EMBO J., 10:3655-3659 (1991) 中を参照されたい)。

20

#### 【0073】

二特異性抗体はまた、架橋すなわち「ヘテロ複合物」抗体も包含する。例えば、ヘテロ複合物中の抗体の一方をアビジンに、他方をビオチン若しくは他のペイロードに結合し得る。ヘテロ複合物抗体はいかなる便宜的な架橋方法を使用しても作成しうる。適する架橋剤は当該技術分野で公知であり、そして米国特許第 4,676,980 号明細書に多数の架橋技術と一緒に開示されている。

#### 【0074】

なお別に態様において、抗体は、ペイロードドメイン、例えば免疫毒素に化学的に若しくは遺伝子的に融合して抗体融合ポリペプチドを生じ得る。こうしたペイロードは、例えば免疫毒素、化学療法剤および放射性同位元素を包含し、それらの全部は当該技術分野で公知である。

30

#### 【0075】

一本鎖抗体はまた本発明の安定化にも適する。該フラグメントは、リンカーで L 鎖可変ドメイン (VL) に結合された H 鎖可変ドメイン (VH) を含んでなり、各可変領域が相互と結合しかつ VL および VH 領域が由来している親抗体の抗原結合ポケットを再創製することを可能にする。Gruberら、J. Immunol., 152:5368 (1994) を参照されたい。

#### 【0076】

抗 Aβ 抗体

40

一般に、本発明の抗体は、Aβ ペプチドを標的とすることによりアミロイド形成性疾患、とりわけアルツハイマー病を処置するための抗体を包含する。

#### 【0077】

「アミロイド形成性疾患」という用語は、不溶性アミロイド原線維の形成若しくは沈着と関連する (若しくはそれにより引き起こされる) いかなる疾患も包含する。例示的アミロイド形成性疾患は、限定されるものでないが全身性アミロイドーシス、アルツハイマー病、成人期発症糖尿病、パーキンソン病、ハンチントン病、前頭側頭葉型痴呆、ならびにプリオン関連の伝染性海綿状脳症 (ヒトにおけるクールーおよびクロイツフェルト・ヤコブ病、ならびにヒツジおよび畜牛におけるそれぞれスクレイピーおよび BSE) を挙げることができる。多様なアミロイド形成性疾患が、沈着した原線維のポリペプチド成分の性

50

質により定義若しくは特徴付けられている。例えば、アルツハイマー病を有する被験体若しくは患者において、 $\beta$ アミロイドタンパク質（例えば野性型、バリエーション若しくは切断型 $\beta$ アミロイドタンパク質）がアミロイド沈着物の特徴付けるポリペプチド成分である。従って、アルツハイマー病は、例えば被験体若しくは患者の脳中の「 $A\beta$ の沈着物を特徴とする疾患」若しくは「 $A\beta$ の沈着物を伴う疾患」の一例である。「 $\beta$ アミロイドタンパク質」、「 $\beta$ アミロイドペプチド」、「 $\beta$ アミロイド」、「 $A\beta$ 」および「 $A\beta$ ペプチド」という用語は本明細書で互換可能に使用される。「免疫原性剤」若しくは「免疫原」は、場合によってはアジュバントとともにの哺乳動物への投与に際してそれ自身に対する免疫学的応答を誘導することが可能である。

#### 【0078】

「 $A\beta$ 抗体」、「抗 $A\beta$ 抗体」および「抗 $A\beta$ 」という用語は、APP、 $A\beta$ タンパク質若しくは双方の1個若しくはそれ以上のエピトープ若しくは抗原決定子に結合する抗体を指すのに本明細書で互換可能に使用される。例示的エピトープ若しくは抗原決定子はヒトアミロイド前駆体タンパク質（APP）内に見出し得るが、しかし、好ましくはAPPの $A\beta$ ペプチド内に見出される。APPの複数のアイソフォーム、例えばAPP<sup>695</sup>、APP<sup>751</sup>およびAPP<sup>770</sup>が存在する。APP内のアミノ酸はAPP<sup>770</sup>アイソフォーム（例えばGenBank受託番号P05067を参照されたい）の配列に従って番号を割り当てられている。 $A\beta$ （ $\beta$ アミロイドペプチドおよび $A\beta$ ともまた本明細書で称される）ペプチドはAPPの39～43アミノ酸の約4kDaの内的フラグメントである（ $A\beta$ 39、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 41、 $A\beta$ 42および $A\beta$ 43）。例えば $A\beta$ 40はAPPの残基672-711よりなり、また、 $A\beta$ 42はAPPの残基672-713よりなる。*in vivo*若しくは*in situ*での異なる分泌酵素によるAPPのタンパク質分解性プロセシングの結果として、 $A\beta$ は長さ40アミノ酸の「短い形態」および長さ42～43アミノ酸からの範囲にわたる「長い形態」の双方で見出される。エピトープ若しくは抗原決定子は $A\beta$ ペプチドのN末端内に配置され得、そして $A\beta$ のアミノ酸1-10内、好ましくは $A\beta$ 42の残基1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、2-7、3-6若しくは3-7から、または $A\beta$ の残基2-4、5、6、7若しくは8、 $A\beta$ の残基3-5、6、7、8若しくは9、あるいは $A\beta$ 42の残基4-7、8、9若しくは10内の残基を包含し得る。「中央」エピトープ若しくは抗原決定子は、 $A\beta$ ペプチドの中央（central）すなわち中央部分（mid-portion）内に位置し、そして $A\beta$ のアミノ酸16-24、16-23、16-22、16-21、19-21、19-22、19-23若しくは19-24内の残基を包含する。「C末端」エピトープ若しくは抗原決定子は $A\beta$ ペプチドのC末端内に位置し、そして $A\beta$ のアミノ酸33-40、33-41若しくは33-42内の残基を包含する。

#### 【0079】

多様な態様において、 $A\beta$ 抗体は末端特異的である。本明細書で使用されるところの「末端特異的」という用語は、 $A\beta$ ペプチドのN末端若しくはC末端残基に特異的に結合するがしかし該残基を含んでなるより長い $A\beta$ 種すなわちAPP中に存在する場合に同一の残基を認識しない抗体を指す。

#### 【0080】

多様な態様において、 $A\beta$ 抗体は「C末端特異的」である。本明細書で使用されるところの「C末端特異的」という用語は、抗体が $A\beta$ ペプチドの遊離C末端を特異的に認識することを意味している。C末端特異的 $A\beta$ 抗体の例は：残基40で終端する $A\beta$ ペプチドを認識するがしかし残基41、42および/若しくは43で終端する $A\beta$ ペプチドを認識しない；残基42で終端する $A\beta$ ペプチドを認識するがしかし残基40、41および/若しくは43で終端する $A\beta$ ペプチドを認識しない；などであるものを包含する。

#### 【0081】

一態様において、抗体は、3D6抗体若しくはそのバリエーション、または10D5抗体若しくはそのバリエーションであることができ、それらの双方は、米国特許公開第2003/0165496A1号、米国特許公開第2004/0087777A1号、国際特許公開第

10

20

30

40

50

W O 0 2 / 4 6 2 3 7 A 3 号明細書に記述されている。3 D 6 および 1 0 D 5 の記述は、例えば、国際特許公開第 W O 0 2 / 0 8 8 3 0 6 A 2 号および国際特許公開第 W O 0 2 / 0 8 8 3 0 7 A 2 号明細書にもまた見出し得る。3 D 6 はヒト  $\beta$  アミロイドペプチド中に位置する N 末端エピトープ、具体的には残基 1 - 5 に特異的に結合するモノクローナル抗体 (m A b) である。比較すれば、1 0 D 5 は、ヒト  $\beta$  アミロイドペプチド中に位置する N 末端エピトープ、具体的には残基 3 - 6 に特異的に結合する m A b である。別の態様において、該抗体は、米国特許公開第 2 0 0 4 0 0 8 2 7 6 2 A 1 号および国際特許公開第 W O 0 3 / 0 7 7 8 5 8 A 2 号明細書に記述されるところの 1 2 B 4 抗体若しくはそのバリエーションでありうる。1 2 B 4 は、ヒト  $\beta$  アミロイドペプチド中に位置する N 末端エピトープ、具体的には残基 3 - 7 に特異的に結合する m A b である。なお別の態様において、抗体は、米国特許出願第 1 0 / 8 5 8 , 8 5 5 号および国際特許出願第 P C T / U S 0 4 / 1 7 5 1 4 号明細書に記述されるところの 1 2 A 1 1 抗体若しくはそのバリエーションでありうる。1 2 A 1 1 は、ヒト  $\beta$  アミロイドペプチド中に位置する N 末端エピトープ、具体的には残基 3 - 7 に特異的に結合する m A b である。なお別の態様において、抗体は、米国特許出願第 1 0 / 7 8 9 , 2 7 3 号および国際特許出願第 W O 0 1 / 6 2 8 0 1 A 2 号明細書に記述されるところの 2 6 6 抗体でありうる。本発明での使用のためのヒト  $\beta$  アミロイドペプチド中に位置する C 末端エピトープに特異的に結合するよう設計された抗体は、限定されるものでないが、米国特許第 5 , 7 8 6 , 1 6 0 号明細書に記述されるところの 3 6 9 . 2 B を挙げることができる。

10

20

#### 【 0 0 8 2 】

例示的態様において、抗体は、A  $\beta$  ペプチドを選択的に結合する、ヒト化抗 A  $\beta$  ペプチド 3 D 6 抗体、ヒト化抗 A  $\beta$  ペプチド 1 2 A 1 1 抗体、ヒト化抗 A  $\beta$  ペプチド 1 0 D 5 抗体、ヒト化抗 A  $\beta$  ペプチド 1 2 B 4 抗体およびヒト化抗 A  $\beta$  ペプチド 2 6 6 抗体から選ばれる。より具体的には、ヒト化抗 A  $\beta$  ペプチド 3 D 6 抗体は、(例えばアルツハイマー病に罹っている患者の) 脳中の斑沈着物中に見出されるヒト  $\beta$  アミロイド 1 - 4 0 若しくは 1 - 4 2 ペプチド中に位置する N H <sub>2</sub> 末端エピトープに特異的に結合するよう設計される。

#### 【 0 0 8 3 】

##### F c 融合物

いくつかの態様において、本発明の核酸分子は融合若しくはキメラタンパク質をコードする。融合タンパク質はターゲティング部分、例えば可溶性の受容体フラグメント若しくはリガンド、および免疫グロブリン鎖、F c フラグメント、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D および I g E を包含する多様なアイソタイプの H 鎖定常領域を包含し得る。例えば、融合タンパク質は、受容体の細胞外ドメインを包含し得、かつ、例えばヒト免疫グロブリン F c 鎖 (例えばヒト I g G、例えばヒト I g G 1 若しくはヒト I g G 4、またはそれらの変異された形態) に融合され得る。一態様において、ヒト F c 配列は、F c 受容体結合を減少させるために、野性型配列から 1 個若しくはそれ以上のアミノ酸で変異されて (例えば残基 2 5 4 および 2 5 7 で変異されて) いる。融合タンパク質は、第一の部分と第二の部分、例えば免疫グロブリンフラグメントに結合するリンカー配列を付加的に包含し得る。例えば、融合タンパク質は、ペプチドリンカー、例えば長さ約 4 ないし 2 0、より好ましくは 5 ないし 1 0 アミノ酸のペプチドリンカーを包含し得；該ペプチドリンカーは長さ 8 アミノ酸である。例えば、融合タンパク質は、式 (S e r - G l y - G l y - G l y - G l y) y (式中 y は 1、2、3、4、5、6、7 若しくは 8 である) を有するペプチドリンカーを包含し得る。他の態様において、付加的なアミノ酸配列を、発現、立体的可撓性、検出および/または単離若しくは精製を助長するために、融合タンパク質の N 若しくは C 末端に付加し得る。

30

40

#### 【 0 0 8 4 】

本発明のキメラ若しくは融合タンパク質は標準的組換え D N A 技術により製造し得る。例えば、多様なポリペプチド配列をコードする D N A フラグメントを、慣習的技術に従って、例えば平滑端若しくはずらした末端をライゲーションに使用すること、適切な末端を

50

提供するための制限酵素消化、適切なようにの付着端の補填 (filling-in)、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的ライゲーションにより、インフレームと一緒に連結する。別の態様において、融合遺伝子は自動 DNA 合成機を包含する慣習的技術により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントの PCR 増幅を、その後アニーリングしかつ再増幅してキメラ遺伝子配列を生成させ得る 2 個の連続する遺伝子フラグメント間に相補的オーバーハングを生じさせるアンカープライマーを使用して実施し得る (例えば、Ausubel ら (編) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992 を参照されたい)。さらに、融合部分 (例えば免疫グロブリン H 鎖の Fc 領域) をコードする多くの発現ベクターが商業的に入手可能である。免疫グロブリン融合ポリペプチドは当該技術分野で既知であり、かつ、例えば米国特許第 5,516,964 号; 同第 5,225,538 号; 同第 5,428,130 号; 同第 5,514,582 号; 同第 5,714,147 号; および同第 5,455,165 号明細書に記述されている。

#### 【0085】

核酸分子、構築物およびベクター

本発明の例示的態様は、不必要な若しくは望ましくない副生成物、とりわけ不必要な若しくは望ましくない抗体 (若しくは免疫グロブリン) 副生成物を排除するよう設計された、工作された構築物を特徴とする。ある局面において、構築物は天然に存在する抗体遺伝子配列の成分を包含し、該成分は、生じる構築物が不必要な若しくは望ましくない副生成物の非存在下で目的の所望のタンパク質 (例えば抗体) を発現するような、遺伝子的に変えられ、改変され若しくは工作され (例えば遺伝子的に工作され) ている。構築物は、下に詳細に記述されるところの (例えば免疫グロブリン鎖遺伝子の成分を含んでなる) 組換え核酸分子を製造するための技術に認識される技術を使用して生成させ得る。

#### 【0086】

抗体遺伝子配列は: IgG (例えば IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA1、IgA2、IgD 若しくは IgE を包含する多様なアイソタイプの抗体をコードする。好ましくは、抗体遺伝子配列は IgG アイソタイプである抗体をコードする。コードされる免疫グロブリン若しくは抗体分子は完全長 (例えば IgG1 若しくは IgG4 免疫グロブリン) を包含し得るか、若しくは、あるいは、1 フラグメント (例えば Fc フラグメント) のみを包含し得る。

#### 【0087】

本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列が、遺伝暗号および標準的分子生物学技術を使用して、本出願に記述されるヌクレオチドおよびアミノ酸配列、若しくは当該技術分野で既知の免疫グロブリン遺伝子の配列の付加的な供給源から派生され得ることが当業者により認識されるであろう。本発明の核酸組成物は既知の免疫グロブリン DNA (例えば cDNA 配列) 由来でありうる。とりわけ、ヌクレオチド配列は、天然の V、D、J 若しくは定常 cDNA 配列に実質的に同一であっても若しくはそれに由来してもよい。H および L 鎖定常領域遺伝子の配列は当該技術分野で既知である。好ましくは、定常領域はヒトであるが、しかし、他の種、例えばげっ歯類 (例えばマウス若しくはラット)、霊長類 (サル)、ラクダまたはウサギからの定常領域もまた使用し得る。これらの種からの定常領域は当該技術分野で既知であり (例えば Kabat, E. A. ら (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版、米国保健福祉省、NIH 刊行物第 91-3242 号を参照されたい)、そして、これらの領域を包含する DNA フラグメントは標準的 PCR 増幅により得ることができる。H 鎖定常領域は IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 若しくは IgD 定常領域であり得る。H 鎖定常領域の配列は当該技術分野で既知であり、そして例えば NCBI NG\_001019 に見出し得る。いくつかの態様において、定常領域は IgG1 若しくは IgG4 定常領域である。Fc フラグメントの H 鎖遺伝子について、Fc をコードする DNA を、直接発現のため H 鎖リーダー配列 (例えば H 鎖可

変鎖リーダー配列)に効果的に連結し得る。

【 0 0 8 8 】

本発明の付加的な局面は、集成した免疫グロブリンDNAカセット配列を包含する。集成した免疫グロブリンカセット配列は、ヌクレオチド配列、ならびに免疫グロブリンDNAカセットヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を包含する。

【 0 0 8 9 】

例示的ーヒトIgG1定常領域のゲノム配列をここに提供する：

【 0 0 9 0 】

【化 1】

GTGAGTCCTGTCGACTCTAGAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACTTTGG  
CTGGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGCGC  
ACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGT  
TAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCCACACCGCGG  
TCACATGGCACCACCTCTCTTGACGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC  
CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG  
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGC  
GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGAC  
TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA  
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA  
GAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCC  
AGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCAGTCCAGG  
GCAGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCGGAGGCCTCTGCCCCCCCC  
ACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGG  
CACAGGCTAGGTGCCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCT  
GGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCTGCCCCCTGACCTA  
AGCCCCACCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCT  
CCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGT  
GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCG  
CCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGA  
CAGGCCCCAGCCGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCT  
GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA  
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAG  
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGT  
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC  
GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA  
CCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCGAGGGCCACATGGAC  
AGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCT  
CTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC  
CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGG  
CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA  
GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC  
CTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA  
GCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA (配列番号:1)

10

20

30

40

【 0 0 9 1】

例示的 I g G 4 定常領域のゲノム配列をここに提供する。

【 0 0 9 2】

## 【化 2】

GTGAGTCCTGTCGACTCTAGAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACTTTGG  
CTGGGGGCAGGGAGGGGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGCGC  
ACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGT  
TAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCCACACCGCGG  
TCACATGGCACCACTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCC  
CCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCT  
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAG  
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGG  
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACG  
AAGACCTACACCTGCAATGTAGATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC  
AAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAG  
CCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCA  
GGGCAGCAAGGCAGGCCCCATCTGTCTCCTCACCTGGAGGCCTCTGACCACC  
CCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTCCACCAGGCTCCGGGC  
AGCCACAGGCTGGATGCCCCTACCCAGGCCCTGCGCATAAGGGGCAGGT  
GCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCCTGAC  
CTAAGCCCACCCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTC  
TCTCCTCCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATAT  
GGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCA  
GCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCC  
CAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAGTTCC  
TGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCAT  
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGA  
AGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAA  
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGT  
CAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA  
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCC  
AAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCAGGGGCCACATGGACAGAGGTC  
AGCTCGGCCCACCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCC  
TACAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGA  
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA  
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA  
CAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTC  
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT  
CTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA (配列番号:3)

10

20

30

40

## 【0093】

## 抗体製造

本発明の抗体は典型的に組換え発現により製造される。LおよびH鎖をコードする核酸を発現ベクターに挿入し得る。LおよびH鎖は同一若しくは異なる発現ベクターにクローン化し得る。免疫グロブリン鎖をコードするDNAセグメントを、免疫グロブリンポリペ

50

プチドの発現を確実にする発現ベクター（１種若しくは複数）中の制御配列に作動可能に連結する。発現制御配列は、限定されるものでないが、プロモーター（例えば天然に関連する若しくは異種のプロモーター）、シグナル配列、エンハンサー要素および転写終止配列を挙げることができる。好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞（例えばＣＯＳ若しくはＣＨＯ細胞）を形質転換若しくはトランスフェクトすることが可能なベクター中の真核生物プロモーター系である。

【００９４】

上に示されたところの本発明のポリペプチドを提供するための単離された遺伝物質の操作後に、遺伝子を、典型的には、所望の量の改変された抗体を産生させるのに使用しうる宿主細胞中への導入のため発現ベクターに挿入し、該改変された抗体は、順に、特許請求されるポリペプチドを提供する。「ベクター」という用語は、しばしば、核酸例えば遺伝子を包含しかつ核酸の複製、転写、安定性および／またはタンパク質の発現若しくは宿主細胞からの分泌に必要な最小要素をさらに包含する核酸構築物を包含する。こうした構築物は染色体外要素として存在しうるか、若しくは宿主細胞のゲノムに組み込まれる。

10

【００９５】

「発現ベクター」という用語は、核酸構築物が所望のタンパク質産物の高レベル発現のため最適化されている特殊な型のベクターを包含する。発現ベクターは、しばしば、特定の細胞型中での高レベルの転写のため最適化され、かつ／若しくは特定の誘導剤の使用に基づき発現が構成的となるように最適化された、プロモーターおよびエンハンサー要素のような転写調節作用因（agent）を有する。発現ベクターはさらに、タンパク質の適正かつ／若しくは高められた翻訳を提供する配列を有する。当業者に既知のとおり、こうしたベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスよりなる群から容易に選択しうる。「発現カセット」という用語は、遺伝子を含有しかつ宿主細胞中でのその遺伝子の適正な、かつ若しくは高められた発現を見込む要素を該遺伝子に加え有する核酸構築物を包含する。

20

【００９６】

「作動可能に連結される」という用語は、成分が、それらがそれらの意図された様式で機能することを可能にする（例えば機能的に連結される）関係にある並置を包含する。一例として、目的のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター／エンハンサーは、該プロモーター／エンハンサーにより指図される発現を活性化する条件下で目的のポリヌクレオチドの発現が達成されるような前記ポリヌクレオチドに連結される。本明細書に記述される本発明に関して、作動可能に連結されるはまた、目的の遺伝子の一次転写物（pre-mRNA）で見出されるスプライスドナーおよびスプライスアクセプター部位の関係も包含する。通常、スプライスアクセプターおよびドナー部位は、該２配列が必要とされかつスプライシング事象が起こるために一緒に機能して成熟メッセンジャーRNAをもたらすために、作動可能に連結される。

30

【００９７】

「天然の効果的関連」という句は、その天然のすなわち自然の状態で見出される遺伝子のイントロンおよびエキソンの構成を指す。目的の遺伝子のクローニングへの１アプローチは、遺伝子（エキソンおよびイントロンの双方）の核酸を単離すること、ならびに該核酸配列を該核酸配列の増幅のためベクターに挿入することを必要とする。この遺伝子配列全体は、同一若しくは異なる種での該タンパク質の発現に有用な発現ベクターにもまた挿入しうる。イントロンおよびエキソンがそれらの天然の状態で存在することが見出されるように、それらを含有する遺伝子がクローン化される場合、該イントロンおよびエキソンはそれらの天然の効果的関連を保持すると言われる。

40

【００９８】

発現ベクターは、典型的には、エピソーム若しくは宿主染色体DNAの一体の部分のいずれかとして宿主生物体中で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするための選択マーカー（例えばアンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性若しくはネオマイ

50

シン耐性)を含有する(例えばItakuraら、米国特許第4,704,362号明細書を参照されたい)。免疫グロブリンDNAカセット配列、挿入物配列および制御配列に加え、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中での該ベクターの複製を調節する配列(例えば複製起点)および選択可能なマーカー遺伝子のような付加的な配列を運搬しうる。選択可能なマーカー遺伝子はベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする(例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号および同第5,179,017号明細書(全部Axelらによる)を参照されたい)。例えば、典型的には、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、G418、ハイグロマイシン若しくはメトトレキセートのような薬物に対する耐性を賦与する。好ましい選択可能なマーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子(メトトレキセート選択/増幅とともにのdhfr<sup>r</sup>宿主細胞での使用のため)およびneo遺伝子(G418選択のため)を包含する。

10

#### 【0099】

ベクターが適切な宿主に一旦組み込まれれば、該ヌクレオチド配列の高レベル発現ならびに所望の抗体の収集および精製に適する条件下で該宿主を維持する。哺乳動物細胞が本発明の抗体の発現および産生に好ましい。例えば、Winnacker、From Genes to Clones、VCH Publishers、ニューヨーク州ニューヨーク(1987)を参照されたい。真核生物細胞は、異種タンパク質(例えば無傷の免疫グロブリン)を分泌することが可能な多数の適する宿主細胞株が当該技術分野で開発されているために好ましく、そしてCHO細胞株、多様なCOS細胞株、HeLa細胞、好ましくは骨髓腫細胞株、または形質転換されたB細胞若しくはハイブリドーマを包含する。好ましくは、細胞はヒト以外である。本発明の抗体を発現するための好ましい哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(例えばKaufmanとSharp(1982)Mol. Biol. 159:601-621に記述されるとおり、DHFR選択可能マーカーとともに使用される、UrlaubとChasin(1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記述されるdhfr<sup>r</sup> CHO細胞を包含する)、リンパ球細胞株、例えばNSO骨髓腫細胞およびSP2細胞、COS細胞、ならびにトランスジェニック動物由来の細胞、例えば哺乳類上皮細胞を包含する。他の適する宿主細胞は当業者に既知である。

20

#### 【0100】

これらの細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーターおよびエンハンサーのような発現制御配列(Queenら、Immunol. Rev. 89:49(1986))、ならびにリボソーム結合部位、RNAスプライス部位のような必要なプロセッシング情報部位、ポリアニデル化部位ならびに転写終結配列を包含し得る。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシバピローマウイルス、サイトメガロウイルスなど由来のプロモーターである。例えばCoら(1992)J. Immunol. 148:1149を参照されたい。哺乳動物宿主細胞発現のための好ましい制御配列は、FF-1aプロモーターおよびBGHポリA、サイトメガロウイルス(CMV)(CMVプロモーター/エンハンサーのような)、SV40(SV40プロモーター/エンハンサーのような)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス主後期プロモーター(AdMLP))ならびにポリオーマ由来のプロモーターおよび/若しくはエンハンサーのような、哺乳動物細胞中での高レベルのタンパク質発現を指図するウイルス要素を包含する。ウイルスの調節要素およびそれらの配列のさらなる記述については、例えば、Stinskiによる米国特許第5,168,062号、Bellらによる米国特許第4,510,245号、およびSchaffnerらによる米国特許第4,968,615号明細書を参照されたい。例示的態様において、抗体HおよびL鎖遺伝子は、該遺伝子の高レベルの転写を駆動するために、(例えば、CMVエンハンサー/AdMLPプロモーター調節要素若しくはSV40エンハンサー/AdMLPプロモーター調節要素のようなSV40、CMV、アデノウイルスなど由来の)エンハンサー/プロモーター調節要素に効果的に連結される。本発明の例示的態様において、該構築物は、真核生物宿主細胞中で比較的

30

40

50

高レベルの本発明のポリペプチドを提供するために配列内リボソーム進入部位 (IRES) を包含する。適合性の IRES 配列は米国特許第 6, 193, 980 号明細書 (また本明細書に組み込まれる) に開示されている。

#### 【0101】

あるいは、抗体をコードする配列は、トランスジェニック動物のゲノムへの導入および該トランスジェニック動物の乳中でのその後の発現のため導入遺伝子に組み込み得る (例えば、Deboer ら、米国特許第 5, 741, 957 号、Rosen、米国特許第 5, 304, 489 号、および Meada ら、米国特許第 5, 849, 992 号明細書を参照されたい)。適する導入遺伝子は、カゼイン若しくは  $\beta$ -ラクトグロブリンのような乳腺特異的遺伝子からのプロモーターおよびエンハンサーと作動可能な連結にある L および / 若しくは H 鎖のコーディング配列を包含する。

10

#### 【0102】

原核生物宿主細胞もまた本発明の抗体の製造に適する。大腸菌 (E. coli) は本発明のポリヌクレオチド (例えば DNA 配列) をクローン化するのにとりわけ有用な一原核生物宿主である。使用に適する他の微生物宿主は、枯草菌 (Bacillus subtilis) のような桿菌、エシェリキア属 (Escherichia)、サルモネラ属 (Salmonella) およびセラチア属 (Serratia) のような腸内細菌科、ならびにシュードモナス属 (Pseudomonas) 種を包含する。これらの原核生物宿主中で、典型的には宿主細胞と適合性の発現制御配列 (例えば複製起点) を含有することができる発現ベクターもまた作成し得る。加えて、乳糖プロモーター系、トリプトファン (trp) プロモーター系、 $\beta$ -ラクタマーゼプロモーター系若しくはファージ  $\lambda$  からのプロモーター系のようないずれかの数の多様な公知のプロモーターが存在することができる。プロモーターは、典型的には、場合によってはオペレーター配列とともに発現を制御することができ、また、転写および翻訳を開始かつ完了するためのリボソーム結合部位配列などを有することができる。

20

#### 【0103】

原核生物でのタンパク質の発現は、最もしばしば、融合若しくは非融合いずれかのタンパク質の発現を指図する構成的若しくは誘導可能なプロモーターを含有するベクターを含む大腸菌 (E. coli) で実施する。融合ベクターは、その中にコードされる抗体、しばしば組換え抗体の定常領域に、該抗体の特異性若しくは抗原認識に影響を及ぼすことなく多数のアミノ酸を付加する。融合ペプチドのアミノ酸の付加は、該抗体に例えばマーカ (例えば myc 若しくは flag のようなエピトープ標識) としての付加的な機能を付加し得る。

30

#### 【0104】

酵母のような他の微生物もまた発現に有用である。サッカロミセス属 (Saccharomyces) は好ましい酵母宿主であり、適するベクターは、発現制御配列 (例えばプロモーター)、複製起点、終止配列などを所望のとおり有する。典型的なプロモーターは 3-ホスホグリセリン酸キナーゼおよび他の解糖酵素を包含する。誘導可能な酵母プロモーターは、とりわけ、アルコール脱水素酵素、イソチトクローム C、ならびに麦芽糖およびガラクトース利用を司る酵素からのプロモーターを包含する。

40

#### 【0105】

あるいは、本発明の抗体はトランスジェニック植物 (例えばタバコ、トウモロコシ、ダイズおよびアルファルファ) 中で産生させ得る。形質転換可能な作物種の増大と結びつけられた、改良された「プラントィボディ (plantibody)」ベクター (Hendy ら (1999) J. Immunol. Methods 231: 137-146) および精製戦略が、こうした方法を、ヒトおよび動物治療のためのみならずしかし同様に工業的応用 (例えば触媒的抗体) のための組換え免疫グロブリンの実務的かつ効率的な製造手段にする。さらに、植物で産生された抗体は安全かつ有効でありかつ動物由来物質の使用、および従って伝染性海綿状脳症 (TSE) 病原体での汚染の危険を回避することが示された。さらに、植物および哺乳動物細胞で産生された抗体のグリコシル化パターンの差違

50

は、抗原結合若しくは特異性に対しほとんど若しくは全く影響を有しない。加えて、毒性すなわちHAMAの証拠は、植物由来の分泌型二量体IgA抗体の局所経口適用を受領する患者で観察されていない(例えばLarrickら(1998) Res. Immunol. 149: 603 - 608を参照されたい)。

#### 【0106】

多様な方法を使用してトランスジェニック植物で組換え抗体を発現させうる。例えば、抗体HおよびL鎖を発現ベクター(例えばアグロバクテリウム ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)ベクター)に独立にクローン化し得、次いで組換え細菌、若しくは、例えば、例えば弾道学を使用してその後植物組織中に物理的に導入されるベクターで被覆した粒子を使用する直接形質転換で植物組織をin vitroで形質転換し得る。その後、個々の鎖を発現する植物全体を再構成し、次いでそれらを性的交雑し、最終的に完全に集成されかつ機能的な抗体の産生をもたらす。同様のプロトコルが、タバコ植物中で機能的抗体を発現させるのに使用された(例えばHiattら(1989) Nature 342: 76 - 78を参照されたい)。多様な態様において、シグナル配列を利用して、適切な植物環境(例えばアポプラズム、または塊茎、果実若しくは種子を包含する他の特定の植物組織の水性環境)に鎖を向けることにより、未集成の抗体鎖の発現、結合およびフォールディングを促進しうる(Fiedlerら(1995) Bio/Technology 13: 1090 - 1093を参照されたい)。植物バイオリアクターもまた、抗体収量を増大させかつ費用を大きく低減させるのに使用し得る。

#### 【0107】

適する宿主細胞は、Goeddel(1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185、Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴにさらに論考されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えばT7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを使用してin vitroで転写および翻訳し得る。

#### 【0108】

目的のポリヌクレオチド配列(例えばHおよびL鎖をコードする配列ならびに発現制御配列)を含有するベクターを、細胞宿主の型に依存して変動する公知の方法により宿主細胞に移入し得る。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは原核生物細胞に一般に利用される一方、リン酸カルシウム処理、電気穿孔法、リポフェクション、遺伝子銃若しくはウイルスに基づくトランスフェクションを他の細胞宿主に使用しうる。(全般として、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press、第2版、1989)(全部の目的上そっくりそのまま本明細書に引用することにより組み込まれる)を参照されたい)哺乳動物細胞を形質転換するのに使用される他の方法は、ポリブレン、プロトプラスト融合、リポソーム、電気穿孔法および微小注入法の使用を包含する(全般として、Sambrookら、上記を参照されたい)。トランスジェニック動物の製造のためには、導入遺伝子を受精卵母細胞に微小注入し得るか、若しくは胚性幹細胞のゲノムに組み込み得、そしてこうした細胞の核を除核卵母細胞に移入し得る。

#### 【0109】

HおよびL鎖を別個の発現ベクターにクローン化する場合、該ベクターをコトランスフェクトして無傷の免疫グロブリンの発現および集成を得る。一旦発現されれば、本発明の抗体全体、それらの二量体、個々のLおよびH鎖、若しくは他の免疫グロブリンの形態を、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、HPLC精製、ゲル電気泳動などを包含する、当該技術分野の標準的手順に従って精製し得る(全般として、Scopes、Protein Purification(Spiringer-Verlag、ニューヨーク、(1982)を参照されたい)。製薬学的使用のためには最低約90ないし95%均一な実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、そして98ないし99%若しくはそれ以上の均一性が最も好ましい。

## 【0110】

本発明の分子に従って製造される免疫グロブリン若しくは抗体は、誘導体化し得るか、または別の機能的分子（例えば別のペプチド若しくはタンパク質）に連結し得る。従って、本明細書に記述される本発明の抗体および抗体部分若しくは該抗体の別の方法で改変された形態を、研究、診断および／若しくは治療の状況での使用のためさらに誘導体化しうる。例えば、本発明の抗体若しくは抗体部分を、別の抗体（例えば二特異性抗体（*bispecific antibody*）すなわち二特異性抗体（*diabody*））、検出可能な剤、細胞傷害剤、製薬学的剤、および／または（ストレプトアビジンコア領域若しくはポリヒスチジン標識のような）別の分子との該抗体若しくは抗体部分の関連要素（*associate*）を媒介し得るタンパク質若しくはペプチドのような、1種若しくはそれ以上の他の分子実体に（化学結合、遺伝子融合、非共有会合により、若しくは別の方法で）機能的に連結し得る。

10

## 【0111】

1つの型の誘導体化した抗体は、2個若しくはそれ以上の（同一の型、若しくは例えば二特異性抗体を創製するための異なる型の）抗体を架橋することにより製造する。適する架橋剤は、適切なスペーサー（例えば*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル）により分離された2個の極めて反応性の基を有するヘテロ二官能性若しくはホモ二官能性（例えばジスクシンイミジルスベラート）であるものを包含する。こうしたリンカーは *Pierce Chemical Company*、イリノイ州ロックフォードから入手可能である。

20

## 【0112】

例示的な蛍光の検出可能な剤は、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、塩化5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニル、フィコエリトリンなどを包含する。抗体はまた、アルカリホスファターゼ、ワサビペルオキシダーゼ、*P*-ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼなどのような検出可能な酵素でも誘導体化しうる。抗体を検出可能な酵素で誘導体化する場合、それは検出可能な反応生成物を生じるのに該酵素が使用する付加的な試薬を添加することにより検出する。例えば、検出可能な剤ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加が、検出可能である着色した反応生成物につながる。抗体は補欠分子族（例えばストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチン）でもまた誘導体化しうる。例えば、抗体をビオチンで誘導体化しかつアビジン若しくはストレプトアビジン結合の間接測定により検出しうる。適する蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド若しくはフィコエリトリンを包含し；発光物質の一例はルミノールを包含し、生物発光物質の例はルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンを包含し、そして適する放射活性物質の例は $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 若しくは $^3\text{H}$ を包含する。抗体（若しくはそのフラグメント）は、細胞毒若しくは他の治療的タンパク質のような治療的部分にもまた複合しうる。あるいは、抗体を第二の抗体に複合して、米国特許第4,676,980号明細書に *Segal* により記述されるところの抗体ヘテロ複合物を形成し得る。

30

40

## 【0113】

不必要なポリペプチド副生成物を減少若しくは排除するための発現ベクター

治療的タンパク質のためのタンパク質発現系の開発の間に、精製された標的生成物の *HPLC* 分析がペプチドの期待されない低分子量（*LMW*）種を同定した。より具体的には、望ましくないポリペプチド副生成物が、3D6抗体を発現させるために開発したCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞株で観察された。この抗体は別の場所に記述されており、そして、アルツハイマー病の処置に有用な免疫治療薬を開発するための努力の結果である。それはAβペプチドに対する特異性を有し、また、Aβ斑の消失において有効であることが示された。該CHO細胞株は、技術に認識された方法を使用して開発され、そして、発現カセット含有細胞の選択的培養のための遺伝子に加えて3D6抗体のHおよび

50

L鎖のコピーを含有した。

【0114】

該細胞株の多数のクローン単離物の検査は、LMW種の産生が、利用されているクローンに特異的な現象でなかったことを示した。すなわち、試験した細胞株の全部で産生された全タンパク質の小画分が期待されないLMW種のものであった。全タンパク質に関してのLMW種の画分はタンパク質発現が誘導された場合に増大したことがさらに観察された。質量分析を使用する該ポリペプチドのさらなる評価は、LMW種が該遺伝子のエキソン配列により予測されないアミノ酸を含有したことを示した。

【0115】

図1の上図は、イントロンおよびエキソンの関係ならびに配列内リボソーム進入部位(IRES)およびジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の選択可能なマーカー遺伝子の位置を示す、3D6H鎖発現カセットを図で提示する。示されるエキソンは、可変領域(V<sub>H</sub>1)、ヒンジならびに定常H1、2および3(C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3)である。発現カセットのイントロンはInt1、Int2、Int3およびInt4を示される。図1はさらに、該発現カセット由来のmRNAについての予測される正確なスプライシング事象を具体的に説明する。中図は、該2シストロン性転写物のイントロン配列のみを含有する正確にスプライスされたmRNAを示す。

【0116】

発現ベクター中のイントロンおよびエキソン配列の精査ならびに質量分析データは、特異的スプライス部位の接合部のRNAポリメラーゼのイントロンリードスルー(IRT)を指摘した。該発現ベクターに含有されるイントロンおよびエキソンならびにスプライス部位のドナーおよびアクセプター部位の構成は、それらが該遺伝子の元のゲノムの形態中に存在したところのものに実質的に同一であったため、誤ったスプライシング事象は予測可能でなかった。

【0117】

図1の下図は、第四のイントロンのイントロンリードスルーにより生成される予測された生成物を具体的に説明する。図2は、該3D6抗体発現ベクターのゲノム配列の第四のイントロンの領域のDNA配列のセンスおよびアンチセンス鎖を示す配列情報を提供する。スプライス接合物(スプライスドナーおよびアクセプター部位)を核酸配列に垂直な縦線により示す。イントロン配列に対応するDNAは下線をつけかつ斜体で示す。所望のおよびリードスルー副生成物のポリペプチドの予測されるアミノ酸を、ゲノムDNAのアンチセンス鎖の下に示す。正確にスプライスされたRNA由来のポリペプチドのアミノ酸配列を太字の大文字で示し；不正確にスプライスされたRNA由来のポリペプチド副生成物を小文字で示す。

【0118】

本発明は、イントロンリードスルー(IRT)および不必要なポリペプチド副生成物が実質的に減少若しくは完全に排除されるようなタンパク質発現カセットおよびベクターを設計するための材料および方法を記述する。部分的に、本発明は、IRTが減少若しくは排除されてそれにより不必要なIRTポリペプチド種を減少若しくは排除するような、目的のタンパク質をコードする単離された核酸中のイントロンおよびエキソンの天然の効果的関連が変えられているベクターの新規設計に提供する。該独特な変化はIgG1若しくはIgG4抗体にとりわけ適するが、しかし目的のいかなる遺伝子にも使用しうる。さらに、変えられた天然の効果的関連を伴うイントロンおよびエキソンを有する本発明のベクターは、標準的な技術に認識された技術を使用して設計されたベクターに関して、減少若しくは排除されたIRT副生成物のみならず、しかしまた増大された発現レベルも示す。

【実施例】

【0119】

材料および方法

本実施例を通じ、以下の本文に例示されるところの材料および方法を、別の方法で述べられない限り使用した：

10

20

30

40

50

一般に、本発明の実務は、分子生物学、組換えDNA技術、および免疫学、とりわけ例えば抗体技術における技術に認識された技術を使用する。例えば、Sambrook、FritschとManiatis、Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)、510、Paul, S., Human Press (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series、169)、McCafferty編 IRL Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual、Harlowら Cold Spring Harbor Press、(1999); および Current Protocols in Molecular Biology Ausubelら編 John Wiley & Sons (1992) を参照されたい。

10

#### 【実施例 1】

#### 【0120】

#### イントロンリードスルー転写の定量

イントロンリードスルーにより形成される異常な転写物の相対量を定量するため、定量的PCRアッセイを設計した。IRT転写を評価するためのアプローチを図3に図で概説する。具体的には、定量的PCRアッセイを、PCR増幅を使用して目的の核酸種を定量したTaqMan 3系を使用して考案した。3種のプローブ-プライマーの組を、產生されているイントロンリードスルーmRNAの画分を測定するよう設計した。第一のプローブ-プライマーの組は、目的のイントロンと天然の効果的関連にあるエキソンの配列の転写のレベルを定量するように設計した。3D6 H鎖発現カセットの場合には、3D6の第二の定常H鎖(CH2)エキソンを含有するmRNA種を標的とした。これは全3D6 mRNA 産生の尺度を提供した。第二のプローブ-プライマーの組は、効果的関連にあるイントロンおよびエキソン(ここでは3D6発現カセットのCH2エキソン-第四のイントロンの界面)を架橋した。このプローブ-プライマーの組に由来する増幅は、5'スプライスドナー配列を含有するイントロンリードスルー転写物、ならびにCH2エキソンおよびイントロン4を架橋する配列の存在を示した。第三のプローブ-プライマーの組は第四のイントロンの配列を標的とした。このプローブ組は、内的イントロン4配列を含んでなる不正確にスプライスされたRNAの画分の定量を提供した。

20

30

#### 【0121】

図4は、記述されたところのプローブ-プライマーの組を使用するQ-PCRアッセイの結果を示す。簡潔には、安定に組込まれた発現ベクターを含有するCHO細胞を接種し、そして培養物中で2週間維持した。第7日に、タンパク質発現を増大させるため培養物を誘導した。実験の経過の間に、細胞培養物のサンプルを溶解し、そして先行する段落に記述されたとおり、CH2エキソンに特異的若しくはイントロンに特異的なプローブおよびプライマーの組を使用するアッセイでRNAの内容を評価した。該図は、誘導前の不正確にスプライスされたRNA産物の低レベル、および誘導後の時間にわたるイントロン4を含有するRNAの増大する比率を示す。ここに記述されるこのQ-PCR方法は、天然の効果的関連にあるイントロンおよびエキソンを含有する特定の1発現カセットがイントロンリードスルー副生成物を生じるであろうという見込みを予測する。

40

#### 【0122】

3D6抗体発現系のIRTを定量するための詳細がはっきりと提供される一方、該技術は、IRTの可能性が存在するいかなるタンパク質発現系でも実行し得る。この新規アプローチは、従って、本発明のベクター(下に詳細に記述される)を、不必要なIRTポリペプチド副生成物の産生が回避されるような目的の特定のタンパク質に採用すべきであるかどうかを評価するためにとりわけ有用である。IRT転写が約0.1%~1%以上の豊富さにある場合、変えられた天然の効果的関連を使用するベクターを使用して所望のタンパク質を発現させ得る。イントロンリードスルーmRNAの検出方法、およびこれゆえに

50

イントロンリードスルーポリペプチドの予測方法は、スプライシング事象が発生するいかなるタンパク質発現系にも応用可能であることが、当業者に容易に明らかであろう。例えば、該系は、いずれの真核生物細胞系、例えばサッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、ドロソフィラ属 (*Drosophila*)、マウス、サル、ウサギ、ラット若しくはヒト細胞に基づく系とともに使用しうる。

【実施例 2】

【0123】

改変された天然の効果的関連を有するイントロンおよびエキソンを含むベクター

イントロンおよびエキソンの天然の効果的関連が改変された発現ベクターを考案した。2種の例示的ベクター配列を図5に示す。この図は、イントロンリードスルー副生成物の問題を解消するため開発された発現構築物を具体的に説明する。上図は、可変領域 ( $V_H$ )、3種の定常領域 ( $C_H1$ 、 $C_H2$ 、 $C_H3$ ) およびヒンジ領域のエキソンを含有する包括的な抗体H鎖のゲノムすなわちイントロン-エキソンの構成を図で描く。中および下図は、イントロンリードスルーH鎖副生成物を排除した発現ベクターに組み込まれたゲノム配列に対する改変を記述する。

10

【0124】

3D6 L鎖を発現するCHO細胞を、3D6抗体の完全なゲノムH鎖配列で形質転換したか、若しくは、イントロンおよびエキソンの天然の効果的関連が改変された、改変3D6 H鎖発現ベクターで形質転換したかのいずれかであった。細胞を、材料および方法で記述されたところのタンパク質発現の目的上標準的な技術を使用して培養した。抗体を馴化上清から精製し、そしてその後変性逆相 (RP) HPLCを使用して分画した (図6)。抗体のHおよびL鎖構成要素が分離されたようなカラムを運転した。

20

【0125】

3D6ゲノムクローンタンパク質調製物の分画を表す上のトレースで、HおよびL鎖のピークが容易に明白である。加えて、小さなピークが、H鎖イントロンリードスルー生成物に対応する、HとL鎖の間に分画して識別され得る。

【0126】

下のトレースはイントロンリードスルーの問題が低下された発現系の一例である。上のトレースでのとおり、L鎖およびH鎖ピークは明瞭に存在するが、しかしながら、IRTのレベルは検出限界より下に低下した。該知見は、エキソンおよびイントロンの天然の効果的関連が変えられた他のベクターに拡大された。例えば、図5に記述されるHCΔイントロン4配列は、同様にIRTを検出不可能なレベルに低下させる。

30

【0127】

表1は図5に記述されるHCΔイントロン4配列の詳細を示す。

【0128】

## 【表 1】

表 1: hu3D6 v2 HC - Δ4

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGA  
 GGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGCGGGCGGCTGGTGCAGCCCGGCGGCTCCCTGCGCCTGT  
 CCTGCGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACCTACGGCATGTCCTGGGTGCGCCAGGCC  
 CCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCTCCATCCGCTCCGGCGGGCGGCCACCTACTA  
 CTCCGACAACGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCCGCGACAACCTCCAAGAACACCCCTGT  
 ACCTGCAGATGAACTCCCTGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGCCTAC  
 GACCACTACTCCGGCTCCTCCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTC  
 CGGTGAGTCTGTGCACTCTAGAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACTTTGGCTGGG  
 GGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGCGCACACCCAATGCCCA  
 TGAGCCCAGACCTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCCCTCTGCGC  
 CCTGGGGCCAGCTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGACGCTCC  
 ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA  
 GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAA  
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACT  
 CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA  
 TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGC  
 CAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCA  
 TCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGCTCTCTCTTACCCG  
 GAGGCCTCTGCCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCCCAGG  
 CTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGTG  
 CTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCA  
 CCCCCAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCTCCAGATTCC  
 AGTAACCCCAATCTTCTCTCTGCAAGGCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCC  
 ACCGTGCCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCC  
 CTAGAGTAGCCTGCACCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATC  
 TCTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCTCCCCCAAACC  
 CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG  
 CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATG  
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACACACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCTCA  
 CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA  
 GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC  
 ACAGGTGTACACCCGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC  
 CTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC  
 AGCCGGAGAACAACTACAAGACCCGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC  
 TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC  
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCG  
 GGTAAATGA

10

20

30

## 【実施例 3】

## 【0129】

40

イントロンの除去はタンパク質発現を増大させる

抗体発現に対するイントロン除去の影響を決定するため、抗体の発現構築物を、異なる数のイントロンを用いて創製した。12A11v3、1の可変領域をCHO細胞中で安定に発現させ、3種の定常領域発現構築物は、ゲノム配列、cDNA配列、ならびに3個のイントロンが欠失されたゲノム配列（すなわち、CH1とヒンジ領域の間のイントロン、ヒンジ領域とCH2の間のイントロン、およびCH2とCH3の間のイントロン）を含有した。12A11v3、1について、イントロンの除去は抗体発現の有意の増大を与えた。より具体的には、発現の約5倍の増大が、ゲノム配列に比較して12A11v3、1の3イントロン欠失構築物で検出された。cDNA配列を有する12A11v3、1構築物は、ゲノム配列に関して、発現の6倍を上回る増大を示した。一方、良好に発現された抗

50

体は、典型的に、イントロン欠失配列とゲノム配列の間のC H O細胞の発現の有意の変化を示さなかった。

#### 【0130】

前述の発明は理解の明瞭さの目的上詳細に記述されたとは言え、付随する請求の範囲の範囲内である種の改変が実施されることが明らかであろう。本明細書で引用される全部の刊行物および特許文書、ならびに図および配列表に出現する文言は、それぞれがそのように個々に示された場合と同一の程度まで、全部の目的上そっくりそのまま引用することによりここに組み込まれる。

#### 【0131】

本明細は、ここに引用することにより組み込まれる、本明細内で引用される参考文献の教示を鑑みて最も徹底的に理解される。本明細内の態様は本開示の態様の具体的説明を提供し、そして、その範囲を制限すると解釈されるべきでない。当業者は、多くの他の態様が本開示により包含されることを容易に認識する。本開示で引用される全部の刊行物および特許、ならびに受託若しくはデータベース参照番号により同定される配列は、そっくりそのまま引用することにより組み込まれる。引用することにより組み込まれる資料が本明細と矛盾する、すなわち一致しない程度まで、本明細はいかなるこうした資料にも取って代わるであろう。本明細書のいかなる参考文献の引用も、こうした参考文献が本開示の先行技術であることの承認ではない。

10

#### 【0132】

別の方法で示されない限り、請求項を包含する本明細で使用される成分、細胞培養物、処置条件などの量を表す全部の数字は、「約」という用語により全部の場合で修飾されていると理解されるべきである。従って、別の方法で示されない限り、逆に、数値パラメータは近似値であり、そして本発明により得られることを探求される所望の特性に依存して変動しうる。別の方法で示されない限り、一連の要素に先行する「最低」という用語は、該一連のすべての要素を指すと理解されるべきである。当業者は、わずかに慣例の実験を使用して、本明細書に記述される本発明の特定の態様に対する多くの同等物を認識するか若しくは確認することが可能であろう。こうした同等物は、以下の請求の範囲により包含されることを意図している。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0133】

30

【図1】3D6 IgG遺伝子(上)ならびに正確にスプライスされたmRNA(中)およびイントロンリードスルーmRNA(下)を含有する、発現ベクターから転写された期待されるプレmRNAを描く。

【図2】ゲノムの5'および3'スプライス接合部を示す、3D6 H鎖発現ベクターのCH2とCH3定常領域の間のイントロン(第四のイントロンと称される)にわたる核酸配列(配列番号7)を示す。正確に(配列番号8)および不正確に(配列番号9)スプライスされたmRNA由来のポリペプチドの予測される部分的アミノ酸配列もまた示す。RNAスプライス接合部は二重実線により示す。

【図3】3D6 H鎖遺伝子転写の総レベル(CH2 mRNA転写物のレベル)およびイントロン4のリードスルー転写のレベルを評価するのに使用した定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)プローブの図解である。

40

【図4】培養の時間およびタンパク質発現の誘導に応答してのイントロン4含有転写物の増大された蓄積を示す棒グラフである。

【図5】3D6 イントロンおよびエキソンのゲノム配置、ならびにイントロンリードスルー転写を解消するため開発された発現ベクターで使用した改変された配置の図を提供する。

【図6】改変された発現ベクターで形質転換した細胞株でのイントロンリードスルーH鎖副生成物の欠如を示す逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)のクロマトグラムを示す。

【図7】H鎖ゲノム構築物中のイントロンおよびエキソン、構築物、最後3イントロン配

50

列が欠失された構築物、ならびにイントロンを含有しないcDNA構築物の配置を描く。

【図8】ヒトIgG1のゲノムヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列を示す（それぞれ配列番号1および2に示される）。C<sub>H</sub>1、ヒンジ領域、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3をコードするエキソンは、それぞれほぼヌクレオチド231ないし524、916ないし960、1079ないし1408および1506ないし1829（配列番号1）に位置する。Int1、Int2、Int3およびInt4は、それぞれほぼヌクレオチド1から230まで、ほぼヌクレオチド525ないし915、ほぼヌクレオチド961ないし1078およびほぼヌクレオチド1409ないし1505（配列番号1）に位置するヒトIgG1 H鎖ゲノム配列からのイントロンに対応する。

【図9】ヒトIgG4のゲノムヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列を示すが（それぞれ配列番号3および4）に示される。C<sub>H</sub>1、ヒンジ領域、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3をコードするエキソンは、それぞれほぼヌクレオチド231ないし524、916ないし952、1071ないし1400および1498ないし1820（配列番号3）に位置する。Int1、Int2、Int3およびInt4は、それぞれほぼヌクレオチド1から230まで、ほぼヌクレオチド525ないし916、ほぼヌクレオチド953ないし1070およびほぼヌクレオチド1401ないし1497（配列番号3）に位置するヒトIgG4 H鎖ゲノム配列からのイントロンに対応する。

【図10】定常領域のC<sub>H</sub>2とC<sub>H</sub>3の間のイントロンが欠失されているヒトIgG1のゲノムヌクレオチド配列（配列番号5）を示す。

【図11】以下のイントロン、すなわち、C<sub>H</sub>1とヒンジの間のイントロン、ヒンジとC<sub>H</sub>2の間のイントロン、およびC<sub>H</sub>2とC<sub>H</sub>3の間のイントロンの欠失を有する、改変されたヒトIgG4のゲノムヌクレオチド配列（配列番号6）を示す。

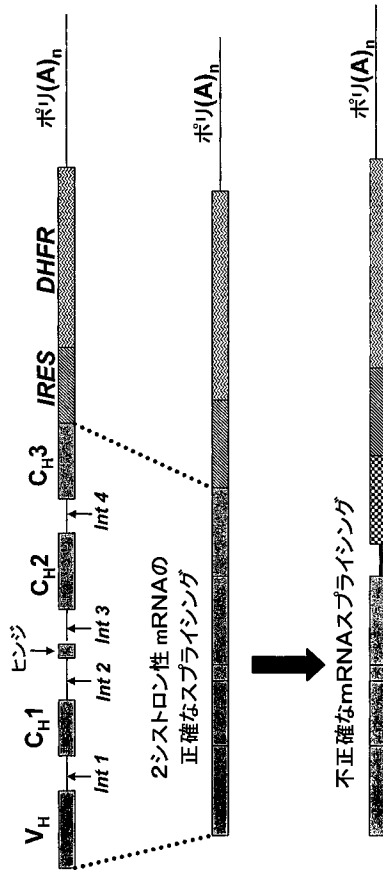
【図12 -】多様な付加的な3D6、10D5、12B4および226抗体のH鎖アミノ酸配列を示す。

【図 -】多様な付加的な3D6、10D5、12B4および226抗体のH鎖アミノ酸配列を示す。

10

20

【図 1】



【図 3】

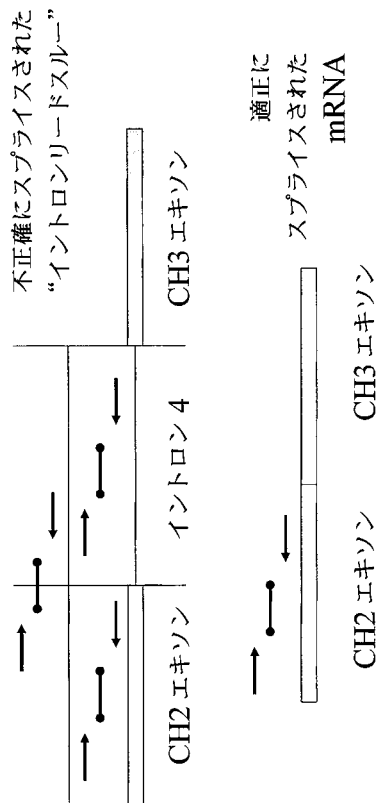


Figure 3

【図 2】

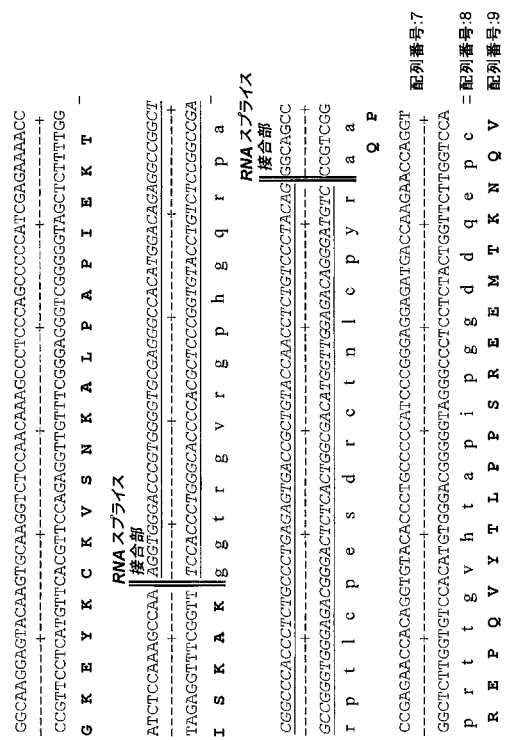


Figure 2

【図 5】

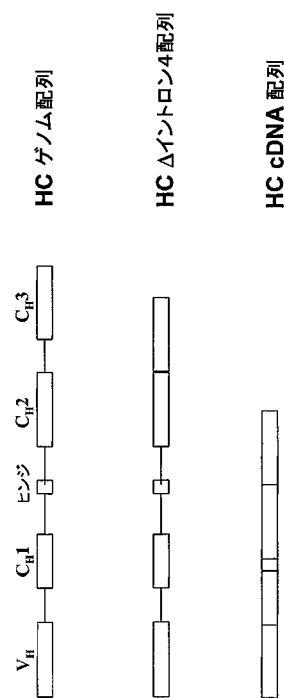
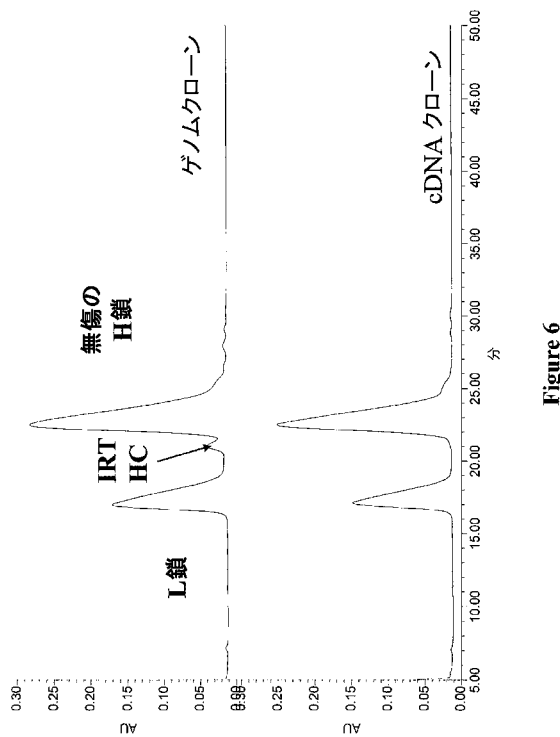


Figure 5

【 図 6 】



【 図 8 】

|      |              |             |             |             |             |              |
|------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 1    | GTGAGTCTCTAG | TCCATCTCTAG | AGCCTTCTGG  | GCGAGCCAGC  | GCCCTGACATT | GGCTGGGGGG   |
| 4    | AGGAGAGGGGG  | TCAAGGTGAG  | AGGAGTGGCG  | CAGCAGAGCG  | CAGACACCCAA | TGCCCATATGAG |
| 13   | CCCGACAGAG   | GTGACGTGAA  | CGCTCGGGAC  | AGATTGAAGAA | CAGAGGGCGCT | CTGGCGCGGAGT |
| 183  | GGGCCACAGCT  | GTGTCCCACAG | CGGTGTGACCA | TGGCACCACC  | CTCTTGGCAG  | CGTCCCACCAA  |
|      |              |             |             |             |             | A S T K      |
| 241  | GGGCCCATCTG  | GTCTTCCCCC  | TGGCACCCCT  | CTCCACAGAGC | ACCTCTGGGG  | GAGCAGCGCG   |
|      | G P S        | V F P       | L A P S     | S K S       | T S G       | G T A A      |
| 301  | CTCTGGCGTGC  | CTGTGTCAAGG | D T C T A G | CGAAGCGSTG  | ACGGTGTGCT  | GAACCTTAGG   |
|      | L C          |             |             |             | T V S       | P N S D      |
| 361  | CGCGCTGACC   | AGGGCGTCCG  | ACAGCTTCCC  | GGCTCTGCTA  | CAGTCCCTAG  | GACTCTACTS   |
|      | A L T        | S G V       | H T F P     | A V L       | Q S S       | G L Y S      |
| 423  | CTCCAGCAGC   | GTGTGTGACG  | TGCCGCTCAC  | CAGGTTGGGC  | ACCCACAGCT  | ACATCTGCAA   |
|      | L S S        | V V T       | V P S S     | S L G       | T Q T       | Y I C N      |
| 481  | CGTGAATCAG   | AAGGCCACCA  | ACACCAAGAT  | GGACACAGAA  | TTTGGTGAGA  | GGCCAGCACA   |
|      | V N H        | K P S       | N T K V     | D K K       | V           |              |
| 541  | GGGAGGAGAA   | GTGTCTGCTG  | GAAGCGACGC  | TCAAGCGCTC  | TGGCTTGAGC  | CATCCCGCCT   |
| 601  | ATGAGGATGCC  | AGTTCAGAGG  | AGCAAGCAGC  | CGGCCGCTGT  | CGTCTTGAGG  | CGAGAGCGGT   |
|      |              | AGCTATGCTC  | AGGAGAGAGG  | TTCTCTGGCT  | CTTTCAGC    | CGTCTGAGCA   |
| 721  | CGCGTACGAA   | AGTGTCTGCT  | CAGGAGAGAG  | CTGCACACAA  | AGGCGACGAT  | AGTCTGAGCA   |
| 781  | GACCTGCACCA  | GACCTCATATC | CGGAGAGAGC  | CTGGCGCTCA  | CTGACGCCA   | CCCCAAAGCC   |
| 841  | CAACTCTCTC   | ACTCTCCTAG  | CTCGGACAGC  | TTCTCTCGTC  | CCAGATGCCA  | GTAATCTCCA   |
|      | TTCTTCTCTC   | TGCAGAGAGC  | AAATCTTTGT  | ACAAACACTA  | CAGATGCCA   | CGCTGCCAGC   |
|      |              | E P K       | S K S       | D K H T     | T C P       | P C P        |
| 901  | GTAAGGCCAG   | CAGCGCTCTC  | CGCTCCAGGC  | CAGGCGGGGA  | CAGGTCGCCCT | AGAGTAGCCT   |
| 1021 | GCATCCACGG   | GACGCGCCCA  | GCCGCGGTGCT | GATACCTCCA  | CGTGCATCTC  | TTCTCTAGCA   |
|      |              |             |             |             |             | A            |
| 1081 | CGTGAACCTC   | GGGCGGAGCC  | GTGAGTCTTC  | LTCTTGCCG   | CAAAAGCCAA  | GGACACAGCT   |
|      |              | L G G P     | S V F V     | L T F       |             |              |
| 1141 | ATGATCTCCC   | TGAGCCCTGA  | GGTCACATGC  | GTGGTGGTGC  | AGTGTCAGCA  | CAGAGACCTT   |
|      | M I S        | R T P E     | V T C       | V V V       | D V S H     | E D P        |
| 1201 | GAGGTCAAGT   | TCATCTGTGA  | CTGGAGCGGC  | GGGAGGTGC   | ATAATGCCAA  | GACAAAGCCG   |
|      | E V K        | F N W Y     | V D G       | V E V       | H N A K     | T K P        |
| 1261 | CGGGGAGGAG   | AGTACACACG  | CAGCTAGCGT  | GTGGTCACGG  | TCCTCAACGT  | CTGCACAGG    |
|      | R E E        | Q Y N S     | T Y R       | V V S       | V L C T     | L H Q        |
| 1321 | GACTTGCTGA   | ATGGCAGAGA  | GTACAAAGTC  | AGGCTCTCCA  | ACAAAGGCTT  | CCGAGCCCCC   |
|      |              | S Q E       | F A N       | K A L       |             | P A P        |
| 1381 | ATCGAGAAAA   | CCATCTCTCA  | AGCCAAAGST  | GGGACCCGTS  | GGSTGCGAGG  | GGCATTGGA    |
|      | I E K        | T I S K A   | K           |             |             |              |
| 1441 | CAGAGCGCGG   | CTGTGCCGAC  | CGCTTGGCCT  | CAGAGGTACC  | CGTGTACCAA  | CGTCTGTGCC   |
| 1501 | TACAGGCGAC   | CCCCGACGAC  | CACAGGTTGA  | GACGAGCTGC  | GCATCGCCAGC | AGGATATGAC   |
|      | G Q          | P R E       | P Q V Y     | T L T       | P S R       | E E M T      |
| 1561 | CAAGAAGCAG   | CTGACGCTGA  | CTCTCGTGT   | CAAAAGGCTT  | TATGCCAGGG  | AGTATGCGCT   |
|      | K N Q        | V S L       | T C L V     | K G F       | Y P S       | D I A V      |
| 1621 | GGGCTGGGAG   | AGCAATGGGC  | SGAGCGAGAA  | CAACTACAA   | ACACAGCGCTC | CGGTGTG9GA   |
|      | L W E        |             |             |             |             |              |
| 1681 | CTCCGACGCG   | TCCTTCTTCC  | TC1ATAGCAA  | GCTCAACGCT  | GACACAGACA  | CTGTGGACGA   |
|      | S D G        | S F F       | L Y S K     | L T V       | D K S       | R W Q Q      |
| 1741 | GGGGACAGTC   | TTTCTATGCT  | CGVGTATGA   | TGAGGCTGCT  | CACCAACCAT  | ACACCGAGAA   |
|      | G N V        | F S C       | S V M H     | E A L       | H N H       | Y T Q K      |
| 1801 | GAGGCTCTCC   | CTGTGCCCGG  | GTAATATGA   | (配列番号:1)    |             |              |
|      | S L S        | L S S P     | G K         | (配列番号:2)    |             |              |

**Figure 8**

【 図 9 】

|      |             |             |             |             |             |             |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 41   | GTGGATGCTCG | TGCATGCTTAG | AGCGTTCTTGG | GCAGAGGCCAC | GCCGTGACIT  | GGCTTGGGGC  |
| 42   | ATGGAGAGGGG | TATAGGTGAC  | ACAGGTGGCG  | GCACAGCCAA  | CGACAGCCAA  | TGCCGATATG  |
| 121  | CCCCAGCACT  | GGACGCTGAA  | CGCTCGGGAC  | ATGTAAGAAC  | CAGAGGGGCT  | CTGGCGCCAT  |
| 201  | GGCCAGGACT  | TGTTCCCAAC  | CGCGGTGACA  | TAGCTACCTC  | TTCTTGGAG   | CTGTCGCCAA  |
|      |             |             |             |             |             | A S T A T G |
| 241  | GGGCGCCATCG | GTCTTCCGCC  | TGGCGCCCTG  | CTCCAGAGAC  | ACCTTCGAGA  | GCACAGCGG   |
|      | G P S       | V F P       | L A P C     | S R S       | T S E       | S T A A     |
| 301  | CTTGGGCTGC  | CTGTGTAAGT  | AGCTATTCCC  | CGAACCGGTG  | ACGGTGTGCT  | GGAACTCAAG  |
|      | L G C       | L V K       | D Y F P     | E P V       | T V S       | W N S G     |
| 341  | CGCCCTGACC  | AGGCGCGTGC  | AGCCATTCCC  | GGCTTGCTTA  | CAGTCCCTAG  | GTGCTTACTC  |
|      | A L I T     | S G V       | T G C C T   | A V G L     | Q S S       | G L Y S     |
| 423  | CTCTCAGAGC  | GTGGTGACCT  | GTCCCTCCAG  | CAGCTTGGCC  | ACGAGAGCCT  | ACACCTGCA   |
|      | S S S       | P S S       | P S S       | S G S       | T S T       | N S T       |
| 481  | TGTATGATAC  | AAGGCCAGCA  | ACCAACAGGT  | GGACAAGAGA  | GTGTGTGAGA  | GGCCAGCACA  |
|      | V D H       | K P S       | N T K V     | D K R V     |             |             |
| 541  | GGGAGAGAGG  | GTGTCTGCTG  | GAAGCAGAGC  | TCAGCGCCCTC | TGGCTGGAGC  | CGCCCGGCT   |
| 601  | GTGCAGCCGC  | AGGCGAGGCC  | AGCAAGAGGC  | CGCCCATCTC  | TTCTCTCAAC  | TAGAGGCGCT  |
| 721  | TGACCACCCC  | ATCTGCTCTC  | AGGAGAGAGG  | CTCTTGTSAT  | TTTTCCACCA  | CGCCGGGCG   |
| 761  | GCACACAGSC  | TGATGTATGCC | TACCCAGAGC  | CTCCTGGATC  | CAGGGGAGCA  | TGC TGGCCTG |
| 781  | AGAGCTGCCA  | AGAGCATGCT  | CCGGAGAGAGC | CTCGCCCTCC  | ACCTTAAGCCG | ACCCCAAGAG  |
| 841  | CGAAACTCTG  | AGCTCCCTCA  | GCTCAGACAC  | CTTCTCTCCT  | CCGAGATCTG  | AGTAACTCCC  |
| 901  | AATCTTCTCT  | CTCGAGAGTC  | CAAAATATG   | CCCCATGCC   | CACCATGCC   | AGGTAAGGCA  |
|      |             | E S         | K Y G       | P P C C     | P P C P     |             |
| 941  | ACCCAGSGCT  | CAGCCCTCCG  | ATCAAGCGCG  | GACAGAGTGC  | CTGAGATAGC  | CTGATACGCA  |
| 1021 | GGAGAGGDC   | CGCGCGGGTG  | CTGACGGTGC  | CACCTGCATC  | TTCTCTCAGT  | CACCTGAGTG  |
|      |             |             |             |             |             | T K N       |
| 1081 | CTTGGGGGGA  | CCATCAGTCT  | TCTTGTCCC   | CCCCAAAGCC  | AAGGACACTC  | TCATGATCTC  |
|      | L G G       | P S V       | F L F P     | P K P K     | K D T       | L M I S     |
| 1141 | CCGAGACCCCT | GAGGTCACGT  | GGCTGGTGTG  | GGAGCTGAGC  | CAGGAGAGCC  | CCGAGGTCTC  |
|      | R T P       | E V T       | C V V V     | D V S       | Q E D       | P E V Q     |
| 1201 | GTTCACATGC  | TAGTGTGATG  | GTGGTGAGGT  | GCATATAGCC  | AAGAGAAAGC  | CGGGGAGAGC  |
|      | F N W       | Y V D       | G V E V     | H N A       | K T K       | P R E E     |
| 1261 | CGAGTTCAAC  | AGCAGCTAGC  | GTGTGTGCAG  | CGTCTCATCC  | CTGCTGCACC  | AGGAGCTGCT  |
|      | Q F N       | S T Y       | R V V S     | V L T       | V L H       | Q D W L     |
| 1321 | GACGCGCAG   | GAGTCAAGT   | GTGGAGTCTC  | CACAAAGAGC  | CTCCGCTGCT  | CCATCGAGAA  |
|      | E S G       | K T G       | K N T G     | K T G       | L P S       | D S G       |
| 1381 | AACCATCTGC  | AAAGTCAAG   | CGCAAGAGCA  | CGGGTGTGCA  | GGGCGGATC   | GACAGAGTGC  |
|      | T I S       | K A K       |             |             |             |             |
| 1441 | AGTGGGGDC   | ACCCCTTGCC  | CTGGAGGTGA  | CGCTGTGGCC  | AACCTCTGTC  | CCTACAGGCG  |
|      |             |             |             |             |             | P G         |
| 1501 | AGCGCCGAGA  | GCCACAGGTG  | TACACCCTCG  | CCCCATCCCA  | GGAGGAGATG  | ACCAAGAACG  |
|      | G P R E     | T G V T     | Y T L T     | G P P S     | E E M       | T K N       |
| 1561 | AGGTCAAGCT  | GACCTTQCCT  | GTCAAAGGCT  | TTCTACCCAG  | CGACATCGCC  | GTGGAGTGGG  |
|      | Q V S L     | T C L G     | V K G G     | F Y P S     | D I A       | V E W       |
| 1621 | AGAGCAATGG  | CGAGCGGCGG  | ACACACTACA  | AGACGACGCC  | TCCGCTGCTG  | GACTCCGAG   |
|      | E S G       | T G G       | K T T P     | K T V L     | P S D       | S G C       |
| 1681 | GTCTCTTCTT  | CCCTCTACAG  | AGCCTAAGCG  | TGGACAGAGC  | CAGGTGGGAG  | GAGGGGAATG  |
|      | G S F F     | L Y S       | R L T       | V D K S     | R W Q       | E N         |
| 1741 | TCTTCTCATG  | CTCCGCTGATG | CATGAGGCTC  | TGCAACAACCA | CTACACAGAC  | AAGAGCGCTT  |
|      | V F S C     | S V M       | H E A       | L H N H     | Y T Q       | K S L       |
| 1801 | CCCTGTCTCT  | GGGTAAATGA  |             |             |             |             |
|      | S L S L     | G K G       |             |             |             |             |
|      |             |             | (配列番号:3)    |             |             |             |
|      |             |             | (配列番号:4)    |             |             |             |

【 図 1 0 】

[illegible]

### Figure 10

### Figure 9

【 図 1 2 】

### Figure 11

|            |                                                             |     |  |     |  |     |     |
|------------|-------------------------------------------------------------|-----|--|-----|--|-----|-----|
|            |                                                             | 10  |  | 20  |  | 30  |     |
| 10D5vh.pro | M D - R L T S S F L L V I V P A Y V L S Q A T L K E S G P G |     |  |     |  |     | 29  |
| 3D6vh.PRO  | M N F G L S L I F L V L V L K G - V Q C E V K L V E S G G G |     |  |     |  |     | 29  |
|            |                                                             | 40  |  | 50  |  | 60  |     |
| 10D5vh.pro | I L Q S S Q T L S T C S F S G G F S L S T S G M G V S W I R |     |  |     |  |     | 59  |
| 3D6vh.PRO  | L V K P G A S L K L S C A A S G F T F S N Y G H - - S W I R |     |  |     |  |     | 57  |
|            |                                                             | 70  |  | 80  |  | 90  |     |
| 10D5vh.pro | Q F S G K G L E W L A H I Y W D D D K R Y - N P S L K S R L |     |  |     |  |     | 88  |
| 3D6vh.PRO  | Q N S D K R L E W A S I R S G G G R T Y Y S D N V K G R F   |     |  |     |  |     | 87  |
|            |                                                             | 100 |  | 110 |  | 120 |     |
| 10D5vh.pro | T I S K D T S R K Q V F L K I T S V D P A D T A T Y Y C V R |     |  |     |  |     | 118 |
| 3D6vh.PRO  | T I S R E N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A L Y Y C V R |     |  |     |  |     | 117 |
|            |                                                             | 130 |  | 140 |  |     |     |
| 10D5vh.pro | R P I T F V L V D A M D Y W G Q G T S V T V S S             |     |  |     |  |     | 142 |
| 3D6vh.PRO  | - - - Y D H Y S G S S D Y W G Q G T V T V S S               |     |  |     |  |     | 138 |

Figure 12

【 図 1 4 a 】

Figure 13

>m266 VR:  
EVKLVEGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTFSRYSMSWVRQTPEKRLELVAQINSVGNSTYYPDTVKGRFTISRDAEYTLQLQMSGL  
RSDDTATYYCASGDYWGQGTTLTVSS

[illegible]

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

hu12A11 H版 v.3.1

## 【図 14 b】

QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.4.1  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.4.2  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.4.3  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.4.4  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.5.1  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.5.2  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.5.3  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.5.4  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.5.5  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.5.6  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.6.1  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.6.2  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.6.3  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.6.4  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

## 【図 15】

FIGURE 15

>266VL  
 DVVMTQSPFLSLPVLGQASISCRSSQLIYSDGNAYLHWFLKPGQSPALLIYKVSNRFSQVDFPFGSGSGDTFTLKISRVE  
 DLGVYFCSSQTHVMTFGGTVKRIK

>h266 VL  
 DVVMTQSPFLSLPVLGQASISCRSSQLIYSDGNAYLHWFLKPGQSPALLIYKVSNRFSQVDFPFGSGSGDTFTLKISRVEAQ  
 DGVYVYCSQTHVMTFGGTVKRIK

>h12A11v1 VL 領域  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Cys Phe Gln Ser  
 85 90 95  
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

hul2A11v1 VL 領域  
 1 5 10  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile  
 15 20 25  
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
 30 35 40 45  
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 65 70 75  
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys  
 80 85 90  
 Phe Gln Ser Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu  
 95 100 105  
 Glu Leu Lys  
 110

hu3D6 VL バージョン 2  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro  
 1 5 10  
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
 15 20 25  
 Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys  
 30 35 40  
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp  
 45 50 55 60  
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 65 70 75  
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
 80 85 90  
 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
 95 100 105  
 Val Glu Ile Lys  
 110

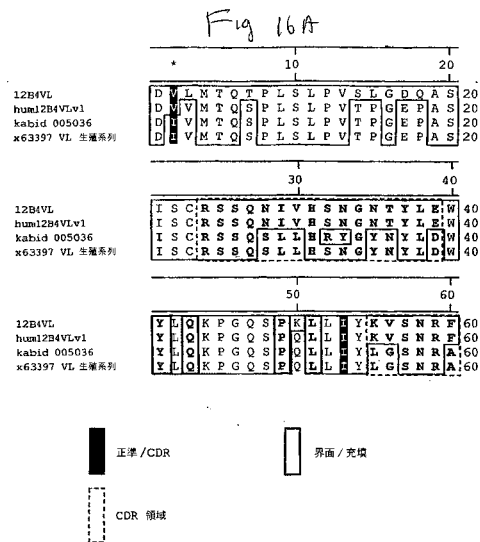
## 【図 14 c】

hul2A11 H 域 v.7  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

hul2A11 H 域 v.8  
 QVQLVESGGGVQPGSRSLRSCAISGFTLIS TSGMSVG WIRQAPGKGLEWIA  
 HIWDDDRYYNPSLKSRTISKDSKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAR RTTTADYFAY WQGGTTVTVSS

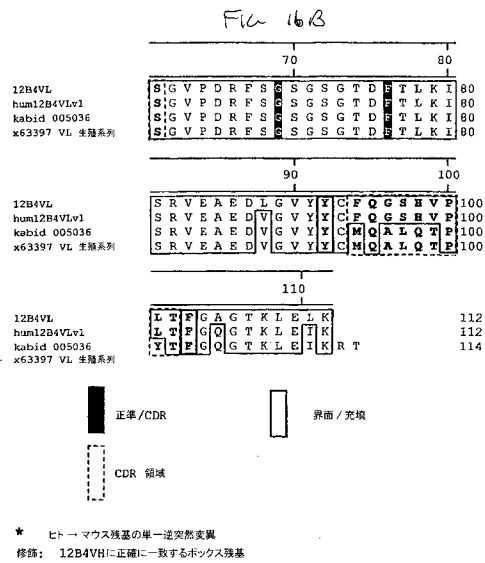
ヒト 3D6 H 域変異  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 1 5 10  
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 15 20 25  
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 30 35 40 45  
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser  
 50 55 60  
 Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 65 70 75  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 80 85 90  
 Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Asp Tyr Trp  
 95 100 105  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115

## 【図 16 A】

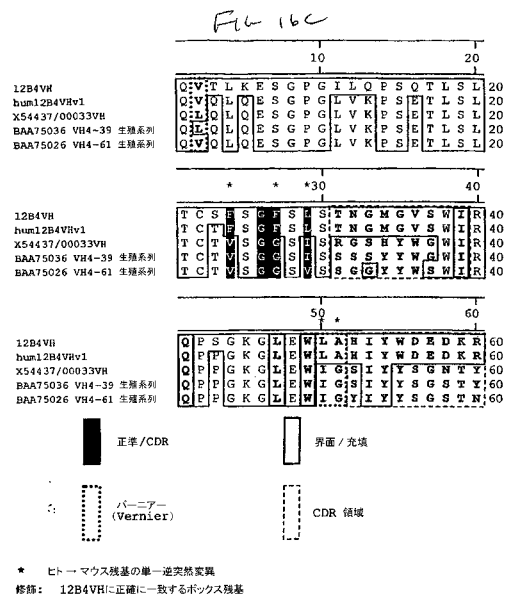


\* ヒトマウス残基の単一逆突然変異  
 修飾: 12B4VLに正確に一致するボックス残基

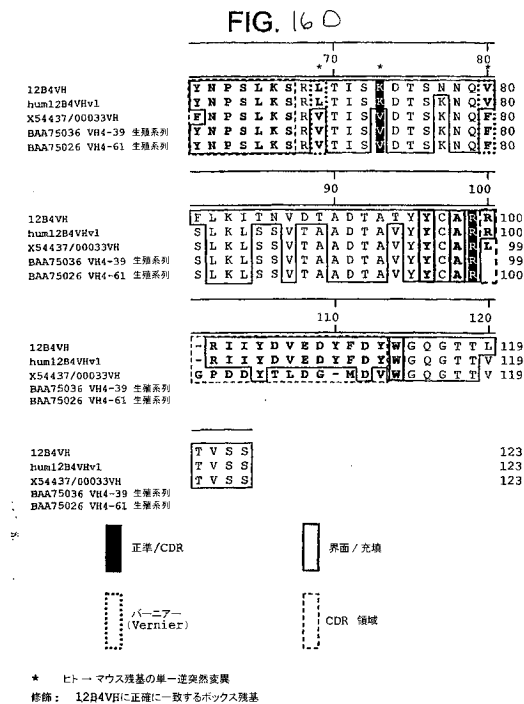
【図 16 B】



【図 16 C】



【図 16 D】



【 図 4 】

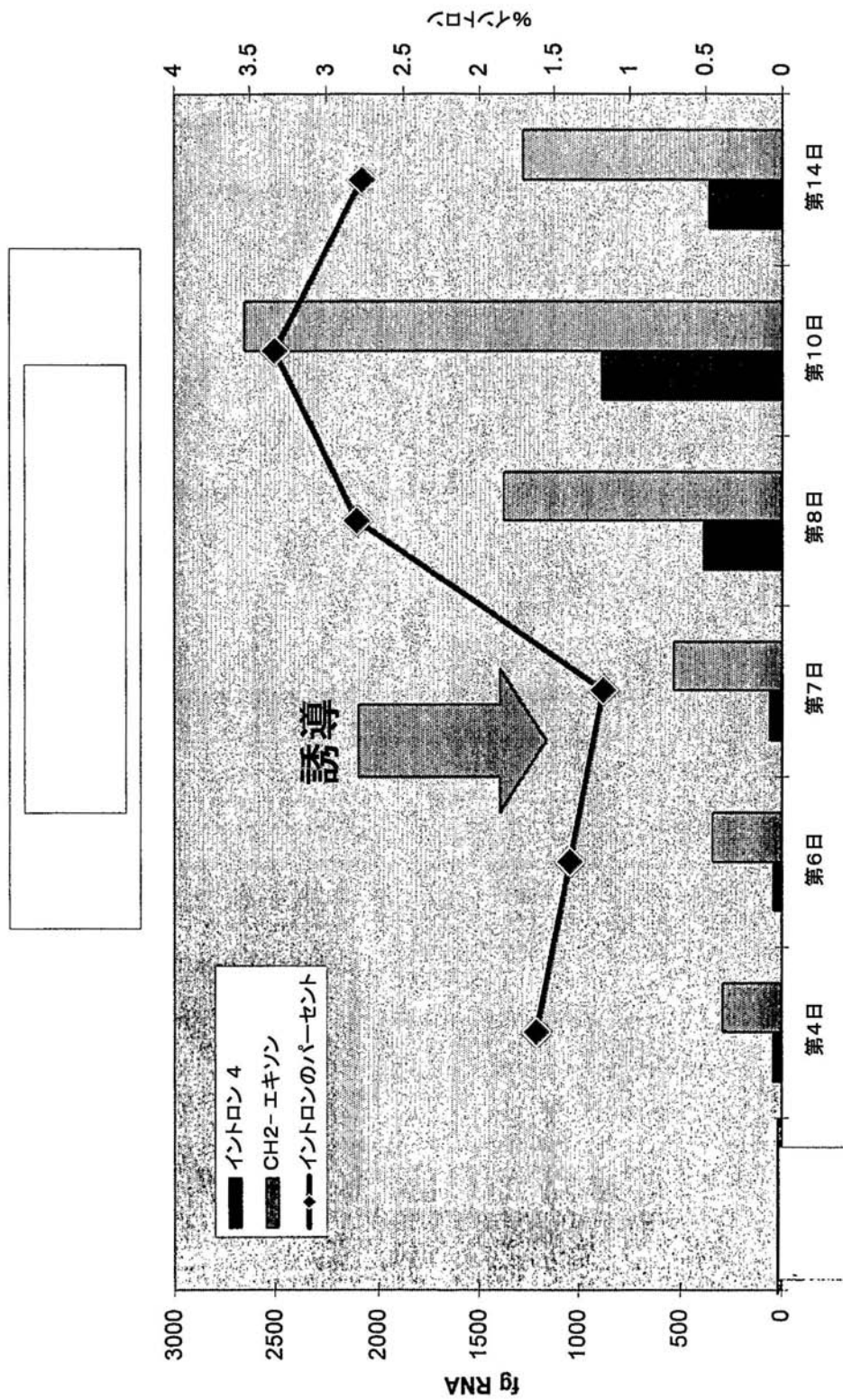


Figure 4

【 図 7 】

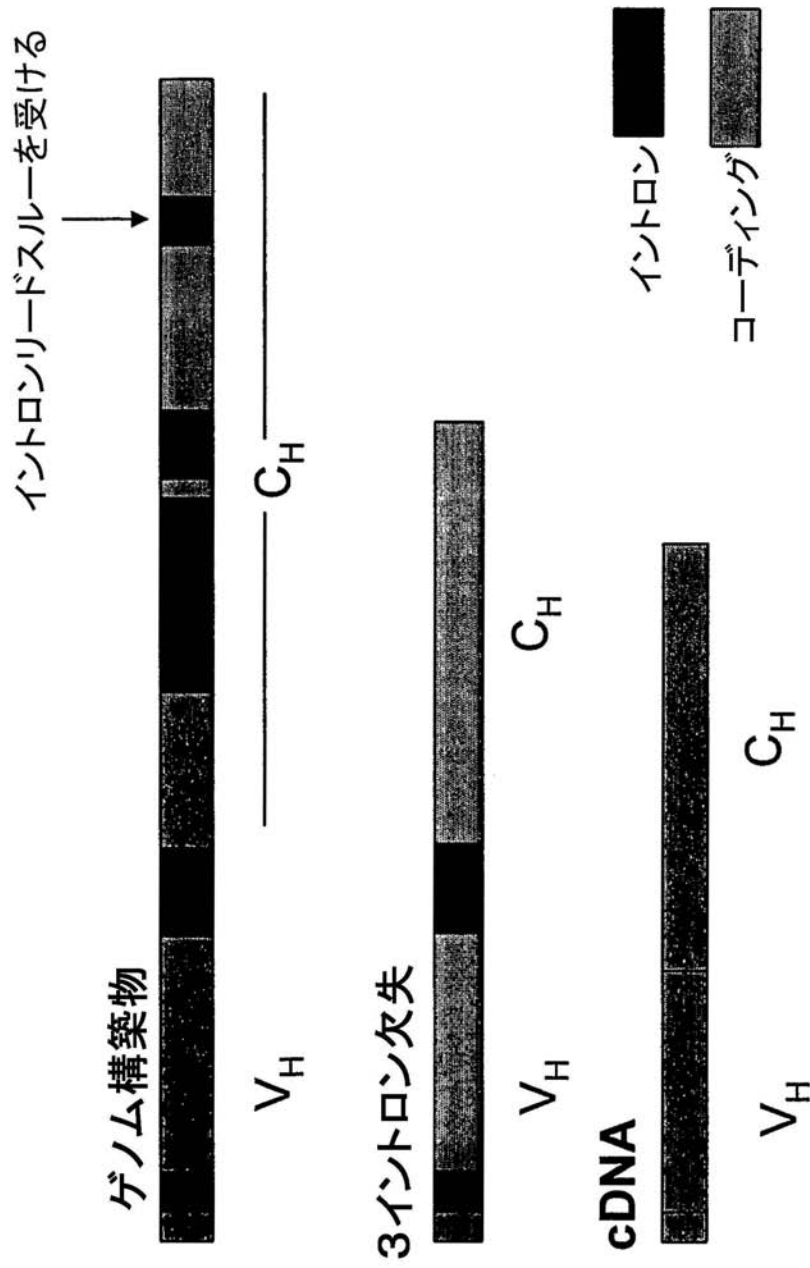


Figure 7

【 配列表 】

[2008515430000001.xml](#)

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.                    |  | F I            |   | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|--|----------------|---|-------------|
| <b>C 1 2 N 15/02 (2006.01)</b>  |  | C 1 2 N 15/00  | C | 4 H 0 4 5   |
| <b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>  |  | G 0 1 N 33/53  | M |             |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b> |  | A 6 1 K 39/395 | D |             |
| <b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>  |  | A 6 1 K 39/395 | N |             |
| <b>C 0 7 K 16/46 (2006.01)</b>  |  | A 6 1 P 25/00  |   |             |
|                                 |  | C 0 7 K 16/46  |   |             |

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

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 シナコア, マーティン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 8 1 0 ・ アンドーバー ・ ワンバルトロード ・ ワイスバイオ  
フアーマ ・ セルアンドモレキュラーサイエンス

(72)発明者 ローズ, ジエイソン

アメリカ合衆国ニューハンプシャー州 0 3 0 5 3 ロンドンデリー ・ ランターンレーン 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 CA09 DA02 EA04 GA11 HA17

4B063 QA01 QQ08 QQ13 QQ46 QQ79 QQ96 QR33 QR48 QR56 QR62

QR77 QS25 QS34

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA93Y AB01 BA02 CA25 CA44

4C085 AA13 AA14 BB36 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA22 FA74

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于改善重组蛋白质产生的方法和组合物                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2008515430A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 公开(公告)日 | 2008-05-15 |
| 申请号            | JP2007535779                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 申请日     | 2005-10-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 艾兰制药国际有限公司<br>惠氏公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 伊兰制药国际有限公司<br>魏斯                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| [标]发明人         | シナコアマーテイン<br>ローズジェイソン                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| 发明人            | シナコア,マーテイン<br>ローズ,ジェイソン                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C12N5/10 C12Q1/68 C12P21/08 C07K16/18 C12N15/02 G01N33/53 A61K39/395 A61P25/00 C07K16/46                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| CPC分类号         | A61P25/00 A61P25/28 C07K16/00 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/52 C07K2317/53 C07K2317/56 C07K2317/565 C12N15/63 C12N2810/859                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12Q1/68.A C12P21/08 C07K16/18 C12N15/00.C G01N33/53.M A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/00 C07K16/46                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ46 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR33 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | 小林 浩<br>片山英二<br>铃木康仁                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 优先权            | 60/616474 2004-10-05 US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| 其他公开文献         | JP4980222B2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |

#### 摘要(译)

公开了经修饰以增强重组蛋白质（例如抗体），表达和/或减少或消除错误剪接和/或内含子通读（IRT）副产物的核酸分子。本发明还提供了通过在适于重组蛋白表达的细胞培养条件下在宿主细胞中使用此类载体来产生缺乏错拼接和/或内含子通读副产物的蛋白质的方法。

