

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-45433

(P2004-45433A)

(43) 公開日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	P 4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	T 4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 35/00	GO 1 N 33/577	B 4 H O 4 5
GO 1 N 33/577	A 6 1 K 37/02	
審査請求 有 請求項の数 25 O L (全 60 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-347675 (P2003-347675)	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社
(22) 出願日	平成15年10月6日 (2003.10.6)		東京都北区浮間5丁目5番1号
(62) 分割の表示	特願2000-229748 (P2000-229748) の分割	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
原出願日	平成4年4月24日 (1992.4.24)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(31) 優先権主張番号	特願平3-95476	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成3年4月25日 (1991.4.25)	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治
(31) 優先権主張番号	特願平4-32084		
(32) 優先日	平成4年2月19日 (1992.2.19)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒトインターロイキン-6受容体に対するキメラ抗体

(57) 【要約】

【課題】 ヒトインターロイキン-6レセプターに対する新規な再構成ヒト抗体の提供。

【解決手段】 ヒト抗体L鎖C領域及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域、並びにヒト抗体のH鎖C領域及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域、からなるキメラ抗体。ヒトに投与した場合の免疫原性が低い。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト IL - 6R に対する再構成ヒト L 鎖 V 領域を含んで成る診断用試薬。

【請求項 2】

ヒト IL - 6R に対する再構成ヒト H 鎖 V 領域を含んで成る診断用試薬。

【請求項 3】

ヒト IL - 6R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域と他の蛋白質との融合蛋白質を含んで成る診断用試薬。

【請求項 4】

ヒト IL - 6R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域と他の蛋白質との融合蛋白質を含んで成る診断用試薬。 10

【請求項 5】

ヒト IL - 6R に対する再構成ヒト L 鎖 V 領域と他の蛋白質との融合蛋白質を含んで成る診断用試薬。

【請求項 6】

ヒト IL - 6R に対する再構成ヒト H 鎖 V 領域と他の蛋白質との融合蛋白質を含んで成る診断用試薬。

【請求項 7】

ヒト IL - 6R に対するマウス L 鎖 V 領域とヒト L 鎖 C 領域とから成るキメラ L 鎖を含んで成る診断用試薬。 20

【請求項 8】

ヒト IL - 6R に対するマウス H 鎖 V 領域とヒト H 鎖 C 領域とから成るキメラ H 鎖を含んで成る診断用試薬。

【請求項 9】

ヒト IL - 6R に対するヒト型化 L 鎖を含んで成る診断用試薬。

【請求項 10】

ヒト IL - 6R に対するヒト型化 H 鎖を含んで成る診断用試薬。

【請求項 11】

ヒト IL - 6R に対するマウス L 鎖 V 領域とヒト L 鎖 C 領域とから成るキメラ L 鎖と他の蛋白質とから成る融合蛋白質を含んで成る診断用試薬。 30

【請求項 12】

ヒト IL - 6R に対するマウス H 鎖 V 領域とヒト H 鎖 C 領域から成るキメラ H 鎖と他の蛋白質とから成る融合蛋白質を含んで成る診断用試薬。

【請求項 13】

ヒト IL - 6R に対するヒト型化 L 鎖と他の蛋白質との融合蛋白質を含んで成る診断用試薬。

【請求項 14】

ヒト IL - 6R に対するヒト型化 H 鎖と他の蛋白質との融合蛋白質を含んで成る診断用試薬。

【請求項 15】

ヒト IL - 6R に対するヒト - マウスキメラ抗体を含んで成る診断用試薬。 40

【請求項 16】

ヒト IL - 6R に対するヒト型化抗体を含んで成る診断用試薬。

【請求項 17】

ヒト IL - 6R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域と他の蛋白質との融合蛋白質を含んで成る医薬。

【請求項 18】

ヒト IL - 6R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域と他の蛋白質との融合蛋白質を含んで成る医薬。

【請求項 19】

ヒトIL-6Rに対するマウスL鎖V領域とヒトL鎖C領域とから成るキメラL鎖を含んで成る医薬。

【請求項20】

ヒトIL-6Rに対するマウスH鎖V領域とヒトH鎖C領域とから成るキメラH鎖を含んで成る医薬。

【請求項21】

ヒトIL-6Rに対するマウスL鎖V領域とヒトL鎖C領域とから成るキメラL鎖と他の蛋白質とから成る融合蛋白質を含んで成る医薬。

【請求項22】

ヒトIL-6Rに対するマウスH鎖V領域とヒトH鎖C領域から成るキメラH鎖と他の蛋白質とから成る融合蛋白質を含んで成る医薬。 10

【請求項23】

ヒトIL-6Rに対するヒト-マウスキメラ抗体を含んで成る医薬。

【請求項24】

抗腫瘍剤である、請求項17~23のいずれか1項に記載の医薬。

【請求項25】

抗骨髄腫剤である請求項24に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトインターロイキン-6受容体(IL-6R)に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域(V領域)、ヒトIL-6Rに対するヒト/マウスキメラ抗体、ヒトライト鎖(L鎖)V領域及びヒトヘビー鎖(H鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)がヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている再構成(reshaped)ヒト抗体の使用に関する。本発明はさらに、上記の抗体又はその部分をコードするDNAを提供する。本発明はさらに、前記DNAを含んで成るベクター、特に発現ベクター、並びに該ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明はさらに、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体の製造方法、及びヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。 20

【背景技術】

【0002】

インターロイキン-6(IL-6)は一連の細胞により生産される多機能サイトカインである。このものは免疫応答、急性期反応及び造血を調節し、そして宿主防御機構において中心的役割を演ずる。このものは広範な組織に作用して、標的細胞の性質に応じて成長誘導効果、成長阻害効果及び分化誘導効果を発揮する。IL-6に対する特異的レセプター(IL-6R)は、IL-6の多機能性に従ってリンパ系細胞及び非リンパ系細胞上で発現される。IL-6遺伝子の異常発現が種々の疾患、特に自己免疫疾患、メサンジウム細胞増殖性糸球体腎炎、及び形質細胞腫/骨髄腫の発病に関与することが示唆されている(Hiranoら、Immunol. Today, 11, 443-449, 1990の総説を参照のこと)。ヒト骨髄腫細胞はIL-6を生産しそしてIL-6Rを発現することが観察される。実験において、IL-6に対する抗体が骨髄腫細胞の試験管内での増殖を阻害し、そしてそれ故にヒト骨髄腫の発癌においてオートクリン調節ループが機能していることが示された(Kawanoら、Nature, 332, 83, 1988)。 40

【0003】

IL-6Rは種々の動物細胞の表面に存在し、そしてIL-6に特異的に結合し、そして細胞表面上のIL-6R分子の数が報告されている(Tagaら、J. Exp. Med. 196, 967, 1987)。さらに、ヒトIL-6RをコードするcDNAがクローン化され、そしてIL-6Rの一次構造が報告されている(Yamasakiら、Science, 241, 825, 1988)。

マウスのモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性(「抗原性」という場合も 50

ある)があり、そしてこの理由のため、ヒトにおけるそれらの療法的価値は制限される。ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短い。さらに、ヒト抗マウス抗体は、予定された効果を妨害するのみならず、患者における不都合なアレルギー応答の危険をもたらす免疫応答を惹起することなくして頻回投与することはできない。

【0004】

これらの問題を解決するため、ヒト型化(humanized)抗体の製造方法が開発された。マウス抗体は2つの方法でヒト型化することができる。より簡単な方法は、可変領域がもとのマウスモノクローナル抗体に由来しそして定常領域が適当なヒト抗体に由来するキメラ抗体を作製する方法である。得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の完全な可変領域を含有し、そしてもとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することを期待することができる。さらに、キメラ抗体ではヒト以外に由来する蛋白質配列の比率が実質的に減少しており、そしてそれ故にもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想される。キメラ抗体は抗原によく結合しそして免疫原性が低い、マウス可変領域に対する免疫応答がなお生ずる可能性がある(Lobuglioら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4220-4224, 1989)。

10

【0005】

マウス抗体をヒト型化するための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体の潜在的な免疫原性をさらに大幅に低下させるものである。この方法においては、マウス抗体の可変領域からの相補性決定領域(complementarity determining region; CDR)をヒト可変領域に移植して「再構成」(reshaped)ヒト可変領域を作製する。次に、これらの再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型化抗体のヒト以外の蛋白質配列に由来する部分はCDRと極く一部のフレームワーク(FR)のみである。CDRは超可変蛋白質配列により構成されている。これらは種特異的配列を示さない。これらの理由のため、マウスCDRを担持する再構成ヒト抗体はもはやヒトCDRを含有する天然ヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

20

【0006】

前記のごとく、再構成ヒト抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体は知られていない。さらに、再構成ヒト抗体の製造方法であって任意の特定の抗体に普遍的に適用し得る方法は存在しない。従って、特定の抗原に対する十分に活性な再構成ヒト抗体を作製するためには種々の工夫が必要である。ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体、すなわちPM1およびMT18は作製されており(特願平2-189420)、そして本発明者らはヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体AUK12-20、AUK64-7及びAUK146-15を調製しているが、本発明者らはヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の作製を示唆する文献を知らない。

30

さらに、ヒト骨髓腫細胞株が移植されたヌードマウスに、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体が注射された時腫瘍の増殖が顕著に阻害されることを、本発明者らは見出した。このことは、骨髓腫の治療のための療法剤として抗ヒトIL-6R抗体が有用であることを示唆している。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って本発明はヒトIL-6Rに対する、免疫原性の低い抗体を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

従って、本発明はヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供する。本発明はまた、該再構成ヒト抗体の作製の過程で有用なヒト/マウスキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、再構成ヒト抗体の部分、並びに再構成ヒト抗体及びその部分並びにキメラ抗体の製

50

造のための発現系を提供する。

さらに具体的には、本発明は、ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域；並びにヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域を提供する。

【0009】

本発明はさらに、

(1) ヒト L 鎖 C 領域、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域を含んで成る L 鎖；並びに

(2) ヒト H 鎖 C 領域、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域を含んで成る H 鎖；

を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対するキメラ抗体を提供する。

【0010】

本発明はさらに、ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の C D R；並びにヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の C D R を提供する。

本発明はさらに、

(1) ヒト L 鎖 V 領域のフレームワーク領域 (F R)、及び

(2) ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域の C D R、
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト L 鎖 V 領域；並びに

(1) ヒト H 鎖 V 領域の F R、及び

(2) ヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域の C D R、
を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト H 鎖 V 領域を提供する。

【0011】

本発明はさらに、

(1) ヒト L 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト F R、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の C D R を含んで成る L 鎖 V 領域、

を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト L 鎖；並びに

(1) ヒト H 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト F R、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の C D R を含んで成る H 鎖 V 領域、

を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する抗体の再構成ヒト H 鎖を提供する。

【0012】

本発明はさらにまた、

(A) (1) ヒト L 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト L 鎖 F R、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 C D R を含んで成る L 鎖；並びに

(B) (1) ヒト H 鎖 C 領域、並びに

(2) ヒト H 鎖 F R、及びヒト I L - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の H 鎖 C D R を含んで成る H 鎖；

を含んで成る、ヒト I L - 6 R に対する再構成ヒト抗体を提供する。

【0013】

本発明はまた、前記種々の抗体構成ポリペプチド、又はその部分をコードする D N A に関する。

本発明はまた、上記 D N A を含んで成るベクター、例えば発現ベクターに関する。

本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。

本発明はさらにまた、ヒト I L - 6 R に対するキメラ抗体の製造方法、及びヒト I L - 6 R に対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

【0014】

マウス V 領域をコードする D N A のクローニング

10

20

30

40

50

さらに詳しくは、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAをクローン化するためには、遺伝子源として、ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製することが必要である。この様なハイブリドーマとして、特願平2-189420号明細書にはモノクローナル抗体PM1を生産するマウスハイブリドーマPM1及び該抗体の性質が記載されている。本明細書の参考例2にハイブリドーマPM1の作製方法を記載する。本発明者らは、それぞれがヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマAUK12-20、AUK64-7及びAUK146-15を作製している。これらのハイブリドーマの作製方法は本明細書の参考例3に記載されている。

【0015】

マウスモノクローナル抗体の可変領域をコードする目的のDNAをクローン化するためハイブリドーマ細胞を破壊し、そしてChirgwinら、*Biochemistry* 18, 5294, 1977に記載されている常法により全RNAを得る。次に、この全RNAを用いて、J.W.Larrickら、*Biotechnology*, 7, 934, 1989に記載されている方法を用いて一本鎖cDNAを合成する。

【0016】

次に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて前記cDNAの有意義な部分の特異的増幅を行う。マウスモノクローナル抗体のカッパ()型L鎖V領域の増幅のため、配列番号: 1~11に示す11種のオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Kappa Variable; MKV)及び配列番号: 12に示すオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Kappa Constant; MKC)をそれぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーとして使用する。

【0017】

前記MKVプライマーはマウスカッパ型L鎖リーダー配列をコードするDNA配列とハイブリダイズし、そして前記MKCプライマーはマウスカッパ型L鎖C領域をコードするDNA配列とハイブリダイズする。マウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の増幅のため、配列番号: 13~22に示す10種のオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Heavy Variable; MHV)及び配列番号: 23に示すオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Heavy Constant; MHC)をそれぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーとして使用する。

【0018】

なお、5'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素SalI切断部位を提供する配列GTCGACを含有し、そして3'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素XmaI切断部位を提供するヌクレオチド配列CCCGGGを含有する。これらの制限酵素切断部位は可変領域をコードする目的のDNA断片をクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる。

【0019】

次に増幅生成物を制限酵素SalI及びXmaIで切断させて、マウスモノクローナル抗体の目的とする可変領域をコードするDNA断片を得る。他方、プラスミドpUC19のごとき適当なクローニングベクターを同じ制限酵素SalI及びXmaIにより切断させ、このpUC19に前記DNA断片を連結することにより、マウスモノクローナル抗体の目的とする可変領域をコードするDNA断片を含むプラスミドを得る。

クローン化されたDNAの配列決定は任意の常法に従って行うことができる。

目的とするDNAのクローン化及びその配列決定を実施例1~3に具体的に記載する。

【0020】

相補性決定領域(CDR)

本発明はさらに、本発明の各V領域の超可変又は相補性決定領域(CDR)を提供する。L鎖及びH鎖の各対のV領域は抗原結合部位を形成する。L鎖及びH鎖上のこの領域は同様の全般的構造を有しそして各領域は配列の比較的保存された4個のフレームワーク領域を含み、それらは3個の超可変領域又はCDRにより連結されている(Kabat, E

10

20

30

40

50

. A . 5、 「 Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. Health and Human Services 1983)。

【0021】

前記4個のフレームワーク領域(FR)の多くの部分は - シート構造をとり、CDRはループを形成する。CDRはある場合には - シート構造の一部を形成することもある。CDRはFRによって非常に近い位置に保持され、そして他の領域のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。本発明は、ヒト型化抗体の素材として有用なこれらのCDR、及びそれをコードするDNAをも提供する。これらのCDR領域は、V領域の既知アミノ酸配列と照合することによって、Kabata, E. A. 5、 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができ、実施例4において具体的に説明する。

10

【0022】

キメラ抗体の作製

ヒトIL-6Rに対する抗体の再構成ヒトV領域を設計するに先立って、使用するCDRが実際に抗原結合領域を形成することを確かめる必要がある。この目的のため、キメラ抗体を作製した。さらに実施例1及び2に記載される4種類のモノクローナル抗体のクローン化されたDNAのヌクレオチド配列から推定されるマウス抗ヒトIL-6R抗体のアミノ酸配列を相互に、及び既知のマウス及びヒトの抗体のV領域と比較した。4種類のモノクローナル抗体のそれぞれについて、1セットの典型的な機能的マウスL及びH鎖V領域がクローニングされた。しかしながら、4種類すべてのマウス抗ヒトIL-6R抗体は比較的異なるV領域を有していた。4種類の抗体は相互に単に微小な相違ではなかった。クローン化されたマウスV領域を用いて4種類のキメラ抗ヒトIL-6R抗体を作製した。

20

【0023】

キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、PCR-クローン化cDNAに見られるようなマウスリーダー配列及びV領域配列を、哺乳類細胞発現ベクター中にすでに存在するヒトC領域をコードする配列に連結することを含んで成る。前記4種類のモノクローナル抗体の内、モノクローナル抗体AUK12-20からのキメラ抗体の作製を実施例5に記載する。

30

【0024】

モノクローナル抗体PM-1からのキメラ抗体の作製を実施例6に記載する。マウスPM-1 L鎖リーダー領域及びV領域をコードするcDNAを、ヒトL鎖C領域をコードするヒトゲノムDNAを含有する発現ベクターにPCR法を用いてクローン化した。マウスPM-1抗体(単に「PM-1抗体」又は「PM」という場合もある)のH鎖リーダー及びV領域をコードするcDNAを、ヒト - 1C領域をコードするゲノムDNAを含有する発現ベクターにPCR法を用いてサブクローン化した。

【0025】

特に設計されたPCRプライマーを用いて、マウスPM-1抗体のV領域をコードするcDNAをそれらの5' - 及び3' - 末端において適当な塩基配列を導入して(1)それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つ(2)それらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした。次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得たマウスPM-1抗体のV領域を、所望のヒトC領域をすでに含有するHCMV発現ベクター(図1)に挿入した。これらのベクターは、種々の哺乳類細胞系における遺伝子操作された抗体の一過性(transient)発現又は安定な発現のために適当である。

40

【0026】

マウスPM-1抗体中に存在するV領域と同じV領域を有するキメラPM-1抗体(バージョンa)の作製に加えて、キメラPM-1抗体の第二のバージョン(バージョンb)を作製した。キメラPM-1抗体(バージョンb)においては、L鎖V領域中の位置107のアミノ酸がアスパラギンからリジンに変えられている。マウスPM-1抗体からのL

50

鎖V領域と他のマウスL鎖V領域との比較において、位置107におけるアルギニンの存在は異常であることが注目された。

【0027】

マウスL鎖V領域においては、位置107の最も典型的なアミノ酸はリジンである。マウスPM-1抗体のL鎖V領域中の位置107に非典型的なアミノ酸であるアルギニンを有することの重要性を評価するため、位置107を典型的なアミノ酸であるリジンに変えた。この変更は、PCR-変異誘発法(M. Kammanら、Nucleic Acids Res. (1987) 17: 5404)を用いてL鎖V領域をコードするDNA配列中に必要な変更を行うことにより達成された。

【0028】

キメラPM-1抗体バージョン(a)はヒトIL-6Rに結合する活性を示した。キメラPM-1抗体バージョン(b)もバージョン(a)と同様にヒトIL-6Rに結合する。同様に、他の2種類のモノクローナル抗体AUK64-7及びAUK146-15からキメラ抗体を作製した。4種類すべてのキメラ抗体はヒトIL-6Rによく結合し、機能的測定において、正しいマウスV領域がクローン化されそして配列が決定されていたことが示された。

【0029】

4種類のマウス抗ヒトIL-6R抗体から、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体の設計及び作製のための第一の候補としてマウスPM-1抗体を選択した。マウスPM-1抗体の選択は主として、ヌードマウスに移植されたヒト骨髄腫細胞に対するマウス抗ヒトIL-6R抗体及びキメラ抗体の効果を研究して得られた結果に基く。4種類のマウス抗ヒトIL-6R抗体の内、PM-1抗体が最も強い抗腫瘍細胞活性を示した。又、キメラPM-1抗体はキメラAUK12-20抗体よりも強い抗腫瘍活性を示した。

【0030】

マウスモノクローナル抗体PM-1のV領域と既知のマウス及びヒトの抗体のV領域との比較

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒトモノクローナル抗体に移植されている再構成ヒト抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとヒトモノクローナル抗体のFRとの間に高い相同性が存在することが望ましい。従って、マウスPM-1抗体のL鎖及びH鎖のV領域を、OWL(or Leeds) database of protein sequencesに見出されるすべての既知マウス及びヒトのV領域と比較した。

【0031】

マウス抗体のV領域に関しては、PM-1抗体のL鎖V領域はマウス抗体musigkc ko(Chen, H.T.ら、J. Biol. Chem. (1987) 262: 13579-13583)のL鎖V領域と最も類似しており、93.5%の同一性(identity)が存在した。PM-1抗体のH鎖V領域はマウス抗体musigvhr2(F. J. Grantら、Nucleic Acids Res. (1987) 15: 5496)のH鎖V領域に最も類似しており、84.0%の同一性が存在した。マウスPM-1抗体のV領域は既知マウスV領域に高比率の同一性を示し、マウスPM-1抗体のV領域が典型的なマウスV領域であることが示される。このことはさらに、クローン化されたDNA配列が正しいという間接的な証明を与える。一般に、H鎖V領域間に比べてL鎖V領域間の方がより高い比率の同一性が存在する。これはおそらく、H鎖V領域に比べてL鎖V領域において一般的に観察されるより少ない量の多様性のためであろう。

【0032】

ヒト抗体のV領域に関しては、マウスPM-1抗体のL鎖V領域は、REIとも称されるヒト抗体klhure(W. Palmら、Physiol. Chem. (1975) 356: 167-191)のL鎖V領域に最も類似しており、72.2%の同一性が存在する。PM-1抗体のH鎖V領域は、ヒト抗体humighvap(VAP)(H. W. Schroederら、Science (1987) 238: 791-793)に最も類似し

10

20

30

40

50

ており、71.8%の同一性が存在する。マウスPM-1抗体からの再構成抗体をいかに設計するかを考えるためにヒトV領域との比較が最も重要である。ヒトV領域への同一性の比率はマウスV領域への同一性の比率より低い。これはマウスPM-1抗体のV領域がマウスV領域に類似しており、そしてヒトV領域には類似していないことの間接的証明である。この証明にまた、ヒト患者における免疫原性の問題を解決するためにマウスPM-1のV領域をヒト型化する(humanize)ことが最善であることを示す。

【0033】

マウスPM-1抗体のV領域をさらに、E.A. Kabatら、(1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Forth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Officeにより定義される、ヒトV領域の異なるサブグループについてのコンセンサス配列と比較した。V領域のFR間で比較を行った。その結果を表1に示す。

10

【0034】

【表1】

表 1

マウスPM-1のV領域のFRと、異なる種々のサブグループのヒトV領域のコンセンサス配列⁽¹⁾のFRとの間の同一性(%)

20

A. L鎖V領域におけるFR

HSG I	HSG II	HSG III	HSG IV
70.1	53.3	60.7	59.8

B. H鎖V領域におけるFR

HSG I	HSG II	HSG III
44.1	52.9	49.2

30

(1) コンセンサス配列はKabatら(1987)に記載されている

【0035】

マウスPM-1抗体のL鎖V領域のFRはヒトL鎖V領域のサブグループI(HSG I)のコンセンサス配列からのFRに最も類似しており、70.1%の同一性が存在する。マウスPM-1のH鎖V領域のFRはヒトH鎖V領域のサブグループII(HSG II)のコンセンサス配列からのFRに最も類似しており、52.9%の同一性が存在する。これらの結果は、既知のヒト抗体との比較から得られた結果を支持している。ヒトREI中のL鎖V領域はヒトL鎖V領域のサブグループIに属し、そしてヒトVAP中のH鎖V領域はヒトH鎖V領域のサブグループIIに属する。

40

【0036】

ヒト抗体中のV領域とのこれらの比較から、再構成ヒトPM-1抗体のV領域の設計の基礎となるヒトV領域を選択することが可能である。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の設計のためにはサブグループI(HSG I)に属するヒトL鎖V領域を使用し、そして再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の設計のためにはサブグループII(HSG II)に属するヒト抗体H鎖V領域を用いるのが最善であろう。

50

【0037】

再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計

再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計における第一段階は、設計の基礎となるヒト抗体V領域を選択することであった。マウスPM-1抗体L鎖V領域中のFRは、サブグループIに属するヒト抗体L鎖V領域中のFRに最も類似していた(表1)。前記のごとく、マウスPM-1抗体のL鎖V領域と既知ヒト抗体L鎖V領域との比較において、それはヒトL鎖V領域のサブグループIの1構成員であるヒトL鎖V領域REIに最も類似していた。従って、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の設計においてREIからのFRを使用した。また、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の作製のための出発材料としてREIのFRを使用した。

10

【0038】

REIに基くこれらのヒトFR中には、もとのヒトREIに比べて5個の相違が存在する(kabatら、1987、によれば位置39, 71, 104, 105及び107;表2を参照のこと)。FR4中の3個の変化(位置104, 105及び107)は他のヒトL鎖からのJ領域に基いており、そしてそれ故にヒトからの逸脱を成すものではない(L. Riechmannら、Nature(1988)322:21-25)。位置39及び71における2個の変化はラットCAMPATH-1抗体のL鎖V領域のFR中に存在するアミノ酸にもどる変化であった(Riechmannら、1988)。

【0039】

再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の2つのバージョンを設計した。第一のバージョン(バージョン「a」)においては、ヒトFRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に存在するREIに基くFR(Riechmannら、1988)と同一であり、そしてマウスCDRはマウスPM-1抗体のL鎖V領域中のCDRと同じであった。第二のバージョン(バージョン「b」)はバージョン「a」に基き、ヒトFR3中の位置71におけるアミノ酸1個のみを異にする。C. Chothiaら、J. Mol. Biol. (1987)196:901-917により定義されるように、残基71はL鎖V領域のCDR1の標準的(canonical)構造の部分である。この位置のアミノ酸はL鎖V領域のCDR1ループの構造に直接影響すると予想され、そしてそれ故に抗体結合に大きく影響するであろう。

20

【0040】

マウスPM-1抗体のL鎖V領域において、位置71はチロシンである。再構成ヒトPM-1抗体のL鎖V領域のバージョン「a」の設計に使用した修飾されたREIのFRにおいては位置71はフェニルアラニンであった。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「b」においては、位置71のフェニルアラニンがマウスPM-1抗体L鎖V領域中に見出されるようにチロシンに変えられている。表2は、マウスPM-1抗体のL鎖V領域、再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中での使用のために修飾されたREIのFR(Riechmannら、1988)及び再構成ヒトPM-1抗体のL鎖V領域の2種類のバージョンの、それぞれのアミノ酸配列を示す。

30

【0041】

【0043】

再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の6種類のバージョンを設計した。6種類のバージョンのすべてにおいて、ヒトFRは再構成D1.3中に存在するNEW

FRに基いており、そしてマウスCDRはマウスPM-1抗体H鎖V領域中のCDRと同じである。ヒトFR中の7個のアミノ酸残基(位置1, 27, 28, 29, 30, 48及び71;表3参照)は抗原結合に不都合な影響を与える可能性を有するものと同定されている。マウスPM-1抗体のV領域のモデルにおいて、H鎖V領域中の残基1はCDRループの近くに位置する表面残基である。

【0044】

残基27, 28, 29、及び30は、C. Chothiaら、Nature (1989) 34: 877-882により推定されるようにH鎖V領域のCDR1の標準的(canonical)構造の部分であり、そして/又はH鎖V領域の第一構造ループの部分構成することがマウスPM-1抗体V領域のモデルにおいて観察される(Chothiaら、1987)。残基48はマウスPM-1抗体のV領域のモデルにおいて埋った(buried)残基として観察された。埋った(buried)残基の変化はV領域及びその抗原結合部位の全体構造を破壊する可能性がある。残基71は、Chothiaら(1989)により予想されるようにH鎖V領域のCDR2の標準(canonical)構造の部分である。再構成ヒトPM-1抗体の6種類のバージョンはヒトNEWのFR中のこれら7つの位置のアミノ酸の変化の異なる組み合わせを含む(表3を参照のこと)。

10

【0045】

20

DNAを新規なPCR利用法を用いて作製した。要約すれば、適当なヒトFRをすでに含有する再構成ヒトV領域をコードするプラスミドをPCRプライマーを用いて修飾し、ヒトV領域中に存在するCDRをマウスPM-1抗体からのCDRにより置換した。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域をコードするDNAの作製のための出発材料は、再構成ヒトD1.3L鎖V領域をコードするDNAを含有するプラスミドDNAであった。この再構成ヒトD1.3L鎖V領域はヒトL鎖V領域REI中に存在するFRに基いて作製された。再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域をコードするDNAの作製のための出発材料は再構成ヒトD1.3H鎖V領域をコードするDNAであった。この再構成ヒトD1.3抗体H鎖V領域をコードするDNAはヒトH鎖V領域NEW(W. Verhoeyenら、Science(1988)239:1534-1536)のFRをコードするDNAに基いて作製された。

【0048】

所望のヒトFRをコードするDNAを含有する出発プラスミドDNAを選択した後、マウスD1.3CDRに代るマウスPM-1抗体CDRの置換を可能にするようにPCRプライマーを設計しそして合成した。各再構成ヒトPM-1抗体V領域につき、3種類のプライマーはマウスPM-1抗体CDRをコードするDNA配列を含有し、そして2種類のプライマーは再構成ヒトV領域をコードする全体DNA配列を挟むように設計されている。一連のPCR反応における5種類のPCRプライマーの使用が、出発再構成ヒトV領域中に存在するヒトFRをコードするDNA及びマウスPM-1抗体V領域中に存在するCDRをコードするDNAから成るPCR生成物をもたらした(実施例7、並びに図7及び図8を参照のこと)。PCR生成物をクローン化し、そして配列決定して、再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域のバージョン「a」の全体DNA配列が正しいアミノ酸配列をコードしていることを確認した。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域バージョン「a」の配列を配列番号55に示す。

【0049】

再構成ヒトPM-1抗体V領域の他のバージョンをコードするDNAは、公表されているPCR-変異誘発法(Kammannら、1989)にわずかな変更を加えた方法を用いて作製した。再構成ヒトPM-1抗体V領域の設計に関して記載したように、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の1つの追加のバージョン(バージョン「b」)をコードするDNAを作製し、そして再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の5種類の追加のバージョン(バージョン「b」,「c」,「d」,「e」、及び「f」)をコードするDNAを作製した。これらの追加のバージョンは、第一バージョンからの一連の微細な変化を含む。アミノ酸配列のこれらの微細な変化はPCR変異誘発を用いてDNA配列の微細な変更を行うことにより達成された。DNA配列に必要な変化を導入するPCRプライマーが設計された。一連のPCR反応に続き、PCR生成物をクローン化し、そして配列決定してDNA配列中の変化が計画通りに起っていることを確認した。再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域バージョン「f」の配列を配列番号54に示す。

【0050】

再構成ヒトPM-1抗体V領域の種々のバージョンのDNA配列を確認した後、再構成ヒトPM-1抗体V領域をコードするDNAを、ヒトC領域をコードするDNAをすでに含有する哺乳類細胞発現ベクターにサブクローニングした。すなわち、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域をコードするDNAをヒトL鎖C領域をコードするDNA配列に連結し、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域をコードするDNAをヒトC領域をコードするDNA配列に連結した。再構成ヒトPM-1抗体のより高いレベルの発現を達成するため、図1に示すようなHCMV発現ベクターを修飾して、HCMVプロモーター・エンハンサー領域をヒトエロンゲーションファクター(human elongation factor; HEF-1)プロモーター・エンハンサーにより置き換えた(図15を参照のこと)。

【0051】

次に再構成ヒトL鎖V領域バージョン(a)と、H鎖V領域バージョン(a)~(f)

のすべての組合せをヒトIL-6Rへの結合について試験し、そしてその結果、実施例11に詳細に記載するように、L鎖バージョン(a)とH鎖バージョン(f)とを含んで成る再構成ヒト抗体がキメラPM-1抗体(a)と同じレベルでIL-6Rに結合する能力を示した。

【0052】

発現のレベルを改良するための、再構成ヒトPM-1抗体V領域をコードする

DNAの変更

COS細胞中で生産される再構成ヒトPM-1抗体の発現レベルの検討において、再構成ヒトH鎖の発現が常に、再構成ヒトL鎖又はキメラL鎖もしくはH鎖の発現レベルに比べて約10分の1であることが明らかになった。低レベルの発現を生じさせる問題点は再構成ヒトH鎖V領域にあるようであった。低レベルの発現が低レベルの転写の結果であるか否かを特定するため、再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクターにより同時形質転換されたCOS細胞からRNAを調製した。マウスPM-1抗体V領域をコードするDNAのPCRクローニングについて記載したようにして一本鎖cDNAを合成した。再構成ヒトL鎖又はH鎖V領域をコードするDNA配列の両端を挟むように設計されたPCRプライマーを用いて、再構成ヒトL鎖V領域又は再構成H鎖V領域に対応する前記一本鎖cDNAからPCR生成物を生成せしめた。

10

【0053】

再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNAについて、2種類のPCR生成物が存在し、一方は予想通り408bpの長さを有し、他方はより短い299bpのPCR生成物であった。正しいサイズのPCR生成物はPCR生成物の全生成量の約90%を占め、そして短いPCR生成物は全生成量の約10%を占めた。再構成ヒトH鎖V領域についてもやはり2種類のPCR生成物が存在し、一方は予想通り444bpの長さを有し、そして他方は370bpの長さの短いPCR生成物であった。しかしながらこの場合、正しくない短い方のPCR生成物がPCR生成物の全生成量の大部分、すなわち約90%を占めた。正しいサイズのPCR生成物はPCR生成物の全生成量の約10%に過ぎなかった。これらの結果は、再構成ヒトV領域をコードするRNAの幾らかが欠失を含むことを示した。

20

【0054】

どの配列が除去されたかを決定するため、短い方のPCR生成物をクローニングし、そして配列決定した。DNA配列から、L鎖及びH鎖V領域のいずれについてもDNAの特定の部分が欠けていることが明らかになった。除去された配列を挟むDNA配列の検討により、これらの配列はスプライドナー-アクセプター配列のコンセンサス配列(Breathnach, Rら、Ann. Rev. Biochem. (1981) 50: 349-383)に相当することが明らかとなった。再構成ヒトH鎖の低い発現レベルは、再構成ヒトH鎖V領域の設計が、どちらかと言えば効果的なスプライドナー-アクセプター部位を不注意に形成させたためであると説明された。さらに、再構成ヒトL鎖V領域の設計はどちらかと言えば非効果的なスプライドナー-アクセプター部位を不注意に形成させたようであった。これらのスプライドナー-アクセプター部位を除去するため、ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域のそれぞれバージョン「a」及び「f」をコードするDNA配列のわずかな変更を前記のPCR-変異誘発法を用いて行った。

30

40

【0055】

低下した発現レベルの原因は、再構成ヒトL鎖及びH鎖V領域(配列番号: 54及び55)の両者のリーダー配列をコードするDNA中のイントロンの存在であると考えられた。これらのイントロンはもともと、再構成ヒトD1.3抗体のV領域(Verhoyenら、1988)をコードするDNAの作製において使用されたマウス μ H鎖リーダー配列(M.S. Neubergerら、Nature (1985) 314: 268-270)をコードするDNAに由来する。再構成ヒトD1.3抗体をコードするDNAは、マウス免疫グロブリンプロモーターを用いる哺乳類細胞ベクターにおいて発現されたためマウスリーダーイントロンの存在が重要であった。

【0056】

50

リーダーイントロンは免疫グロブリンプロモーターからの発現のためには重要であるが、しかしHCMVのごときウィルスプロモーターからの発現のためには重要でない(M. S. Neubergerら、Nucl. Acids Res. (1988) 16: 6713-6724)配列を含有している。再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖をコードするDNAが免疫グロブリンプロモーター以外のプロモーターを用いるベクターにおいて発現される場合、リーダー配列中のイントロンは、再構成ヒトV領域をコードするDNAのPCR-クローニングにより除去された(実施例12を参照のこと)。

【0057】

低下した発現レベルの他の可能性のある原因は、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域をコードするDNAとヒト-1C領域をコードするDNAとの間のイントロン内の約190bpの非機能的DNAの存在であると考えられた。再構成ヒトBI-8H鎖V領域(P. T. Jonesら、Nature (1986) 321: 522-525)をコードするDNAにもともと由来するDNA配列から再構成ヒトPM-1H鎖V領域をコードするDNAを作製した。この最初の再構成ヒトV領域をコードするDNAはマウスNPのH鎖V領域(M. S. Neubergerら、Nature; M. S. Neubergerら、EMBO J. (1983) 2: 1373-1378)をコードするDNAから作製された。再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNAと、発現ベクターに再構成ヒトV領域をコードするDNAを連結するためのBamHI部位との間のイントロン中に存在する約190bpのこのストレッチは、再構成ヒトV領域をコードするDNAのPCRクローニングの過程で除去された。

【0058】

発現レベルを改良するために変形された再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖V領域の最終バージョンのDNA配列及びアミノ酸配列を配列番号: 57及び56に示す。これらのDNA配列は、表2に示した再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「a」、並びに表3に示した再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域のバージョン「f」をコードする。HEF-1発現ベクター(図15)に挿入された場合、これらのベクターはトランスフェクトされたCOS細胞中で約2µg/mlの抗体を一過性に生産する。より多量の再構成ヒトPM-1抗体を安定的に生産させるため、dhfr遺伝子を組み込んだ新しいHEF-1発現ベクターを作製した(実施例10及び図11を参照のこと)。

【0059】

欠陥のある(crippled)SV40プロモーターを連結したdhfr遺伝子を、ヒト-1H鎖を発現するHCMVベクターについて記載したのと同様にして、ヒト-1H鎖を発現するHEF-1ベクターに導入した。再構成ヒトPM-1抗体L鎖を発現するHEF-1ベクター及び再構成ヒトPM-1抗体H鎖を発現するHEF-1-dhfrベクターをCHO dhfr(-)細胞に同時形質転換した。安定に形質転換されたCHO細胞系を、ヌクレオシドを含有せず10%のFCS及び500µg/mlのG418を含有するAlpha-Minimum Essential Medium(-MEM)中で選択した。遺伝子増幅工程に先立って、CHO細胞系は10µg/10⁶細胞/日までの再構成ヒトPM-1抗体を生産することが観察された。

【0060】

マウスモノクローナル抗体AUK12-20のV領域と既知のヒト抗体のV領域との比較

マウスモノクローナル抗体AUK12-20のカッパーL鎖(L)V領域のFRとヒトL鎖V領域のサブグループ(HSG)I~IVのFRとの相同性、及びマウスモノクローナル抗体AUK12-20のH鎖V領域のFRとヒトH鎖V領域のサブグループ(HSG)I~IIIのFRとの相同性を表4に示す。

【0061】

10

20

30

40

【表 4】

表 4

マウス A U K 1 2 - 2 0 抗体の V 領域の F R と異なる種々のサブグループ
のヒト V 領域のコンセンサス配列の F R との間の同一性 (%)

A. L 鎖 V 領域における F R

H S G I	H S G II	H S G III	H S G IV
6 5 . 8	6 4 . 0	6 7 . 6	6 7 . 6

B. H 鎖 V 領域における F R

H S G I	H S G II	H S G III
5 8 . 6	3 5 . 3	4 9 . 1

10

20

【0062】

表 4 に示した様に、マウスモノクローナル抗体 A U K 1 2 - 2 0 のカッパー L 鎖 (L) V 領域は、ヒト L 鎖 V 領域のサブグループ (H S G) I ~ IV とそれぞれ同程度 (6 4 ~ 6 8 %) の同一性を示す。タンパクの D a t a b a s e “ L E E D S ” の検索より、H S G - IV に属するヒト抗体 L e n (M . S c h n e i d e r ら、P h y s i o l . C h e m . 3 5 6 , 5 0 7 - 5 5 7 , 1 9 7 5) の L 鎖 V 領域が最も高い 6 8 % の同一性を示す。一方、マウスモノクローナル抗体 P M - 1 のヒト型化に用いられているヒト抗体 R E I は H S G - I に属し、マウスモノクローナル抗体 A U K 1 2 - 2 0 の L 鎖 V 領域とは、

30

【0063】

上記により、マウスモノクローナル抗体 A U K 1 2 - 2 0 の L 鎖 V 領域のヒト型化に用いるヒト抗体は必ずしも H S G - IV に属する抗体から選ぶ必要もなく、マウスモノクローナル抗体 A U K 1 2 - 2 0 の L 鎖 V 領域のヒト型化には、マウスモノクローナル抗体 P M - 1 の L 鎖 V 領域のヒト型化の場合と同様に R E I を用いる。

【0064】

表 4 に示す様に、A U K 1 2 - 2 0 抗体の H 鎖 V 領域は、ヒト H 鎖 V 領域のサブグループ I (H S G - I) と最も高い同一性を示す。また、D a t a b a s e “ L E E D S ” の検索により、やはり H S G I に属するヒト抗体 H A X (S t o l l a r , B . D . ら、J . I m m u n o l . 1 3 9 , 2 4 9 6 - 2 5 0 1 , 1 9 8 7) が A U K 1 2 - 2 0 抗体の H 鎖 V 領域に対して約 6 6 % の同一性を示す。そこで再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体の H 鎖 V 領域の設計においては、H S G I に属するヒト抗体 H A X の F R、及び同様に H S G I に属する F R を含有するヒト型化 4 2 5 抗体 H 鎖 V 領域 (K e t t l e b o r o u g h C . A . , ら、P r o t e i n E n g i n e e r i n g , 4 , 7 7 3 - 7 8 3 , 1 9 9 1) の F R を用いる。ちなみに、A U K 1 2 - 2 0 抗体 H 鎖 V 領域はヒト型化 4 2 5 抗体 H 鎖 V 領域のバージョン a と約 6 4 % の同一性を示す。

40

50

【 0 0 6 5 】

再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域の設計

前記の理由により再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域のFRとしてREIのFRを使用し、表5に示すように再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域を設計した。

【 0 0 6 6 】

【表5】

表 5

	FR1		CDR1			
	1	2	3			
	12345678901234567890123		45677778901234			
			ABCD			
V _L AUK12-20	DIVLTQSPASLGVSLGQRATISC		RASKSVSTSGYSYMH			
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC					
RV _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC		RASKSVSTSGYSYMH			
	FR2		CDR2			
	4	5	5			
	567890123456789	0123456				
V _L AUK12-20	WYQQKPGQTPKLLIY	ASNLES				
REI	WYQQTPGKAPKLLIY					
RV _L	WYQQKPGKAPKLLIY	ASNLES				
	FR3			CDR3		
	6	7	8	9		
	78901234567890123456789012345678			901234567		
V _L AUK12-20	GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC			QHSRENPYT		
REI	GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDIATYYC					
RV _L	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC			QHSRENPYT		
	FR4					
	10					
	8901234567					
V _L AUK12-20	FGGGTKLEIK					
REI	FGGGTKLQIT					
RV _L	FGGGTKVEIK					

注：アンダーラインを付した5個のヌクレオチドはCAM

PATH-1H抗体の設計において変えられたものである

(表2の注を参照のこと)。

【 0 0 6 7 】

再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域の設計

前記の理由により、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域の設計に再構成ヒトV_Ha425のFRを用いる。ところで、こうして設計した再構成ヒトAUK12-20抗

10

20

30

40

50

体 H 鎖 V 領域をコードする DNA のヌクレオチド配列はスプライス供与配列とよく一致する配列を有することが見出された。このことから、再構成ヒト PM - 1 抗体の場合と同様に異常なスプライシングが再構成ヒト AUK 12 - 20 抗体の発現においても起こる可能性がある。このため、ヌクレオチド配列を部分的に変更することにより、スプライス供与配列様の配列を除去した。この修正された配列をバージョン a と称する。

さらに、再構成ヒト AUK 12 - 20 抗体 H 鎖 V 領域のバージョン b ~ d を設計した。バージョン a ~ d のアミノ酸配列を表 6 に示す。

【 0 0 6 8 】

そのアミノ酸配列はこの文献中の F i g . 6 に記載されており、それをコードする D N A のヌクレオチド配列は F i g . 4 及び 5 に記載されている) の F R を用いて再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体の H 鎖 V 領域バージョン「a」～「d」を次の表 7 に示すように設計した。

【 0 0 7 0 】

【 表 7 】

		表 7																																		
		FR1						CDR1																												
		1		2		3																														
		12345678901	2345678901	2345678901	234567890	1234567890	12345				10																									
V _H AUK12-20		E	I	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	M	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	SY	Y	I	H	
HAX		Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T					
s l e :																																				
1220Ha		Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	SY	Y	I	H	
1220Hb		-----																									S	---	----							
1220Hc		-----																									S	---	----							
1220Hd		-----																									S	---	----							
		FR2						CDR2																												
		4		5		6																														
		67890123456789	0123456789	012222345678901	23456789012345					20																										
								ABC																												
V _H AUK12-20		W	V	K	Q	S	H	G	K	S	L	E	W	I	G	Y	I	D	P	--	F	N	G	G	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G			
HAX		W	V	R	Q	A	P	G	Q	R	L	E	W	M	G																					
s l e :																																				
1220Ha		W	V	R	Q	A	P	G	Q	R	L	E	W	M	G	Y	I	D	P	--	F	N	G	G	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G			
1220Hb		-----											I	---	-----																					
1220Hc		-----											I	---	-----																					
1220Hd		-----											I	---	-----																					
		FR3																																		
		7		8		9																														
		6789012345678901	2222345678901234					30																												
								ABC																												
V _H AUK12-20		K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	T	A	Y	M	H	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R				
HAX		R	V	T	I	T	R	D	T	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R			
s l e :																																				
1220Ha		R	V	T	I	T	V	D	T	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R			
1220Hb		-----																									V	---	-----							
1220Hc		-----																									K	---	V	-----	-----					
1220Hd		-----																									K	---	V	-----	-----					
		CDR3			FR4																															
		10			11																															
		5678900012	34567890123																																	
		AB																																		
V _H AUK12-20		G	G	N	-	R	F	--	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A															
HAX											W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S															
s l e :																																				
1220Ha		G	G	N	-	R	F	--	A	Y	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	S	S															
1220Hb		-----									-----																									
1220Hc		-----									-----																									
1220Hd		-----									-----																									

【 0 0 7 1 】

注：s l e 1 2 2 0 H a 中のアンダーラインを付した 2 個の残基は H A X の F R からの変化を示す。s l e 1 2 2 0 H b , s l e 1 2 2 0 H c、及び s l e 1 2 2 0 H d につい

てはHAXのFR中のアミノ酸と異なるFR中のアミノ酸のみを示す。

ヒトIL-6Rに対する本発明のキメラ抗体又は再構成ヒト抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又は再構成抗体は哺乳類細胞、例えばCOS細胞又はCHO細胞中で発現される。

【0072】

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス前期(human cytomegalovirus immediate early; HCMV)プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-V_H-HC1、HCMV-V_L-HC_K、HCMV-12h-g1、HCMV-12-g等であって、pSV2neoに由来するもの(図1を参照のこと)が含まれる。

10

【0073】

本発明のために有用なプロモーターの他の具体例はヒト・エロンゲーション・ファクター1(HEF-1)プロモーターである。このプロモーターを含有する発現ベクターにはHEF-12h-g1及びHEF-12k-g(図8及び図9)、並びにHEF-V_H-g1及びHEF-V_L-g(図15)が含まれる。

宿主細胞系中での遺伝子増幅のため、発現ベクターはさらにdhfr遺伝子を含有することができる。dhfr遺伝子を含有する発現ベクターは例えばDHFRE-PMh-g1(図10)、DHFRE-RVh-PM1-f(図11)等である。

20

【0074】

要約すれば、本発明はまず、ヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域及びH鎖V領域、並びに該L鎖V領域をコードするDNA及びH鎖V領域をコードするDNAを提供する。これらは、ヒトIL-6Rに対するヒト/マウスキメラ抗体及び再構成ヒト抗体の作製のために有用である。モノクローナル抗体は、例えばAUK12-20、PM-1、AUK64-7、及びAUK146-15である。L鎖V領域は例えば配列番号:24,26,28又は30に示すアミノ酸配列を有し、そしてH鎖V領域は例えば配列番号:25,27,29,又は31に示すアミノ酸配列を有する。これらのアミノ酸配列は例えばそれぞれ配列番号:24~31に示すヌクレオチド配列によりコードされている。

30

【0075】

本発明はまた、

(1)ヒトL鎖C領域及びマウスL鎖V領域;並びに

(2)ヒトH鎖C領域及びマウスH鎖V領域;

を含んで成る、ヒトIL-6Rに対するキメラ抗体に関する。マウスL鎖V領域及びマウスH鎖V領域並びにこれらをコードするDNAは前記の通りである。前記ヒトL鎖C領域は任意のヒトL鎖C領域であることができ、そして例えばヒトC領域である。前記ヒトH鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、そして例えばヒトC1領域である。

40

【0076】

キメラ抗体の製造のためには2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクター、並びにエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウスH鎖V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを含んで成る発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をイン-ピトロ又はイン-ピボで培養してキメラ抗体を製造する。

【0077】

あるいは、マウスL鎖V領域及びヒトL鎖C領域をコードするDNA並びにマウスH鎖

50

V領域及びヒトH鎖C領域をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をイン・ビボ又はイン・ビトロで培養して目的とするキメラ抗体を生産させる。

【0078】

本発明はさらに、

(A) (1) ヒトL鎖C領域、及び

(2) ヒトL鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、及び

(2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-6Rに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成るH鎖；

を含んで成る、ヒトIL-6Rに対する再構成ヒト抗体を提供する。

【0079】

好ましい態様においては、前記L鎖CDRは配列番号24, 26, 28及び30のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列の範囲が表9において定義されるアミノ酸配列を有し、前記H鎖CDRは配列番号25, 27, 29及び31に示されるアミノ酸配列であって該アミノ酸配列の範囲が表9において定義されるアミノ酸配列を有し；前記ヒトL鎖FRがREIに由来するものであり；前記ヒトH鎖FRはNEW又はHGS Iコンセンサス配列又はHAXに由来するものであり；前記ヒトL鎖C領域はヒトC領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域はヒトC1である。

【0080】

好ましい態様においては、L鎖V領域は表2においてRV_Laとして示されるアミノ酸配列を有し、H鎖V領域は表3にRV_Ha、RV_Hb、RV_Hc、RV_Hd、RV_He又はRV_Hfとして示されるアミノ酸配列を有する。アミノ酸配列RV_Hfが最も好ましい。

【0081】

再構成抗体の製造のためには、2種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとに前に定義した再構成ヒトL鎖をコードするDNAを含んで成る発現ベクター、及びエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとに前に定義した再構成ヒトH鎖をコードするDNAを含んで成るもう一つの発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターを用いて哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そしてこの形質転換された細胞をイン・ビボ又はイン・ビトロで培養して再構成ヒト抗体を生産せしめる。

【0082】

あるいは、再構成ヒトL鎖をコードするDNA及び再構成ヒトH鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そしてこのベクターを用いて宿主を形質転換し、次にこの形質転換された宿主細胞をイン・ビボ又はイン・ビトロで培養して目的とする再構成ヒト抗体を生産せしめる。

こうして生産されたキメラ抗体又は再構成ヒト抗体は、常法に従って、例えばプロテインAアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等により単離、精製することができる。

【0083】

本発明のキメラL鎖又は再構成ヒトL鎖はH鎖と組み合わせることにより完全な抗体を作製するために使用することができる。同様に本発明のキメラH鎖又は再構成ヒトH鎖はL鎖と組み合わせることにより完全な抗体を作製するために用いることができる。

本発明のマウスL鎖V領域、再構成ヒトL鎖V領域、マウスH鎖V領域、及び再構成ヒトH鎖V領域は、本来、抗原であるヒトIL-6Rと結合する領域であり、それ自体として、又は他の蛋白質との融合蛋白質として医薬、診断薬等として有用であると考えられる。

また、本発明のL鎖V領域CDR及びH鎖V領域CDRも、本来、抗原であるヒトIL

10

20

30

40

50

- 6 R と結合する部分であり、それ自体として又は他の蛋白質との融合蛋白質として医薬、診断薬等として有用であると考えられる。

【0084】

本発明のマウス L 鎖 V 領域をコードする DNA はキメラ L 鎖をコードする DNA 又は再構成ヒト L 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。同様にマウス H 鎖 V 領域をコードする DNA はキメラ H 鎖をコードする DNA 又は再構成ヒト H 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。

また、本発明の L 鎖 V 領域 CDR をコードする DNA は再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする DNA 及び再構成ヒト L 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。同様に本発明の H 鎖 V 領域 CDR をコードする DNA は再構成ヒト H 鎖 V 領域をコードする DNA 及び再構成ヒト H 鎖をコードする DNA 作製のために有用である。

【実施例】

【0085】

次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例 1 . ヒト IL - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の V 領域をコードする DNA のクローン化

ヒト IL - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域をコードする DNA を次の様にしてクローン化した。

【0086】

1 . 全 RNA の調製

ハイブリドーマ AUK 12 - 20 からの全 RNA を、Chirgwin ら、Biochemistry, 18, 5294 (1979) により記載されている方法に従って調製した。すなわち、 2.1×10^8 個のハイブリドーマ AUK 12 - 20 の細胞を 20 ml の 4 M グアニジンチオシアネート (Fulka) 中で完全にホモジナイズさせた。ホモジネートを遠心管中の 5 . 3 M 塩化セシウム溶液層上に重層し、次にこれを Beckman SW 40 ローター中で 31,000 rpm にて 20 で 24 時間遠心分離することにより RNA を沈澱させた。

【0087】

RNA 沈澱物を 80% エタノールにより洗浄し、そして 1 mM EDTA 及び 0 . 5% SDS を含有する 10 mM Tris - HCl (pH 7 . 5) 150 μ l 中に溶解し、そしてそれに Proteinase (Boehringer) を 0 . 5 mg / ml となるように添加した後、37 にて 20 分間インキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、そして RNA をエタノールで沈澱させた。次に、RNA 沈澱物を 1 mM EDTA を含有する 10 mM Tris - HCl (pH 7 . 5) 200 μ l に溶解した。

【0088】

2 . 一本鎖 cDNA の合成

J . W . Larrick ら、Biotechnology, 7, 934 (1989) により記載されている方法に従って一本鎖 cDNA を合成するため、前記のようにして調製した全 RNA の約 5 μ g を 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM ジチオスレイトール、0 . 5 mM dATP, 0 . 5 mM dGTP, 0 . 5 mM dCTP, 0 . 5 mM dTTP, 35 μ M oligo dT プライマー (Amersham), 48 ユニットの RAV - 2 逆転写酵素 (RAV - 2 : Rous associated virus 2 ; Amersham) 及び 25 ユニットのヒト胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤 (Amersham) を含有する 50 mM Tris - HCl (pH 8 . 3) 緩衝液 10 μ l に溶解し、そしてこの反応混合物を 37 にて 60 分間インキュベートしそして次のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法のために直接使用した。

【0089】

3 . 抗体可変領域をコードする遺伝子の PCR 法による増幅

Thermal Cycler Model PHC - 2 (Techné) を用いて P

10

20

30

40

50

PCR法を行った。

(1) マウスL鎖V領域をコードする遺伝子の増幅

PCR法に使用するプライマーは、配列番号：1～11に示すMKV (Mouse Kappa Variable) プライマー (マウスカッパ型L鎖リーダー配列とハイブリダイズする) (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)、及び配列番号：12に示すMKC (Mouse Kappa Constant) プライマー (マウスカッパ型L鎖C領域とハイブリダイズする) (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)であった。

【0090】

まず、10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl 0.1 mM dATP 10, 0.1 mM dGTP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dTTP, 1.5 mM MgCl₂, 2.5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus), 0.25 μMのそれぞれのMKVプライマー、3 μMのMKCプライマー及び一本鎖cDNA合成の反応混合物1 μlを含有するPCR溶液100 μlを94の初期温度にて1.5分間そして次に94にて1分間、50にて1分間及び72にて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを25回反復した後、反応混合物をさらに72にて10分間インキュベートした。

【0091】

(2) マウスH鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：13～22に示すMHV (Mouse Heavy Variable) プライマー1～10 (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)、及び配列番号：23に示すMHC (Mouse Heavy Constant) プライマー (S. T. Jonesら、Biotechnology, 9, 88, 1991)を使用した。前記3.(1)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により増幅を行った。 20

【0092】

4. PCR生成物の精製および断片化

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片をQIAGEN PCR生成物精製キット (QIAGEN Inc. US) を用いて精製し、そして10 mM MgCl₂ 及び150 mM NaClを含有する100 mM Tris-HCl (pH7.6) 中で10ユニットの制限酵素SalI (GIBCO BRL) を用いて37にて3時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、そしてDNAをエタノール沈澱により回収した。次に、DNA沈澱物を10ユニットの制限酵素XmaI (New England Biolabs) により37にて2時間消化し、そして生ずるDNA断片を、低融点アガロース (FMC Bio. Products, 米国) を用いるアガロースゲル電気泳動により分離した。 30

【0093】

約450 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取りそして65にて5分間溶融せしめ、そしてこれと同容積の2 mM EDTA及び200 mM NaClを含有する20 mM Tris-HCl (pH7.5) を加えた。この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈澱により回収し、そして1 mM EDTAを含有する10 mM Tris-HCl (pH7.5) に溶解した。こうして、マウスカッパ型L鎖可変領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片、及びマウスH鎖可変領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片を得た。上記DNA断片はいずれもその5'-末端にSalI接着末端を有しそしてその3'-末端にXmaI接着末端を有する。 40

【0094】

5. 連結及び形質転換

上記のようにして調製したマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るSalI-XmaI DNA断片約0.3 μgを、プラスミドpUC19をSalI及びXmaIで消化することにより調製したpUC19ベクター約0.1 μgと、50 mM Tr 50

is - HCl (pH7.4), 10mM MgCl₂, 10mMジチオスレイトール、1mMスペルミジン、1mM ATP, 0.1μg/mlのウシ血清アルブミン及び2ユニットT4 DNAリガーゼ(New England Biolabs)を含有する反応混合物中で、16にて16時間反応させ連結した。

【0095】

次に、7μlの上記連結混合物を大腸菌DH5のコンピテント細胞200μlに加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、42にて1分間そして再び氷上で1分間静置した。次いで800μlのSOC培地(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)を加え、37にて1時間インキュベートした後、2xYT寒天培地(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)上にこの大腸菌をまき、37にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

10

【0096】

この形質転換体を、50μg/mlのアンピシリンを含有する2xYT培地5ml中で37にて一夜培養し、そしてこの培養物から、アルカリ法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従ってプラスミドDNAを調製した。

20

こうして得られた、ハイブリドーマAUK12-20に由来するマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをp12-k2と命名した。

上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマAUK12-20に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをSalI-XmaI DNA断片から作成し、そしてp12-h2と命名した。

【0097】

実施例2. マウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローン化

実施例1に記載したのと実質上同じ方法をハイブリドーマPM1, AUK64-7及びAUK146-15に適用して下記のプラスミドを得た：

30

ハイブリドーマPM1由来のカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドpPM-k3；

ハイブリドーマPM1由来のH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドpPM-h1；

ハイブリドーマAUK64-7由来のカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドp64-k4；

ハイブリドーマAUK64-7由来のH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドp64-h2；

【0098】

ハイブリドーマAUK146-15由来のカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドp146-k3；及び

40

ハイブリドーマAUK146-15由来のH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドp146-h1。

なお、上記プラスミドを含有する大腸菌株は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、ブダペスト条約に基づいて、1991年2月11日に寄託され、そして表8に示す受託番号を有する。

【0099】

【表 8】

表 8

プラスミド	配列番号：	受託番号	
p 1 2 - k 2	2 4	N C I M B	4 0 3 6 7
p 1 2 - h 2	2 5	N C I M B	4 0 3 6 3
p P M - k 3	2 6	N C I M B	4 0 3 6 6
p P M - h 1	2 7	N C I M B	4 0 3 6 2
p 6 4 - k 4	2 8	N C I M B	4 0 3 6 8
p 6 4 - h 2	2 9	N C I M B	4 0 3 6 4
p 1 4 6 - k 3	3 0	N C I M B	4 0 3 6 9
p 1 4 6 - h 1	3 1	N C I M B	4 0 3 6 5

10

20

【0100】

実施例 3 . DNA の塩基配列の決定

前記のプラスミド中の cDNA コード領域の塩基配列を、Sequenase™ Version 2.0 キット (U.S. Biochemical Corp、米国) を用いて決定した。

まず、前記のようにして得られたプラスミド約 3 μg を 0.2 N NaOH により変性し、配列決定用プライマーとアニールさせ、そしてキット添付の処方に従って ³⁵S - dATP により標識した。次に、標識された DNA を、8 M 尿素を含有する 6 % ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、ゲルを 10 % メタノール及び 10 % 酢酸により固定し、乾燥し、そしてオートラジオグラフィにかけることにより塩基配列を決定した。

各プラスミドの cDNA コード領域の塩基配列を配列番号：24 ~ 31 に示す。

【0101】

実施例 4 . CDR の決定

L 鎖及び H 鎖の V 領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ 4 つのフレームワーク部分が 3 つの超可変領域、即ち相補性決定領域 (CDR) により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR 領域のアミノ酸配列の可変性は極めて高い (Kabat, E.A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983)。

ヒト IL - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域の上記のアミノ酸配列に基づき、そして Kabat らの報告に従って IL - 6 R に対するマウスモノクローナル抗体の各 V 領域の CDR を表 9 に示す如く決定した。

【0102】

【表 9】

表 9

プラスミド	配列番号 :	CDR(1)	CDR(2) (アミノ酸番号)	CDR(3)
p12-k2	24	24-38	54-60	93-101
p12-h2	25	31-35	50-66	99-105
pPM-K3	26	24-34	50-56	89-97
pPM-h1	27	31-36	51-66	99-108
p64-k4	28	24-38	54-60	93-101
p64-h2	29	31-35	50-66	99-109
p146-k3	30	24-34	50-56	89-97
p146-h1	31	31-35	50-66	99-106

10

20

【0103】

実施例 5 . クローン化された cDNA の発現の確認 (1)

発現プラスミドの作製

PCR 法によりクローン化された AUK12-20 抗体の L 鎖及び H 鎖の V 領域をコードする cDNA からキメラ L 鎖 / H 鎖をコードする DNA を作製した。マウス AUK12-20 の V 領域をコードする cDNA を、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) のエンハンサー及びプロモーターを含有する哺乳類細胞発現ベクター (HCMV 発現ベクターと称する) (図 1 . 実施例 8) 中でヒト C 領域をコードする DNA に容易に連結するためには、AUK12-20 抗体の V 領域をコードするマウス cDNA 配列の 5' - 末端及び 3' - 末端に便利な制限酵素切断部位を導入することが必要であった。

30

【0104】

5' - 末端及び 3' - 末端へのこれらの修飾は PCR 法を用いて行った。2 セットの PCR プライマーを設計しそして合成した。マウス L 鎖 V 領域及び H 鎖 V 領域の両方について、リーダー配列の始めをコードする DNA にハイブリダイズし、効率的な翻訳のために必須の DNA 配列 (Kozak, M., J. Mol. Biol. 196: 947-950, 1987) を維持しそして HCMV 発現ベクターへのクローニングのための HindIII 部位を形成するために、L 鎖 V 領域後方プライマー (配列番号: 32)、及び H 鎖 V 領域後方プライマー (配列番号: 33) を調製した。前方 PCR - プライマーは、J 領域の末端をコードする DNA にハイブリダイズし、C 領域へのスプライシングのために必須の DNA 配列を維持しそして HCMV 発現ベクターでのヒト C 領域への連結のための BamHI 部位を形成するように、L 鎖 V 領域前方プライマー (配列番号 34)、及び H 鎖 V 領域前方プライマー (配列番号 35) を調製した。

40

【0105】

PCR による増幅に続き、PCR 生成物を HindIII 及び BamHI により消化し、ヒト L 鎖又は H 鎖 C 領域 DNA を含有する HCMV ベクターにクローン化し、そして塩基配列を決定して PCR 法による増幅中にエラーが生じなかったことを確認した。得ら

50

れる発現ベクターをHCMV-12k-gk及びHCMV-12h-g 1と称する。

HCMV発現ベクターの構造を図1に示す。プラスミドHCMV-V_L-HCにおいて、V_L領域は任意のマウスL鎖V領域コード配列であることができる。この例において、AUK12-20 L鎖V領域を挿入することによりHCMV-12k-gkを得た。プラスミドHCMV-V_H-HC 1において、V_H領域は任意のマウスH鎖V領域コード配列であることができる。この例においてはAUK12-20のH鎖V領域を挿入してHCMV-12h-g 1を得た。

【0106】

COS細胞での一過性(transient)発現

キメラAUK12-20抗体のCOS細胞での一過性発現を見るため、前記発現ベクターをCOS細胞において試験した。Gene Pulsar装置(BioRad)を用いる電気穿孔法(electroporation)によりDNAをCOS細胞に導入した。すなわち、COS細胞を 1×10^7 個/mlになるようにphosphate-buffered saline(PBS)に懸濁し、この細胞浮遊液0.8mlにDNA(各プラスミドにつき10 μ g)を加えた。1,900ボルト(V)、25マイクロファラッド(μ F)の電気容量にてパルスを与えた。

【0107】

室温にて10分間の回復期間の後、エクレクトロポレーションした細胞を、10%のウシ胎児血清を含有するDMEM培地(GIBCO)8mlに加えた。72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離して細胞破片を除去し、そして無菌条件下で4にて短時間、又は-20にて長時間貯蔵した。

【0108】

酵素免疫測定法(ELISA)によるキメラ抗体の定量

トランスフェクトされたCOS細胞の培養上清をELISAにより測定して、キメラ抗体が生産されていることを確認した。キメラ抗体を検出するため、プレートをヤギの抗ヒトIgG(Whole molecule)(Sigma)によりコートした。ブロックした後、COS細胞からの培養上清を段階希釈しそして各ウエルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ-結合ヤギ抗-ヒトIgG(鎖特異的、Sigma)を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止しそして405nmにおける吸光度を測定した。標準として精製ヒトIgG(Sigma)を用いた。

【0109】

ヒトIL-6Rへの結合能を確認するための酵素免疫測定(ELISA)

トランスフェクトされたCOS細胞からの培地をELISAにより測定して、生産されたキメラ抗体が抗原に結合し得るか否かを決定した。抗原への結合の検出のため、プレートをMT18マウスモノクローナル抗体(参考例1)でコートした。1% BSAでブロックした後、可溶性組換えヒトIL-6R(SR344)を加えた。

洗浄した後、COS細胞からの培養上清を段階希釈し、そして各ウエルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgGを加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405nmにおける吸光度を測定した。

【0110】

この結果を図2に示した。キメラ抗体AUK12-20をコードする遺伝子のCOS細胞へのトランスフェクションを実施した。このCOS細胞の培養上清サンプルは、IL-6Rに対する強い結合能を示し、図2に(オープンサークル)で示す如く、サンプルの希釈度(抗体の濃度)依存的に405nmにおける吸光度が変化し、サンプル中にIL-6Rレセプターに対する抗体が含まれていることが確認された。

【0111】

ヒトIL-6RとIL-6の結合を阻害する能力の測定

トランスフェクトされたCOS細胞からの培養上清を測定して培地中に存在する抗体が

、 I L - 6 R と I L - 6 との結合を阻害するか否かを調べるために、ビオチン化 I L - 6 との競合的結合阻害能を調べた。プレートに M T 1 8 マウスモノクローナル抗体 (参考例 1) でコートした。ブロッキングの後、可溶性組換えヒト I L - 6 R (S R 3 4 4) を加えた。洗浄した後、C O S 細胞からのサンプルを段階希釈し、そしてビオチン化 I L - 6 と共に各ウェルに加えた。

【 0 1 1 2 】

洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンを加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして吸光度を 4 0 5 nm にて測定した。精製マウス A U K 1 2 - 2 0 モノクローナル抗体を陽性対照として用いた。無関係の抗体を発現する C O S 細胞からの培地を陰性対照として用いた。

10

【 0 1 1 3 】

この結果を図 3 に示した。キメラ抗体 A U K 1 2 - 2 0 をコードする遺伝子でトランスフェクトした C O S 細胞の培養上清は、最高、及び 2 番目に高いサンプル濃度で I L - 6 R と I L - 6 の結合を阻害した。すなわち、図 3 に示す如く、サンプル希釈度 (抗体の濃度) 依存的に 4 0 5 nm における吸光度が変化し、サンプル中の抗体が I L - 6 R と I L - 6 の結合を阻害していることが認められた。これは陽性対照の吸光度の抗体濃度依存的変化 () にほぼ一致することからも確認出来た。

なお、陰性対照 () は阻害活性が全く認められなかった。

【 0 1 1 4 】

20

実施例 6 . クローン化 c D N A の発現の確認 (2) (キメラ P M - 1 抗体の作製)

発現ベクターの作製

キメラ P M - 1 抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウス P M - 1 L 鎖及び H 鎖 V 領域をコードする c D N A クローン p P M - k 3 及び p P M - h 1 を P C R 法により変形し、そして H C M V 発現ベクター (図 1 を参照のこと) に導入した。L 鎖 V 領域のための後方プライマー p m k - s (配列番号 : 3 8) 及び H 鎖 V 領域のための後方プライマー p m h - s (配列番号 : 4 0) を、リーダー配列の最初をコードする D N A にハイブリダイズし且つ K o z a k コンセンサス配列及び H i n d I I I 制限部位を有するように設計した。L 鎖 V 領域のための前方プライマー p m k - a (配列番号 : 3 6) 及び H 鎖 V 領域のための前方プライマー p m h - a (配列番号 : 3 9) を、J 領域の末端をコードする D N A 配列にハイブリダイズし且つスプライズドナー配列及び B a m H I 制限部位を有するように設計した。

30

【 0 1 1 5 】

L 鎖 V 領域のため、2 種類の前方プライマーを合成した。ほとんどの L 鎖においては、位置 1 0 7 のリジンが保存されているが、マウス P M - 1 L 鎖においては位置 1 0 7 がアスパラギンである。キメラ P M - 1 抗体の抗原結合活性に対するこの変化の効果を検討するため、前方プライマー p m k - b (配列番号 : 3 7) を、位置 1 0 7 がアスパラギンからリジンに変わるように設計した。P C R 反応に続き、P C R 生成物を精製し、H i n d I I I 及び B a m H I で消化し、そして p U C 1 9 ベクター (Y a n i s h e - P e r r o n ら、Gene (1 9 8 5) 3 3 : 1 0 3 - 1 0 9) にサブクローニングした。D N A 配列決定の後、H i n d I I I - B a m H I 断片を切出し、そして H 鎖 V 領域については発現ベクター H C M V - V_H - H C 1 にクローン化して H C M V - P M h - g 1 を得、そして L 鎖 V 領域については H C M V - V_L - H C 1 にクローン化して H C M V - P M k a - g k 及び H C M V - P M k b - g k を得た。

40

【 0 1 1 6 】

C O S 細胞のトランスフェクション

キメラ P M - 1 抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターを C O S 細胞において試験した。H C M V - p m h - g 1 と、H C M V - p m k a - g k 又は H C M V - p m k b - g k のいずれかとを、Gene Pulsar 装置 (B i o R a d) を用いて

50

エレクトロポレーションによりCOS細胞に同時形質転換した。DNA(プラスミド当り10 μ g)を、PBS中1 \times 10⁷細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、1,900V, 25 μ Fの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の α -グロブリン不含有ウシ胎児血清を含有するDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(GIBCO)に加えた。72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、そして無菌条件下で4 $^{\circ}$ Cにて短期間貯蔵し、又は-20 $^{\circ}$ Cにて長期間貯蔵した。

【0117】

キメラPM-1抗体の発現及び分析

3日間の一過性発現の後、COS細胞からの培地を集め、そしてキメラPM-1抗体について試験した。培地をまずELISAにより分析して、トランスフェクトされたCOS細胞によりヒト様抗体が生産されたか否かを決定した。このアッセイにおいて標準として既知量の精製ヒトIgGを用いることにより、COS細胞からの培地中に存在するヒト様抗体(この場合、キメラPM-1抗体)の量を推定することが可能である。ヒト抗体の検出のため、プレートをヤギ抗-ヒトIgG(全体分子、Sigma)によりコートした。ブロッキングの後、COS細胞からのサンプルを段階希釈し、そして各ウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG(鎖特異的、Sigma)を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405nmでの吸光度を測定した。標準として精製ヒトIgG(Sigma)を加えた。

10

20

【0118】

キメラPM-1抗体をコードする遺伝子を担持するベクターによりトランスフェクトされたCOS細胞からの培地はヒト様抗体の発現について陽性であり、そしておよその量が上記のようにして測定された。

次に、キメラPM-1抗体をコードする遺伝子を担持するベクターによりトランスフェクトされたCOS細胞からの同じ培地をヒトIL-6Rに結合する能力について測定した。抗原への結合の測定のため、プレートを、ヒトIL-6Rに対する抗体であるMT18マウスモノクローナル抗体(参考例1)によりコートした。ブロッキングの後、可溶性ヒトIL-6R(SR344)を加えた。洗浄した後、サンプルを段階希釈し、そして各ウェルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG(鎖特異的;Sigma)を添加した。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405nmでの吸光度を測定した。この測定のために標準品は存在しなかった。

30

【0119】

2個のサンプルの内の1つは、マウスPM-1抗体中に見られるV領域と同一のV領域を有するキメラ抗体(キメラPM-1a抗体、図4)をコードする遺伝子によるトランスフェクトからのサンプルであった。他の1つのサンプルはL鎖V領域中の位置107に前記のような1個のアミノ酸変化を有するキメラ抗体(キメラPM-1b抗体、図4)をコードする遺伝子によるトランスフェクションからのものであった。いずれのサンプルも、サンプルの希釈により減少するIL-6Rに対する強い結合を示した。すなわち、作製されたキメラPM-1抗体は機能的であり、そしてその抗原によく結合することができる。

40

【0120】

最も重要なことは、機能的キメラPM-1抗体の証明は、正しいマウスPM-1V領域がクローン化されそして配列決定されたことの直接の証拠である。L鎖V領域中の位置107にいずれのアミノ酸を有するキメラ抗体も抗原IL-6Rによく結合した。マウスPM-1抗体のL鎖V領域中の位置107は抗原結合のためにあまり重要ではなく、そしてこの位置におけるアスパラギン及びリジンのいずれも満足に機能するようである。マウスPM-1抗体はそのL鎖V領域のこの位置にアスパラギンを有するので、キメラPM-1抗体を用いるその後のすべての研究は、マウスPM-1抗体に見出されるそれと同じパー

50

ジョン a を用いて行った。

【0121】

より多量の PM - 1 抗体を安定に生産するために、d h f r 遺伝子を含有する新たな HCMV 発現ベクターを作製した。キメラ PM - 1 抗体のより高い発現レベルを達成するための第一段階は、ベクター HCMV - V_H - H C₁ (図 1) を変形して、このベクターが欠陥のある (c r i p p l e d) SV40 プロモーターエンハンサーにより発現される d h f r 遺伝子を含有するようにすることであった。SV40 エンハンサー要素を p S V 2 - d h f r ベクター (S . S u b r a m a n i ら、M o l . C e l l . B i o l . (1 9 8 1) 1 : 8 5 4 - 8 6 4) から除去し、そして SV40 プロモーターによって発現される neo 遺伝子の代わりに「欠陥のある」SV40 プロモーターにより発現される d h f r 遺伝子を HCMV - V_H - H C₁ に挿入した。次に、この新しい HCMV - V_H - H C₁ - d h f r ベクターにマウス PM - 1 V 領域を挿入した。この改良された発現ベクターの作製を実施例 10 に詳細に記載する。 10

【0122】

CHO d h f r (-) 細胞 (G . U r l a u b ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 8 0) 7 7 : 4 2 1 6 - 4 2 2 0) を 2 種類のプロスミド DNA すなわちキメラ PM - 1 a L 鎖を発現するための HCMV - V_L - H C ベクター (HCMV - P M k a - g k) 及びキメラ PM - 1 H 鎖を発現するための HCMV - V_H - H C₁ - d h f r ベクター (D H F R - E - P M h - g₁ ; 実施例 10) により同時形質転換した。DNA (各プロスミドにつき 10 μ g / ml) を P B S 中 1 × 10⁷ 細胞 / ml の 0 . 8 ml のアリコートに加えた。1900 V の電圧 25 μ F の電気容量でパルスを与えた。 20

【0123】

室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、ヌクレオシド及び 10 % F C S を含有する Alpha Minimal Essential Medium 培地 (- M E M) 10 ml に加えた。一夜のインキュベーションの後、培地を、ヌクレオシドを含有せず 10 % F C S 及び 500 μ g / ml の G 4 1 8 (G I B C O) を含有する - M E M に変えて、d h f r⁺ 及び neo⁺ 形質転換細胞の選択を行った。選択の後、選択されたクローンを用いて遺伝子増幅を行った。2 × 10⁻⁸ M メソトレキセート (M T X) 中での 1 ラウンドの増幅の後、約 3 . 9 μ g / 10⁶ 細胞 / 日のキメラ PM - 1 a の抗体を生産する細胞系 (P M 1 k 3 - 7) を選択した。 30

【0124】

ヒト IL - 6 R への IL - 6 の結合を阻害するキメラ抗体の能力についての E L I S A 測定

トランスフェクトされた COS 細胞において又は安定な CHO 細胞系において生産された抗体を測定して、それらが、IL - 6 R へのビオチン化 IL - 6 の結合と競争するか否かを決定した。プレートをマウス抗体 MT 1 8 によりコートした。ブロッキングの後、可溶性組換えヒト IL - 6 R (S R 3 4 4) を加えた。洗浄の後、COS 細胞からのサンプルを段階希釈し、そしてビオチン化 IL - 6 と一緒に各ウェルに加えた。洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジンを加えた。インキュベーション及び洗浄後、基質緩衝液を加えた。インキュベーションの後、反応を停止させ、そして 405 nm における吸光度を測定した。結果を図 5 に示す。 40

【0125】

実施例 7 . 再構成ヒト PM - 1 抗体の作製

より迅速に且つより効率的に C D R 移植を達成するため、P C R による逐次 C D R 移植法を開発した。この方法は P C R 変異誘発法 (K a m m a n ら、N u c l . A c i d . R e s . 1 7 : 5 4 0 4 , 1 9 8 9) に基く。

C D R 移植のための選択されたヒト FR をコードする DNA を含有する鋳型 DNA を調製するために、適当な再構成ヒト V 領域をコードする DNA を便利なベクターに再クロニングする必要があった。プロスミド a l y s 1 1 及び F 1 0 の DNA はそれぞれ再構成 50

ヒト D 1 . 3 の L 鎖 及び H 鎖 をコードしており、ヒト R E I からの F R をコードする D N A 及び N E W からの F R をコードする D N A をそれぞれ含有する。

【 0 1 2 6 】

再構成ヒト D 1 . 3 の L 鎖 V 領域をコードする D N A 配列を含有する約 5 0 0 bp の N c o I - B a m H I 断片を a l y s 1 1 から切り出し、そして H i n d I I I 及び B a m H I で開裂された p B R 3 2 7 にサブクローニングしてプラスミド V l - l y s - p B R 3 2 7 を得た。この V l - l y s - p B R 3 2 7 からの H i n d I I I - B a m H I 断片を、H i n d I I I 及び B a m H I により開裂された p U C 1 9 に挿入してプラスミド V l - l y s - p U C 1 9 を得た。

【 0 1 2 7 】

再構成ヒト D 1 . 3 の H 鎖 V 領域をコードする D N A 配列を含有する約 7 0 0 bp の N c o I - B a m H I 断片を F 1 0 から切り出し、そして H i n d I I I - N c o I アダプターを用いて p B R 3 2 7 の H i n d I I I - B a m H I 部位にサブクローニングし、V h - l y s - p B R 3 2 7 を得た。次に、このプラスミドから H i n d I I I - B a m H I 断片を切り出し、そして H i n d I I I 及び B a m H I により開裂された p U C 1 9 にサブクローニングして V h - l y s - p U C 1 9 を得た。

【 0 1 2 8 】

なお、プラスミド a l y s 1 1 及び再構成ヒト D 1 . 3 の L 鎖 V 領域 F R をコードする D N A 配列はヒト型化 C A M P A T H - 1 H 抗体 (N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 (1 9 8 8)) のそれと同じである。鑄型として使用した、プラスミド F 1 0 中の再構成ヒト D 1 . 3 の H 鎖 V 領域をコードする D N A 配列は、V . V e r h o e y ら、S c i e n c e 2 3 7 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6 (1 9 8 8) の F i g . 2 に記載されている。

【 0 1 2 9 】

図 6 は、再構成ヒト P M - 1 の H 鎖 V 領域の第一バージョンをコードする D N A の作製のために使用されたプライマー及び P C R 反応を模式的に示す。後方プライマー A (A P C R 1 ; 配列番号 : 4 1) 及び前方プライマー E (A P C R 4 ; 配列番号 : 4 2) は、このベクター上の D N A 配列にハイブリダイズする。A P C R 1 及び A P C R 4 は p U C 1 9 ベクターのために特に設計されたが、ユニバーサル M 1 3 配列プライマーを使用することもできる。

【 0 1 3 0 】

C D R 1 移植 / 変異誘発プライマー B (p h v - 1 ; 配列番号 : 4 3) 、 C D R 2 移植プライマー C (p h v - 2 ; 配列番号 : 4 4) 、 及び C D R 3 移植プライマー D (p h v - 3 ; 配列番号 : 4 5) は 4 0 ~ 6 0 bp の長さを有し、マウス P M - 1 の H 鎖 V 領域の C D R をコードする D N A 及び該 C D R をコードする D N A を挟む鑄型 D N A 中のヒト F R をコードする D N A 配列から成る。第一の P C R 反応において前方プライマー A P C R 4 及び後方プライマー D を用いた。マウス P M - 1 の C D R 3 配列をコードする D N A を含有する第一 P C R 生成物を精製し、そして第二 P C R 反応において後方プライマーとしてのプライマー C と共に前方プライマーとして使用した。

【 0 1 3 1 】

同様にして、マウス P M - 1 の C D R 2 及び C D R 3 をコードする D N A を含有する第二 P C R 生成物、並びにマウス P M - 1 の 3 個すべての C D R をコードする D N A を含有する第三 P C R 生成物をそれぞれ次の P C R 段階のプライマーとして使用した。完全な再構成ヒト P M - 1 H 鎖 V 領域をコードする D N A を有する第四 P C R 生成物を精製し、H i n d I I I 及び B a m H I により消化し、そしてさらに分析するために p U C 1 9 にサブクローニングした。

【 0 1 3 2 】

再構成ヒト P M - 1 抗体 H 鎖 V 領域をコードする D N A の作製のために 3 種類の変異誘発プライマー p h v - 1 , p h v - 2 及び p h v - 3 を合成した。これらは 8 M 尿素を含有する 1 2 % ポリアクリルアミドゲル上で精製した。変異誘発プライマー p h v - 1 は、マウス P M - 1 抗体の C D R 1 の移植のためのみならずヒト F R 1 中の位置 2 7 及び 3 0

10

20

30

40

50

におけるそれぞれのSerからTyrへ、及びSerからThrへの変異のために設計された。各100 μ lのPCR反応物は典型的には10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、250 μ M dNTP、50ngの鋳型DNA (Vh-lys-pUC19)、2.5uのAmpliTaq (Perkin Elmer Cetus)、及びプライマーを含有した。

【0133】

1 μ Mずつのphv-3プライマー及びAPCR4プライマーを含む第一のPCR反応を行い、94にて1.5分間の最初の変性の後、94にて1分間、37にて1分間及び72にて1分間の30サイクルを反復した。アニーリング段階と合成段階の間の変温時間は2.5分間であった。最終サイクルの完了の後、72にて10分間の最終伸長反応を行った。523bpのPCR生成物を1.6%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そして次に第二のPCR反応におけるプライマーとして使用した。

10

【0134】

第二のPCR反応において約1 μ gの精製された第一PCR生成物及び25pmoleの変異誘発プライマーphv-2をプライマーとして使用した。PCR条件は第一のPCR反応について記載したのと同じであった。同様にして、第二のPCR反応からの665bpのPCR生成物をプライマーphv-1と共に第三のPCR反応において使用し、そして第三のPCR反応からの737bpのPCR生成物をプライマーAPCR1と共に第四のPCR反応において使用した。第四のPCR反応からの1.172kbのPCR生成物を精製し、HindIII及びBamHIで消化し、そして次に再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域を含有する約700bpの断片をpUC19ベクターにサブクローニングした。配列決定した4個のクローンの内2個が正しいアミノ酸配列をコードするDNA配列を有しており、そしてpUC-RVh-PM1aと命名した。

20

【0135】

再構成PM-1抗体H鎖V領域の他のバージョンをコードするDNAを作製するため5種類の変異誘発PCRプライマーを合成した。各PCR反応は前記の反応条件と本質的に同じ条件下で行われた。バージョン「b」のため、変異誘発プライマーphv-m4 (Val-71 Arg-71) (番号はKabataらによる; 表4参照) (配列番号: 46)及びAPCR4を、鋳型DNAとしてのpUC-RVh-PM1aと共に第一PCR反応において使用した。この第1PCR反応からのPCR生成物を精製し、そしてプライマーAPCR1と共に第二PCR反応における前方プライマーとして使用した。第二PCR反応からのPCR生成物を1.6%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そしてpUC19にてサブクローニングしてpUC-RVh-PM1bを得た。

30

【0136】

同様にして、変異誘発プライマーphv-nm (Asp-1 Gln-1) (配列番号: 47)及び鋳型pUC-RVh-PM1bを用いてバージョン「c」をコードするDNA (pUC-RVh-PM1c)を得、変異誘発プライマーphv-m6 (Ile-48 Met-48) (配列番号: 48)及び鋳型pUC-RVh-PM1bを用いてバージョン「d」をコードするDNA (pUC-RVh-PM1d)を得、変異誘発プライマーphv-nm及び鋳型pUC-RVh-PM1cを用いてバージョン「e」をコードするDNA (pUC-RVh-PM1e)を得、そして変異誘発プライマーphv-m7 (Thr-28 Ser-28、及びPhe-29 Ile-29) (配列番号: 49)及び鋳型pUC-RVh-PM1bを用いてバージョン「f」をコードするDNA (pUC-RVh-PM1f)を得た。再構成H鎖V領域バージョン「f」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列番号54に示す。

40

【0137】

図7は、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の第一バージョンをコードするDNAの作製において使用したプライマー及びPCR反応を模式的に示す。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の第一バージョンをコードするDNAの作製のため、CDR1移植プライマー

50

p k v - 1 (配列番号: 50)、C D R 2 移植プライマー p k v - 2 (配列番号: 51) 及び C D R 3 移植プライマー p k v - 3 (配列番号: 52) を合成し、そして 8 M 尿素を含有する 12% ポリアクリルアミドゲル上で精製した。前記のようにして P C R 反応を行った。第一 P C R 反応物は 1 μ M ずつの p k v - 3 プライマー及び A P C R 4 プライマーを含有した。第一 P C R 反応からの 350 bp の P C R 生成物を 1.5% 低融点アガロースゲルを用いて精製し、そして第二 P C R 反応における前方プライマーとして使用した。

【0138】

第二 P C R 反応からの P C R 生成物を精製し、B a m H I 及び H i n d I I I で消化し、そして C D R 3 が移植された D N A を含有する 500 bp 断片を D N A 配列決定のために p U C 19 ベクターにサブクローニングした。正しい配列を有するプラスミド D N A を同定し、そして次の P C R 反応における鑄型 D N A として使用した。第三 P C R 反応において 25 p m o l e の変異誘発プライマー p k v - 2 及び A P C R 4 を使用した。第三 P C R 反応からの P C R 生成物を精製し、そしてプライマー p k v - 1 と共に第四 P C R 反応におけるプライマーとして使用した。同様にして、第四 P C R 反応からの P C R 生成物を A P C R 1 プライマーと共に第五 P C R 反応におけるプライマーとして使用した。

【0139】

第五 P C R 反応からの 972 bp の P C R 生成物を精製し、B a m H I 及び H i n d I I I により消化し、そして D N A 配列決定のために p U C 19 にサブクローニングした。C D R 2 領域において問題点が認識され、さらに 2 回の P C R 反応が必要であった。第六 P C R 反応及び第七 P C R 反応において、p U C 19 ベクターにクローニングされた第五 P C R 反応からの P C R 生成物を鑄型 D N A として使用した。第六 P C R 反応においてプライマーは p k v - 2 及び A P C R 4 であった。第六 P C R 反応からの P C R 生成物を精製し、そして A P C R 1 プライマーと共に第七 P C R 反応におけるプライマーとして使用した。第七 P C R 反応からの P C R 生成物を精製し、B a m H I 及び H i n d I I I により消化し、そして 500 bp D N A 断片を D N A 配列決定のために p U C 19 にサブクローニングした。配列決定した 5 個のクローンの内 2 個のクローンが正しい D N A 配列を有していた。このクローンを p U C - R V 1 - P M 1 a と称する。この配列を配列番号: 55 に示す。

【0140】

再構成ヒト P M - 1 L 鎖 V 領域の他のバージョンをコードする D N A の作製のため、変異誘発プライマー p v k - m 1 (配列番号: 53) を合成した。P C R 反応は本質的に前記の通りであった。第一 P C R 反応において、変異誘発プライマー p k v - m 1 (P h e - 71 T y r - 71) 及び A P C R 4 プライマーを鑄型 D N A としての p U C - R V 1 - P M 1 a と共に使用した。第一 P C R 反応からの P C R 生成物を精製し、そして A P C R 1 プライマーと共に第二 P C R 反応におけるプライマーとして使用した。第二 P C R 反応からの P C R 生成物を精製し、B a m H I 及び H i n d I I I により消化し、そして D N A 配列決定のために p U C 19 にサブクローニングした。このクローンを p U C - R V 1 - P M 1 b と命名した。

【0141】

実施例 8 . 遺伝子操作された抗体を哺乳類細胞中で、発現させるためのヒトサイトメガロウイルス前期 (H C M V) プロモーターを用いるベクターの作製 (図 1)

キメラ P M - 1 抗体の L 鎖 V 領域をコードする D N A 断片及びキメラ P M - 1 抗体の H 鎖 V 領域をコードする D N A 断片を、それぞれ、哺乳類細胞中でヒト L 鎖又はヒト - 1 H 鎖を発現するように設計された H C M V 発現ベクター (図 1 を参照のこと) H C M V - V_L - K C 及び H C M V - V_H - H C 1 にまず挿入した。該 H C M V 発現ベクターの作製のための詳細な記載は、M a e d a ら、H u m a n A n t i b o d i e s a n d H y b r i d o m a s (1991) 2: 124 - 134; C . A . K e t t l e b o r o u g h ら、P r o t e i n E n g e n e e r i n g (1991) 4: 773 - 783 に公表されている。両ベクターは p S V 2 n e o (P . J . S o u t h e r n e t

10

20

30

40

50

al., J. Mol. Appl. Genet. (1982) 1: 327-341) に基礎を置き、そして免疫グロブリンL鎖又はH鎖の高レベルの転写のためにヒトサイトメガロウイルス(HCMV)プロモーター及びエンハンサー(M. Boshartら、Cell (1985) 41: 521-530)を含有する。

【0142】

L鎖発現ベクターはヒトC_H領域(T. H. Rabbittsら、Carr. Top. Microbiol. Immunol. (1984) 114: 166-171)をコードするゲノムDNAを含有し、そしてH鎖発現ベクターはヒトC_H1領域(N. Takahashiら、Cell (1982) 29: 671-679)をコードするゲノムDNAを含有する。これらのHCMV発現ベクターは多能であり、そして種々の哺乳類細胞タイプにおける一過性(transient)発現及び安定な発現のために使用することができる。

10

【0143】

実施例9. 遺伝子操作された抗体を哺乳類細胞中で発現させるためのヒトエロンゲーションファクター1 (HEF-1)プロモーターを使用するベクターの作製(図8及び図9)

ヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター1 (HEF-1)は最も豊富な蛋白質の1つである。これはほとんどの細胞で発現される。ヒトEF-1プロモーター-エンハンサーの転写活性はSV40前期プロモーター-エンハンサーのそれに比べて約100倍である(D. W. Kimら、Gene (1990) 91: 217-223; 及びT. Uetsukiら、J. Biol. Chem. (1989) 264: 5791-5798)。2.5 kbのHEF-1プロモーター-エンハンサー領域は、該遺伝子の5'-末端に接する約1.5 kbのDNA、第一エクソン中の33 bp、第一イントロン中の943 bp、及び第二エクソンの最初の部分の10 bpから成る。

20

【0144】

この後2.5 kbのHindIII-EcoRI断片をプラスミドpEF321-CAT(D. W. Kimら、Gene (1990) 91: 217-223; 及びT. Uetsukiら、J. Biol. Chem. (1989) 264: 5791-5798)から切り出し、そしてpdKCRベクター(M. Tsuchiyaら、Embo J. (1987) 6: 611-616)、K. O. Haraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 78, No. 3, 1527-1531, (1981)、(R. Fukunagaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 81, 5086-5090 (1984))にクローニングして、SV40前期プロモーター-エンハンサーを含有する約300 bpのHindIII-EcoRI断片を置き換えてpTEF-1を得た。

30

【0145】

pTEF-1をEcoRIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィルインし、そしてHindIIIリンカーに連結した。次に、この修飾されたpTEF-1ベクターDNAから約1.6 kbのHindIII-SmaI断片を切り出した。

HCMV-12h-g₁をEcoRIにより部分消化し、Klenowポリメラーゼによりフィルインし、そして自己連結することにより、実施例5において作製したHCMV-12h-g₁からプラスミドHCMV-12h-g₁(E2)を作製した。

40

【0146】

プラスミドHCMV-12h-g₁(E2)をEcoRIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィルインし、そしてHindIIIで消化した。ヒトC_H1領域をコードするDNA配列を含有する約7 kbの断片を、HEF-1プロモーター-エンハンサーを含有する前記の1.6 kb HindIII-SmaI断片に連結してHEF-12h-g₁を得た。このベクター中のHEF-1プロモーター-エンハンサー領域は、5'-領域に接する380 bpのDNAを除き、pTEF-1中のそれと同一であった。HindIII-BamHI断片として存在するこのH鎖V領域は、他のH鎖V領域と容易に交換

50

することができる。

【0147】

再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNAを含有するHindIII - BamHI DNA断片をpUC - RVh - PM1a, pUC - RVh - PM1b, pUC - RVh - PM1c, pUC - RVh - PM1d, pUC - RVh - PM1e及びpUC - RVh - PM1f (実施例7) から切り出し、そして前記のプラスミドHEF - 12h - g 1のHindIII - BamHI部位に挿入して、それぞれ発現ベクターRVh - PM1a, RVh - PM1b, RVh - PM1c, RVh - PM1d, RVh - PM1e、及びRVh - PM1fを得た。発現ベクターRVh - PM1a, RVh - PM1b, RVh - PM1c, RVh - PM1e、及びRVh - PM1f、並びにHEF - PMh - g 1は、それぞれ再構成ヒトPM - 1抗体H鎖V領域バージョン「a」, 「b」, 「c」, 「d」, 「e」及び「f」、並びにマウスPM - 1抗体H鎖V領域をコードするDNAを有する。 10

【0148】

L鎖発現ベクターHEF - 12k - gkを作製するため、HEF - 1 プロモーター - エンハンサー領域を含有する約3.0 kbのPvuI - HindIII断片をHEF - 12h - g 1から切り出し、そして実施例5において作製したHCMV - L鎖発現ベクターHCMV - 12k - gkからの約7.7 kbのPvuI - HindIII断片に連結してHEF - 12k - gkを得た。H鎖発現ベクターHEF - 12h - g 1の場合と同様に、HindIII - BamHI断片として存在するHEF - 12k - gk中のL鎖V領域をコードするDNAは他のL鎖V領域をコードするDNAと容易に交換することができる。なお、プラスミドHEF - PMh - g 1は、HEF - 12h - g 1 (図8) のEF1 プロモーター領域 (PvuI - HindIII断片) によりHCMV - pmh - g 1のHCHVプロモーター領域 (PvuI - HindIII断片) を置き換えることにより作製したものである。 20

【0149】

再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNAを含有するHindIII - BamHI DNA断片をpUC - RV1 - PM1a及びpUC - RV1 - PM1b (実施例7) から切り出し、そしてHEF - 12k - gkのHindIII - BamHI部位に挿入し、それぞれ発現ベクターRV1 - PM1a及びRV1 - PM1bを得た。発現ベクターRV1 - PM1a及びRV1 - PM1b、並びにHEF - PM_k - gkはそれぞれ再構成ヒトL鎖V領域「a」及び「b」、並びにマウスPM - 1 L鎖V領域をコードするDNAを有する。なお、プラスミドHEF - PM_k - gkは、HEF - 12k - gk (図9) のEF1 プロモーター領域 (PvuI - HindIII断片) によりHCMV - pmka - gkのHCMVプロモーター領域 (PvuI - HindIII断片) を置き換えることにより作製したものである。 30

【0150】

実施例10. 遺伝子操作された抗体をCHO細胞中で高レベルで発現させるための、欠陥SV40プロモーター - エンハンサー配列に連結されたジヒドロフォレートレダクターゼ (dhfr) 遺伝子を用いるベクターの作製 (図10及び図11) 40

SV40前期プロモーターからエンハンサー配列を除去するため、プラスミドpSV2 - dhfr (S. Subramaniら、Mol. Cell. Biol. (1981) 1: 854 - 864) (ATCC33694) をSphI及びPvuIIで消化し、Klenowポリメラーゼでフィルインし、そして自己連結してpSV2 - dhfr - Eを得た (図10)。HCMVプロモーター、H鎖V領域をコードするDNA及びヒト - 1C領域をコードするDNAを含有する約3.7 kbのEcoRI断片を、EcoRIによる部分消化によりHCMV - PMh - g 1から切り出した。この断片を、EcoRI - 消化pSV2 - dhfr - Eに連結してDHFR - E - PMh - g 1を得た。

【0151】

HEF - 1 プロモーター - エンハンサーを用いるH鎖発現ベクターに基いて類似のベ 50

クターを作製した(図11を参照のこと)。HCMV-12h-g 1に由来する約3.7 kbのEcoRI断片を、EcoRI-消化pSV2-dhfr-Eと連結してDHFR-E-12h-g 1を得た。DHFR-E-12h-g 1中のdhfr配列に続くBamHI部位を、BamHIによる部分消化、Klenowポリメラーゼによるフィルイン及び自己連結により除去した。dhfr cDNAを含有する約4 kbのPvuI-BamHI断片をこの修飾されたDHFR-E-12h-g 1から切り出し、そして実施例12において作製したRVh-PM1f-4からの約3 kbのPvuI-BamHI断片に連結してDHFR-E-RVh-PM1fを得た。

上記の改良されたプラスミドは本発明の再構成ヒトPM-1抗体の製造のために使用することができる。

10

【0152】

実施例11. 再構成ヒトPM-1抗体の種々のバージョンの発現及び分析

再構成ヒトPM-1抗体のL鎖及びH鎖を発現する各HEF-1ベクターをCOS細胞に同時形質転換(cotransfect)した。標準対照としてキメラPM-1抗体のL鎖及びH鎖を発現する各HEF-1ベクターもCOS細胞に同時形質転換した。3日後、形質転換されたCOS細胞からの培地を集め、そしてELISAにより(1)上清中に存在するヒトIgG抗体の量について、及び(2)IL-6Rに結合するそのIgGの能力について分析した。次に、同じサンプルをさらに、ELISAにより、ヒトIL-6RへのヒトIL-6の結合を阻害する該抗体の能力について試験した。

【0153】

再構成ヒトPM-1抗体L鎖を発現する2種類のベクターの一方(RV1-PM1a又はRV1-PM1b)及びキメラPM-1抗体H鎖を発現するベクター(HCMV-PMh-g 1)によりCOS細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域の2種類のバージョンの評価を行った。細胞をまた、キメラPM-1抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクター(HCMV-PMka-gk及びHCMV-PMh-g 1)により同時形質転換した。未精製のCOS細胞上清を用いるデータは、ヒトIL-6Rへの結合についての測定において、再構成ヒトPM-1抗体L鎖のバージョン「a」がキメラPM-1抗体L鎖と同等であることを示した。

20

【0154】

しかしながら、再構成ヒトPM-1抗体L鎖のバージョン「b」はヒトIL-6Rへの結合能を実質的に保持しなかった。これらの結果から、FR3中の位置71のフェニルアラニン(CAMPAHTH-1Hのために修飾されたヒトREI中に存在する)からチロシン(天然ヒトREI及びマウスPM-1抗体中に存在する)への変化は機能的抗原結合部位の形成に対して非常に有害であることが結論された。

30

再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の種々のバージョンを評価する次の実績において、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のバージョン「a」を常に用いた。

【0155】

再構成ヒトPM-1抗体H鎖の発現する6種類のベクターの1つ(RVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1d, RVh-PM1e又はRVh-PM1f)及び再構成ヒトPM-1抗体L鎖のバージョン「a」を発現するベクター(RV1-PM1a)によりCOS細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域の6種類のバージョンを評価した。細胞を、キメラPM-1抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクター(HEF-PMk-gk及びHEF-PMh-g 1)によっても同時形質転換した。未精製のCOS細胞上清を用いた予備データが示すところによれば、ヒトIL-6Rへの結合についての測定において、再構成ヒトPM-1抗体L鎖のバージョン「a」及び再構成ヒトPM-1抗体H鎖のバージョン「f」は、キメラPM-1抗体L鎖及びH鎖と同等であった。

40

【0156】

この予備データを確認するため、キメラPM-1抗体及び再構成ヒトPM-1抗体をCOS細胞上清から濃縮そしてプロテインAを用いて精製した。すなわち、COS細胞か

50

らの培地を100kdカットオフ限外濾過装置(Amicon)を用いて濃縮した。濃縮した培地をプロテインAアガロース(Affigel Protein A MAPSIIキット、BioRad)を用いて精製した。要約すれば、濃縮された培地を、5ベッドポリウムの結合緩衝液により平衡化されたプロテインAアガロースカラムに適用した。このカラムを15ベッドポリウムの結合緩衝液で洗浄し、そして次に5ベッドポリウムの溶出緩衝液で溶出を行った。そしてマイクロコンセンレーター(Centricon 10, Amicon)を用いて溶出液を濃縮し、溶出緩衝液をPBSに置換した。

【0157】

キメラPM-1抗体、及び再構成ヒトL鎖V領域のバージョン「a」と再構成ヒトH鎖V領域のバージョン「a」、「b」、「c」、「d」、「e」又は「f」とから成る再構成ヒトPM-1抗体の精製されたサンプルの分析を行った。L鎖の「a」バージョン+H鎖の「f」バージョンが明らかに最良の再構成ヒトPM-1抗体であった。このものは、キメラPM-1抗体と同様にヒトIL-6Rに結合する(図13)。これはまた、マウス抗体及びキメラ抗体と同様に、ヒトIL-6がヒトIL-6Rに結合するのを阻害する(図14)。

10

【0158】

実施例12. 発現レベルを改良するための再構成ヒトPM-1V領域の修正

再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖のV領域(配列番号:54及び55)のリーダー配列をコードするDNA配列内のイントロンを除去するため、V領域をコードするcDNAをPCRプライマーを用いて再クローニングした。L鎖及びH鎖の発現ベクターRV1-PM1a及びRVh-PM1fをCOS細胞に同時形質転換した。48時間後、全RNAを調製し(Chirgwinら、Biochemistry(1979)18:5294-5299)、そしてマウス抗体V領域のPCRクローニングについて記載したようにして一本cDNA合成のために5µgの全RNAを用いた。3種類のPCRプライマーを設計し、そして合成した。LEV-P1(配列番号:60)及びHEV-P1(配列番号:58)はスプライドナー配列及びBamHI部位を含有し、そしてそれぞれL鎖及びH鎖のV領域のための前方プライマーとして使用した。

20

【0159】

HEV-P2(配列番号:59)はHindIII部位及びATG開始コドンの前のKozakコンセンサス配列を含有し、そしてL鎖及びH鎖のV領域のための後方プライマーとして使用した。100µlずつのPCR反応物は20mM Tris-HCl(pH8.8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1µgのBSA, 250µM dNTP, 2.5uのVent DNAポリメラーゼ(Bio.Labs, U.K.), 50%の一本cDNA合成反応物並びに100pmoleずつの前方プライマー及び後方プライマーを含有した。

30

【0160】

各PCRチューブは50µlの鉱油で覆い、そして94にて1.5分間の最初の変性の後、94にて1分間、50にて1分間及び72にて1分間のサイクル反応を30回行い、そして次に72にて10分間インキュベートした。L鎖V領域を含有する408bpのPCR生成物及びH鎖V領域を含有する444bpのPCR生成物を、2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そしてBamHI及びHindIIIにより消化し、そしてpUC19ベクターにサブクローニングし、それぞれpUC-RV1-PM1a-3及びpUC-RVh-PM1f-3を得た。

40

【0161】

再構成ヒトPM-1抗体L鎖及びH鎖のV領域のDNA配列は不適切なスプライドナー部位及びアクセプター部位を含有することが明らかになった(配列番号:54及び55を参照のこと)。L鎖V領域内のこれらの部位は高頻度には使用されない(mRNAの約10%)が、H鎖V領域内のこれらの部位は高頻度で使用される(mRNAの約90%)。この異常なスプライシングが再構成ヒトPM-1抗体の低レベルの発現をもたらした。V領域の異常なスプライシングを回避するため、スプライドナー部位をPCR法によ

50

り除去した。H鎖V領域について、後方プライマーNEW-SP1（配列番号：61）及び前方プライマーNEW-SP2（配列番号62）を合成した。このプライマーはDNA配列TGG GTG AGAをDNA配列TGG GTT CGCに変える。PCR反応の条件はcDNAのクローニングについて前記した通りであったが、鋳型DNAは50ngのpUC-RVh-PM1f-3であり、そしてプライマーはHEV-P2とNEW-SP2、又はHEF-P1とNEW-SP1のいずれかであった。

【0162】

2個のPCR反応からのPCR生成物を2%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そしてPCR連結反応において使用した。0.5µgの第一PCR生成物を含有する98µlのPCR反応物及び5ユニットのVent DNAポリメラーゼを94℃にて2分間、50℃にて2分間及び72℃にて5分間インキュベートし、そして次に100pmoleずつのHEV-P1プライマー及びHEV-P2プライマーを加えた。PCRチューブを30µlの鉱油で覆い、そして94℃にて1分間、50℃にて1分間及び72℃にて1分間の25サイクルのPCRにかけ、そして次に72℃にて10分間インキュベートした。

10

【0163】

同様にして、再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域中のスプライスドナー領域をPCRプライマーREI-SP1（配列番号：63）及びREI-SP2（配列番号：64）を用いて除去した。該プライマーはDNA配列CAG GTA AGGをDNA配列CAG GAA AGGに変える。両PCR生成物、すなわちL鎖V領域についての408bpのDNA断片及びH鎖V領域についての444bpのDNA断片を2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そして配列決定のためpUC19にサブクローニングしてpUC-RV1-PM1a-4及びpUC-RVh-RM1f-4を得た。

20

【0164】

RVh-PM1fのHindIII-BamHI断片を、pUC-RVh-PM1f-4のHindIII-BamHI領域と置き換えることにより、RVh-PM1f-4を得た。再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域のイントロンが除去されたバージョン「a」の配列を配列番号57に示し、再構成ヒトPM-1抗体H鎖V領域のイントロンが除去されたバージョン「f」の配列を配列番号56に示す。

【0165】

実施例13. 再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域をコードするDNAの作製

再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域をコードするDNAの作製の工程を図16に示す。鋳型となるヒト抗体L鎖V領域をコードする遺伝子は、制限酵素HindIII及びBamHI部位を用いてpUC19ベクターに組み込まれている。8個のPCRプライマー（A～H）を準備し、第1のPCRにより、V領域をコードする遺伝子を4つの領域に分けて増幅させる。プライマーA及びHは、pUC19ベクター上のDNA配列と相補性を持つ。プライマーB、C及びDは、それぞれ移植するCDR領域の遺伝子配列を有する40～60bpのプライマーである。

30

【0166】

プライマーE、F及びGは、それぞれプライマーB、C及びDの5'側15～20bpのDNA配列と相補性を持つ。4個の第1PCRは、それぞれプライマーAとE、BとF、CとG、及びDとHを用いる。PCR生成物A-EはFR1をコードし、B-FはCDR1とFR2をコードする。A-E断片の3'側とB-F断片の5'側は15～20bpの相補性を持つので、後に、これら断片を連結することが可能となる。同様に、B-F断片は、CDR2及びFR3をコードするC-G断片とも相補性を持つ。そして、C-G断片はさらに、CDR3とFR4をコードするD-H断片とも相補性を持つ。こうしてこれら4種の断片は、互いの相補性により連結が可能となる。

40

【0167】

PCR反応液中にてこれら4つの断片の連結反応を行った後、プライマーA及びHを加

50

える事により、正しく4つの断片が連結したものが、この第2のPCRによって増幅してくる。こうして得られた第2のPCR生成物は、3つの移植されたCDRを有し、HindIII及びBamHIの消化後、pUC19ベクターにサブクローニングする。

さらに具体的には、鑄型として再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域バージョン「a」をコードするDNAがプラスミドpUC19に挿入されているプラスミドpUC-RV1-PM1a-4を用いた。

前記プライマーA～Hは次の配列を有する。

【0168】

【表10】

10

表 10

後方プライマー	配列番号	前方プライマー	配列番号
A. REVERSE	83	E. 1220-L1b	66
B. 1220-L1	65	F. 1220-L2b	68
C. 1220-L2	67	G. 1220-L3b	70
D. 1220-L3	69	H. UNIVERSAL	82

20

【0169】

CDR移植用の後方プライマー1220-L1, 1220-L2及び1220-L3については、8M尿素を含む12%ポリアクリルアミドゲルを用いて精製後使用した。

100μlずつのPCR反応物は20mM Tris-HCl (pH8.8), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1μgのBSA, 250μm dNTP, 5uのVent DNAポリメラーゼ (BioLabs, U.K.), 50ngのpUC-RV1-PM1a-4 DNA、そして各100pmolesの前方及び後方プライマーを含有した。各PCRチューブは50μlの鉱油で覆い、そして94にて1.5分間の最初の変性の後、94にて1分間、50にて1分間及び72にて1分間の反応を30サイクル行い、そして次に72にて10分間インキュベートした。

30

【0170】

252bp (A-E), 96bp (B-F), 130bp (C-G) 及び123bp (D-H) の各PCR生成物を2.0%の低融点アガロース (FMC, Bio. Products, USA) ゲルを用いて精製した。すなわち、各DNA断片を含有するアガロース片を切り取りそして65にて5分間溶融せしめ、そしてこれと同容積の2mM EDTA及び200mM NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) を加えた。この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈澱により回収し、そして1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5) に溶解し、そしてPCR連結反応において使用した。

40

【0171】

次に、0.2μgの各第1のPCR生成物及び5ユニットのVent DNAポリメラーゼを含有する98μlのPCR反応液を94にて2分間、50にて2分間及び72にて5分間インキュベートし、連結反応を行った。そして次に、各100pmoleのA (REVERSE) 及びH (UNIVERSAL) プライマーを加えて反応液を100μlとした後、これを50μlの鉱油でおおい、そして94にて1分間、50にて1

50

分間及び72にて1分間の反応を30サイクル行い、そして次に72にて10分間インキュベートした。

【0172】

マウスモノクローナル抗体AUK12-20のL鎖のCDRが移植されたL鎖V領域をコードするDNAを含有する558bpの第2PCRの生成物を2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そしてBamHI及びHindIIIにより消化後、pUC19ベクターにサブクローニングし、塩基配列を確認し、pUC-RV_L-1220aを得た。得られたL鎖V領域のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列表71に示す。

次いで、L鎖発現ベクターを構築するため、再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域を含有するHindIII-BamHI DNA断片を上記プラスミドpUC-RV_L-1220aから切り出し、L鎖発現ベクターHEF-12-gのHindIII-BamHI部位に挿入し、再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖V領域バージョンaの発現ベクターであるRV_L-1220aを得た。

【0173】

実施例14. 再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖の発現及び分析

COS細胞での一過性(transient)発現

再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖を発現するベクターRV_L-1220a及びキメラAUK12-20抗体H鎖を発現するベクター、HEF-12h-g1(実施例5)によりCOS細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖バージョン「a」の評価を行った。すなわち、COS細胞を 1×10^7 個/mlになるようにphosphate-buffered saline(PBS)に懸濁し、この細胞浮遊液0.8mlにDNA(各プラスミドについて10 μ g)を加えた。Gene Pulсар装置(BioRad)を用い1,900ボルト(V)、25マイクロファラッド(μ F)の電気容量にてパルスを与えた。

【0174】

室温にて10分間の回復期間の後、エクレクトロポレーションした細胞を、10%のウシ胎児血清(-グロブリン不含)を含有するDMEM培地(GIBCO)20mlに加えた。72時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離して細胞破片を除去し、そして無菌条件下で4にて短時間、又は-20にて長時間貯蔵した。

【0175】

酵素免疫測定法(ELISA)によるヒト様抗体の定量

トランスフェクトされたCOS細胞の培養上清をELISAにより測定して、キメラ抗体が生産されていることを確認した。ヒト様抗体を検出するため、プレートをやぎの抗ヒトIgG(Whole molecule)(Sigma)によりコートした。ブロックした後、COS細胞からの培養上清を段階希釈しそして各ウエルに加えた。

プレートのインキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ-結合ヤギ抗-ヒトIgG(鎖特異的、Sigma)を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加えた。さらにインキュベーションした後、反応を停止しそして405nmにおける吸光度を測定した。標準として精製ヒトIgG(Sigma)を用いた。

【0176】

ヒトIL-6Rへの結合能を確認するための酵素免疫測定(ELISA)

トランスフェクトされたCOS細胞からの上清をELISAにより測定して、生産されたヒト様抗体が抗原IL-6Rに結合し得るか否かを決定した。抗原への結合の検出のため、プレートをMT18マウスモノクローナル抗体(参考例1)でコートした。1%BSAでブロックした後、可溶性組換えヒトIL-6R(SR344)をプレートに加えた。

プレートを洗浄した後、COS細胞からの培養上清を段階希釈し、そして該プレートの各ウエルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgGをウエルに加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質緩衝液を加え

た。インキュベーションの後、反応を停止し、そして405 nmにおける吸光度を測定した。

【0177】

この結果を図17に示す。再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖バージョン「a」とキメラAUK12-20抗体H鎖の組み合わせによるヒト様抗体は、キメラAUK12-20抗体と同様にヒトIL-6Rに対する強い結合能を示し、サンプルの希釈度依存的に405 nmにおける吸光度が変化し、サンプル中にIL-6Rに対する抗体が含まれていることが確認された。また、この結果は、再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖のバージョン「a」がキメラAUK12-20抗体L鎖と同様に抗原結合能を持つことを示している。

【0178】

実施例15. ヒトサブグループI (HSGI) コンセンサス配列を用いた再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖遺伝子の構築

実施例13で示した方法と同様にして、AUK12-20抗体H鎖V領域のCDRをヒトサブグループIのコンセンサス配列をFRとして有する再構成ヒトV_Ha425 (Kettleboroughら、Protein Engineering, 4, 773-783, 1991) に移植した。まず、再構成ヒトV_Ha425 (上記文献中、Fig3) をコードするHindIII - BamHI DNA断片をプラスミドHCMV-RV_Ha-425-1から切り出し、pUC19ベクターのHindIII - BamHI部位にサブクローニングし、pUC-RV_H-425aを得た。

【0179】

これを鋳型DNAとして使用した。PCRに用いる8個のプライマー(A1~H1)を合成した。プライマー1220-H1は、CDR1の移植及びThr-28からSer-28の変更を誘導する様にデザインし、プライマー1220-H3はCDR3の移植及びSer-94からArg-94への変異を誘導する様にデザインした。プライマー1220-H1, 1220-H2及び1220-H3は、それぞれ8M尿素を含む12%ポリアクリルアミドゲルを用いて精製後、使用した。各プライマーのヌクレオチド配列は次の通りである。

【0180】

【表11】

表 11

後方プライマー	配列番号	前方プライマー	配列番号
A1. REVERSE	83	E1. 1220-H1b	73
B1. 1220-H1	72	F1. 1220-H2b	75
C1. 1220-H2	74	G1. 1220-H3b	77
D1. 1220-H3	76	H1. UNIVERSAL	82

【0181】

PCRの条件は、鋳型DNAとしてpUC-RV_H-425aを使用し、H鎖CDR移植用プライマーとして上記のものを使用した以外は実施例13に記載したのと同じであった。A1とE1、B1とF1、C1とG1、及びD1とH1のプライマー対を用いて第1PCR反応を行い、それぞれ186 bp (A1-E1), 75 bp (B1-F1), 173 bp (C1-G1) 及び105 bp (D1-H1) の各第1PCR生成物を2.0%の低融点アガロースゲルにて精製し、次の第2PCR連結反応において使用した。

【0182】

実施例13にて示した条件に従い、各0.2 μ gの上記第1PCR生成物を用いて第2PCR（PCR連結反応を含む）を行い、マウスAUK12-20抗体のH鎖V領域CDRが移植されたヒトH鎖V領域を含有する495bpのPCR生成物を得、これを2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製した。そしてBamHI及びHindIIIにより消化後、得られたBamHI-HindIII断片をpUC19ベクターにサブクローニングし、塩基配列を確認して、pUC-RV_H-1220aを得た。

【0183】

ところで、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域をコードするDNA配列を調べた結果、スプライスの供与配列とよく一致する配列が見い出された。この事は、再構成ヒトPM-1抗体の作成時に問題となった異常なスプライシングを引き起す可能性がある。そこで、この配列をPCR法により変異させた。変異誘導プライマーとして、SGI-SP1（配列番号97）及びSGI-SP2（配列番号98）を合成した。このプライマーは、DNA配列AAGGTGAGCをDNA配列AAAATCAGCに変える。PCR反応の条件は、前記条件と同様に行い、鋳型DNAは50ngのpUC-RV_H-1220aであり、そしてプライマーはSGI-SP1とUNIVERSAL（配列番号82）、またはSGI-SP2とREVERSE（配列番号83）のいずれかであった。

10

【0184】

2個のPCR反応からのPCR生成物を2%低融点アガロースゲルを用いて精製し、そしてPCR連結反応において使用した。各0.2 μ gの第1PCR生成物及び5uのVent DNAポリメラーゼを含有する98 μ lのPCR反応液を94にて2分間、50にて2分間、及び72にて5分間インキュベートし連結反応を行った。そして次に100pmoleずつのUNIVERSAL及びREVERSEプライマーを加え、50 μ lの鉱油でおおった後、94にて1分間、50にて1分間そして72にて1分間の第2PCRを30サイクル行い、そして次に72にて10分間インキュベートした。第2PCRで得られた495bpのDNA断片を2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、これをpUC19ベクターにサブクローニングした後、塩基配列を確認して、pUC-RV_H-1220a-2を得た。

20

【0185】

次いで、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域をコードするDNAを含有するHindIII-BamHI DNA断片を上記pUC-RV_H-1220a-2より切り出し、H鎖発現ベクターHEF-12h-g 1のHindIII-BamHI部位に導入し、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖のバージョンaの発現ベクターであるRV_H-1220aを得た。

30

【0186】

再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域の他のバージョン（b～d）をコードするDNAを作成するために2組の変異誘発PCRプライマーを合成した。各PCR反応は前記の反応条件と本質的に同じ条件下で行われた。バージョン「b」をコードするDNAの作成のため、2種の第1PCRにおいて、UNIVERSALプライマー（配列番号82）及び変異誘発プライマー1220H-m1a（配列番号78）、あるいは、REVERSEプライマー（配列番号83）と変異誘発プライマー1220H-m1b（配列番号79）の各PCRプライマー、並びに鋳型DNAとしてのpUC-RV_H-1220aを用いた。それぞれ202bp及び323bpの第1PCR生成物を2.0%低融点アガロースゲルを用いて精製後、前記の反応条件と同様に第2PCR（PCR連結反応を含む）を行い、495bpの生成物（バージョン「b」）を得た。これをHindIII-BamHIにより消化し、そして、pUC19ベクターにサブクローニングし、pUC-RV_H-1220bを得た。

40

【0187】

同様にして、変異誘発プライマー1220H-m2a（配列番号80）、1220H-m2b（配列番号81）及びこの生成物を鋳型pUC-RV_H-1220aを用いてPC

50

R生成物(バージョン「c」をコードするDNA)を得、HindIII及びBamHIで消化し、pUC19ベクターのHindIII-BamHI部位に挿入してpUC-RV_H-1220cを得た。さらに、変異誘発プライマー1220H-m1a(配列番号78)、1220H-m1b(配列番号79)及び鋳型としてのpUC-RV_H-1220cを用いてPCR生成物(バージョンd)を得、これをHindIII及びBamHIで消化してpUC19ベクターのHindIII-BamHI部位に挿入することによりpUC-RV_H-1220dを得た。

【0188】

なお、プラスミドpUC-RV_H-1220b中にコードされているの再構成ヒト抗体H鎖V領域バージョン「b」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列番号84に示し、pUC-RV_H-1220d中にコードされている再構成ヒトH鎖V領域バージョン「d」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列表85に示す。

10

【0189】

次いで、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖の各バージョンの発現ベクターを構築するために、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域をコードするDNAを含むHindIII-BamHI断片をpUC-RV_H-1220b、pUC-RV_H-1220c、及びpUC-RV_H-1220dより切り出し、H鎖発現ベクターHEF-12h-g1のHindIII-BamHI部位に挿入して、各バージョンの発現ベクターRV_H-1220b、RV_H-1220c、及びRV_H-1220dをそれぞれ得た。

20

【0190】

実施例16. 再構成ヒトAUK12-20抗体の種々のバージョンの発現及び分析

再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖を発現する4種類のベクターの1つ(RV_H-1220a、RV_H-1220b、RV_H-1220c、またはRV_H-1220d)及び再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖を発現するベクターRV_L-1220aによりCOS細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域の4種類のバージョンを評価した。

【0191】

比較のため、COS細胞をキメラAUK12-20抗体L鎖及びH鎖を発現する各ベクター(HEF-12h-g1及びHEF-12-g)によっても同時形質転換した。ヒトIL-6Rへの結合についての測定において、再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖と再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖のバージョン「b」、あるいは再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖と再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖のバージョン「d」との組み合わせによる再構成ヒト12-20抗体は、キメラAUK12-20抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果を図18及び図19に示す。

30

【0192】

実施例17. ヒト抗体HAXを用いた再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖遺伝子の構築

マウスモノクローナル抗体AUK12-20のH鎖V領域と最も相同性の高いヒト抗体は、タンパクデータベース“Leeds”の検索により、HAXであった(J. Immunology 139, 2496-2501, 1987, SLE患者由来B cell hybridoma 21/28の産生する抗体、遺伝子配列はFig. 4, 5に、アミノ酸配列はFig. 6に記載)。再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域の設計を、HAX抗体のFR領域とマウスモノクローナル抗体AUK12-20のH鎖V領域のCDRを用いて行った。

40

【0193】

マウスモノクローナル抗体AUK12-20のH鎖V領域の第一バージョン(S1e1220Ha)のCDRを含む再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域をコードする全DNAは化学合成にて作成した。すなわち、全長439bpのS1e1220Haをコード

50

するDNAを各々21bpの重複部位を有する90～94bpの長さの6本のオリゴヌクレオチド(sle1220h1～6;それぞれ、配列番号86～91)に分けて設計した。オリゴヌクレオチドの設計にあたり、2次構造の検索を行ない、構造上に問題のある部位に関して、アミノ酸置換がおきない様に、コドンの第3塩基を変換した。これらのオリゴヌクレオチドの相互関係及び2本鎖合成DNAの完成までの過程を図20に示す。

【0194】

PCR法を用いて図20に示す反応を行う。すなわち6本の合成オリゴヌクレオチドを同一PCR反応チューブに加え、第1のPCR反応を行う。これにより、2つのオリゴヌクレオチドのアニーリング伸長を行うことができ、さらに、4つのオリゴヌクレオチド、または、全長のオリゴヌクレオチドを得ることができる。次に、末端プライマーA(配列番号92)及びB(配列番号93)を加え、第2のPCR反応を行うことで、正しく全長を有するオリゴヌクレオチドのみを増幅することができる。得られた生成物を精製し、BamHI及びHindIIIにより消化後、pUC19ベクターにサブクローニングしてシーケンスを行う。

10

【0195】

具体的には、100mM Tris-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 0.1mM dATP, 0.1mM dGTP, 0.1mM dCTP, 0.1mM dTTP, 1.5mM MgCl₂及び2.5uのDNAポリメラーゼAmpliTaq(Perkin Elmer Cetus)並びに各オリゴヌクレオチド5pmoleを含有する98μlの反応混合物を94℃1.5分間の変性後、94℃3分間、50℃2分間、72℃5分間の反応を3サイクル行い、次に72℃にて10分間インキュベートした。

20

【0196】

反応液に50μMの末端プライマーAおよびBを1μlずつ加え、80μlの鉱油で覆い、94℃1.5分間の変性後、94℃にて1分間、50℃にて1分間、72℃1分間の反応を30サイクル行い、続いて72℃で10分間インキュベートした。439bpのPCR生成物を1.5%の低融点アガロースゲルを用いて精製し、制限酵素BamHIおよびHindIIIにより消化後、pUC19ベクターにサブクローニングして、塩基配列を確認した。得られたクローンをpUC-RV_H-sle1220Haとした。このプラスミド中にコードされている再構成ヒトAUK12-20抗体のH鎖V領域バージョン「a」のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列番号94に示す。

30

【0197】

次いで、再構成ヒトAUK12-20(sle1220Ha)抗体H鎖V領域をコードする遺伝子を含有するHindIII-BamHI DNA断片をpUC-RV_H-sle1220Haより切出し、H鎖発現ベクターHEF-12h-g1のHindIII-BamHI部位に導入し、RV_H-sle1220Haを得た。

【0198】

再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域の他のバージョン(「b」～「d」)を作成するため、2つの変異誘発プライマーsle1220Hm1(配列番号95)、及びsle1220Hm2(配列番号96)を合成した。各PCR反応では、実施例13で示されているVent DNAポリメラーゼ及び反応液組成を用いた。各PCR反応では、バージョン「b」及びバージョン「c」については、鋳型としてのpUC-RV_H-sle1220Ha, 50pmoleの変異誘発プライマーsle1220Hm1またはsle1220Hm2及び50pmoleの末端プライマーBを含有する反応混合物を94℃1.5分間の変性の後、94℃1分、50℃1分、72℃1分の30サイクルの反応にかけ、次に72℃で10分間インキュベートした。

40

【0199】

235bpまたは178bpの生成物を1.5%の低融点アガロースゲルを用いて精製し、第2のPCR反応のプライマーとして使用した。すなわち、50pmoleの末端プライマーAと、0.2μgのPCR生成物を加え、pUC-RV_H-sle1220Haを鋳型として、第2PCR反応を行い、439bpの生成物を1.5%低融点アガロースゲルで

50

精製、BamHI及びHindIIIで消化後pUC19ベクターにサブクローニングして、それぞれ構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域バージョン「b」又は「c」をコードするプラスミドpUC-RV_H-sle1220Hb又はpUC-RV_H-sle1220Hcを得た。

【0200】

再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域バージョン「d」をコードするDNAは次の様にして作製した。鋳型としてのpUC-RV_H-sle1220Hbを用いた。変異誘導プライマーsle1220Hm2及び末端プライマーBを50pmoleずつ用いて第1のPCR反応を30サイクル行った。得られた178bpのPCR生成物を1.6%の低融点アガロースゲルにより精製し、第2のPCRのプライマーとして用いた。このプライマーと50pmoleの末端プライマーAを用いて第2のPCRを行い、439bpのDNA断片を得た。これを、精製し、BamHI及びHindIIIにて消化後pUC19ベクターにサブクローニングし、ヌクレオチド配列を確認し、pUC-RV_H-sle1220Hdを得た。

10

【0201】

次いで、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖の各バージョンの発現ベクターを構築するため、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域をコードするDNAを含むBamHI-HindIII断片をpUC-RV_H-sle1220Hb, pUC-RV_H-sle1220Hc、およびpUC-RV_H-sle1220Hdより切り出し、H鎖発現ベクターHEF-12h-g 1のHindIII-BamHI部位に挿入して、各発現ベクター、RV_H-sle1220Hb, RV_H-sle1220HcおよびRV_H-sle1220Hdをそれぞれ得た。

20

【0202】

分析

再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖を発現する4種類のベクターのうちの1つ(RV_H-sle1220Ha, RV_H-sle1220Hb, RV_H-sle1220HcまたはRV_H-sle1220Hd)および、再構成ヒトAUK12-20抗体L鎖を発現するベクターRV_L-1220aを用いてCOS細胞を同時形質転換することにより、再構成ヒトAUK12-20抗体H鎖V領域の4種類のバージョンを、IL-6RへのIL-6の結合を阻害する能力について評価した。この結果を図21~24に示す。なお、これらの結果は、生産された抗体をプロテインAによって精製した後に得られたものである。

30

【0203】

上記のごとく、本発明によれば、キメラL鎖もしくは再構成L鎖又はキメラH鎖もしくは再構成H鎖のV領域、そして特にFR中の1個又は複数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置換してもなおヒトIL-6Rに結合する能力を維持している。従って本発明は、その本来の性質を維持している限り、1個又は複数個のアミノ酸が他のアミノ酸により置換されている、キメラ抗体及び再構成ヒト抗体、キメラL鎖及び再構成L鎖、キメラH鎖及び再構成H鎖、再構成L鎖V領域、並びに再構成H鎖V領域、並びにこれらをコードするDNAをも包含する。

40

【0204】

参考例

本発明において使用される出発ハイブリドーマは次の様にして作製された。

参考例1. ハイブリドーマ MT18の作製

ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製するため、免疫原として、細胞表面にヒトIL-6Rを発現するマウスT細胞を次の様にして作製した。すなわち、Y. Hirataら、J. Immunol. Vol. 143, 2900-2906 (1989)に開示されているプラスミドpZipneo IL-6Rを常法に従ってマウスT細胞系CTLL-2(ATCC TIB214)にトランスフェクトし、生ずる形質転換体を常法に従ってG418を用いてスクリーニングすることにより細胞

50

あたり約30,000個のヒトIL-6Rを発現する細胞株を得た。この細胞株をCTBC3と称する。

【0205】

CTBC3細胞を常法に従ってRPMI1640中で培養し、そして培養細胞をPBS緩衝液により4回洗浄し、そして 1×10^7 個の細胞をC57BL/6マウスに腹腔内注射して免疫感作した。この免疫感作は1週間に1回6週間にわたって行った。

この免疫感作されたマウスから脾臓細胞を得、そして常法に従ってポリエチレングリコールを用いて骨髓腫P3U1細胞を融合せしめ、そして融合した細胞を次の様にしてスクリーニングした。IL-6R陰性ヒトT細胞系JURKAT(ATCC CRL 8163)を、プラスミドpZipneo IL-6Rにより同時トランスフェクトし、そして形質転換された細胞をスクリーニングして、細胞当たり約100,000個のIL-6Rを発現する細胞系を得た。この細胞系をNJBC8と命名した。

【0206】

NP-40で細胞溶解したNJBC8を認識するがしかしNP-40で細胞溶解したJURKATを認識しない抗体を生産するハイブリドーマ細胞系をクローン化しそしてMT18と命名した。ハイブリドーマMT18は、工業技術院微生物工業技術研究所にブダペスト条約のもとに1990年7月10日に微工研条寄第2999号(FERM BP-2999)として寄託された。

【0207】

参考例2. ハイブリドーマPM1の作製

ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製するため、抗原として、ヒトIL-6Rを次の様にして抽出した。 3×10^9 個のヒト骨髓腫細胞(IL-6R生産細胞)を1mlの1%ジギトニン、10mMトリエタノールアミン緩衝液(pH7.4), 0.15M NaCl及び1mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド; 和光純薬)中で溶解した。他方、参考例1において調製したハイブリドーマMT18により生産されたMT18抗体を、ブロムシアンで活性化されたセファロース4B(Pharmacia)に常法に従って結合させた。このMT18抗体結合セファロース4Bを前記の細胞溶解物を混合することにより、セファロース4B上のMT18抗体に前記可溶化したIL-6Rを結合させた。セファロース4Bに非特異的に結合した物質を洗浄除去し、そしてSephrose 4BにMT18抗体を介して結合したIL-6Rを免疫原として使用した。

【0208】

前記の免疫原を用いてBALB/cマウスを1週間に1回4週間にわたり腹腔内に免疫感作した。次に、この免疫感作されたマウスから脾臓細胞を得、そして常法に従ってポリエチレングリコールを用いて骨髓腫細胞P3U1と融合せしめた。融合した細胞を次のようにしてスクリーニングした。まず、培養上清及び0.01mlのProtein Gセファロース(Pharmacia)を混合して上清中の免疫グロブリンをProtein Gセファロースに吸着せしめた。他方、 ^{35}S -メチオニンにより内部標識された 10^{11} 個のU266細胞を溶解し、そしてMT18結合セファロース4Bを用いてIL-6Rをアフィニティ精製した。

【0209】

次に、 ^{35}S -メチオニンで標識されたIL-6Rを、免疫グロブリンが結合している上記のProtein Gセファロースにより免疫沈降せしめ、そして沈澱をSDS-PAGEにより分析した。その結果、IL-6Rに特異的に結合する抗体を生産する1個のハイブリドーマクローンを単離し、そしてPM1と命名した。ハイブリドーマPM1は工業技術院微生物工業技術研究所にブダペスト条約のもとに1990年7月10日に、微工研条寄第2998号(FERM BP-2998)として寄託された。

【0210】

参考例3. ハイブリドーマAUK12-20, AUK64-7及びAUK146-15の作製

10

20

30

40

50

免疫原として可溶性 I L - 6 R (S R 3 4 4) を、 Y a s u k a w a , K . らの、 J . B i o c h e m . 1 0 8 , 6 7 3 - 6 7 6 , 1 9 9 0、に記載されている方法に従って調製した。

すなわち、N - 末端から 3 4 5 番目のコドンが終止コドンにより置換されている I L - 6 R をコードする c D N A を含有するプラスミド p E C E d h f r 3 4 4 を C H O (5 E 2 7) 細胞にトランスフェクトし、そのトランスフェクトされた細胞を無血清培地 (S F - 0 培地、三光純薬) 中で培養し、そして得られる上清を H F - L a b 1 系 (東ソー) により濃縮しそして B l u e - 5 P W カラム及び P h e n y l - 5 P W カラムにより精製した。精製された可溶性 I L - 6 R は S D S - P A G E で単一バンドを示した。

【 0 2 1 1 】

雌性 B A L B / c A n N C r j マウス (日本クレア) に、1 回の免疫原量を 1 0 μ g / マウスとして F r e u n d の完全アジュバント (B a c t o A d j u v a n t C o m p l e t e H 3 7 R a , D i f c o) と共に皮下注射し、そしてそれぞれ最初の注射の 2 週間及び 3 週間後に、F r e u n d の不完全アジュバント (B a c t o A d j u v a n t I n c o m p l e t e F r e u n d , D i f c o) と共に同量の免疫原を第二回及び第三回追加免疫として皮下注射した。最終免疫感作 (第四回注射) は第三回注射の 1 週間後に、アジュバントを使わないで尾静脈内に行った。

【 0 2 1 2 】

免疫感作されたマウスから血清試料を採取し、希釈緩衝液により段階的に希釈し、そして G o l d s m i t h , P . K . , A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y , 1 1 7 , 5 3 - 6 0 , 1 9 8 1、に記載されている方法に従って E L I S A 法により分析した。すなわち、S R 3 4 4 (0 . 1 μ g / m l) によりコートされたプレートを 1 % B S A によりブロックし、そして前記の希釈された試料をそれに加えた。S R 3 4 4 に結合したマウス I g G をヤギの抗 - マウス I g G / アルカリホスファターゼ (A / P) (Z Y M E D) 及びアルカリホスファターゼ用基質 (S i g m a - 1 0 4) を用いて測定した。

【 0 2 1 3 】

血清中の抗 - S R 3 4 4 抗体の増加を確認した後、最終免疫感作から 3 日後に、5 匹の B A L B / c マウスから脾臓細胞を得た。脾臓細胞及び骨髓細胞株 (P 3 U 1) を 2 5 : 1 の比率で混合し、P E G 1 5 0 0 を用いて融合し、そして 2 0 0 0 個のウエル中で 0 . 7 ~ 1 . 1 × 1 0 ⁶ 細胞 / ウエルの細胞濃度で培養した。ウエルからの上清を、S R 3 4 4 に結合するそれらの能力について (R 3 4 4 認識アッセイと称する第一次スクリーニング)、及び S R 3 4 4 と I L - 6 R との結合を阻害するそれらの能力について (1 L - 6 / s 1 L 6 R 結合阻害アッセイ (R B I A) による) スクリーニングした。第一次スクリーニングが 2 4 0 個の陽性ウエルをもたらし、そして第二次スクリーニングが 3 6 個の陽性ウエルをもたらした。

【 0 2 1 4 】

上記の S R 3 4 4 認識アッセイは次の様にして行った。ヤギの抗マウス I g (C a p p e l) (1 μ g / m l) によりコートされたプレート (M a x i S o r p , N u n c) を 1 % B S A によりブロックし、そして 1 0 0 μ l / ウエルのハイブリドーマ培養上清をそれに添加し、次に室温にて 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄した後、2 0 n g / m l の S R 3 4 4 をウエルに加え、そして室温にて 1 時間インキュベーションを行った。上清に由来する固定化された抗体により捕捉された S R 3 4 4 の量を、ラビット抗 S R 3 4 4 I g G (# 2 , 5 μ g / m l)、ヤギの抗ラビット I g G - アルカリホスファターゼ (A / P) (1 : 3 0 0 0 , T a g o) 及び基質 (1 m g / m l , S i g m a - 1 0 4) の添加、並びにそれに続く 4 0 5 - 6 0 0 n m での吸光度の測定により定量した。

【 0 2 1 5 】

前記の R B I A は次の様にして行った。M T 1 8 抗体でコートしたプレートを 1 0 0 n g / m l の S R 3 4 4 (1 0 0 μ l / ウエル) で満たし、そして室温にて 1 時間インキュベーションを行った。プレートを洗浄した後、5 0 μ l / ウエルのハイブリドーマ培養上清及び 5 0 μ l / ウエルのビオチン - I L - 6 結合体 (2 0 n g / m l) をそれぞれのウエルに

10

20

30

40

50

同時に加え、そしてウエルを室温にて1時間インキュベートした。ストレプトアビジン - A / P (1 : 7 0 0 0 , P I E R C E) 及び対応する基質 (S i g m a - 1 0 4) を添加し、405 - 600 nmでの吸光度を測定することにより、SR344に結合したビオチン - IL - 6の量を測定した。

【0216】

最後に、限界希釈法を2回反復することにより陽性クローンを純化し、そしてSR344とIL - 6との結合を阻害する3個のハイブリドーマクローン、すなわちAUK12 - 20 , AUK146 - 15及びAUK64 - 7 ; 並びにSR344とIL - 6との結合を阻害しないハイブリドーマクローンAUK181 - 6を得た。

【0217】

本発明はヒトIL - 6Rに対する再構成ヒト抗体を提供し、この抗体においてはヒト抗体のV領域のCDRがヒトIL - 6Rに対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている。この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてCDRは抗原性が低いから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に療法用として期待される。

【0218】

【表 1 2】

表 12

ブタペスト条約規則第 1 3 規則の 2 の寄託された微生物への言及

寄託機関：National Collections of Industrial and Marine
Bacteria Limited

あて名：23St Macher Drive, Aberdeen AB2 1RY, UNITED
KINGDOM

10

微生物の表示	寄託番号	寄託日
<u>E. coli</u> DH5 α pPM-h1	NCIMB 40362	1991年 2 月 12日
<u>E. coli</u> DH5 α p12-h2	NCIMB 40363	1991年 2 月 12日
<u>E. coli</u> DH5 α p64-h2	NCIMB 40364	1991年 2 月 12日
<u>E. coli</u> DH5 α p146-h1	NCIMB 40365	1991年 2 月 12日
<u>E. coli</u> DH5 α pPM-k3	NCIMB 40366	1991年 2 月 12日
<u>E. coli</u> DH5 α p12-k2	NCIMB 40367	1991年 2 月 12日
<u>E. coli</u> DH5 α p64-k4	NCIMB 40368	1991年 2 月 12日
<u>E. coli</u> DH5 α p146-k3	NCIMB 40369	1991年 2 月 12日

20

寄託機関：通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

30

あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号

微生物の表示	寄託番号	寄託日
MT18	FERM BP-2999	1990年 7 月 10日
PM 1	FERM BP-2998	1990年 7 月 10日

【図面の簡単な説明】

40

【0219】

【図 1】図 1 は、本発明の抗体ペプチドの発現のために有用な、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）プロモーター/エンハンサー系を含んで成る発現ベクターを示す。

【図 2】図 2 は、ヒト IL - 6 R に結合する本発明のキメラ抗体 AUK 12 - 20 の能力の確認のための ELISA の結果を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、ヒト IL - 6 R へのヒト IL - 6 の結合を阻害する本発明のキメラ抗体 AUK 12 - 20 の能力の確認のための ELISA の結果を示すグラフである。

【図 4】図 4 は、ヒト IL - 6 R への本発明のキメラ抗体 PM 1 a 及び PM 1 b の結合についての ELISA の結果を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、ヒト IL - 6 R へのヒト IL - 6 の結合を阻害する本発明のキメラ抗体

50

P M 1 a 及び P M 1 b の能力を試験する E L I S A の結果を示すグラフである。

【図 6】図 6 は、再構成ヒト P M - 1 抗体 H 鎖 V 領域の第一バージョン（バージョン「a」）の作製のダイアグラムである。

【図 7】図 7 は、再構成ヒト P M - 1 抗体 L 鎖 V 領域の第一バージョン（バージョン「a」）の作製のダイアグラムである。

【図 8】図 8 は、H 鎖の発現のために有用な、ヒト・エロンゲーション・ファクター 1（H E F - 1）プロモーター/エンハンサーを含んで成る発現プラスミド H E F - 1 2 h - g 1 の作製の過程を示す。

【図 9】図 9 は、L 鎖の発現のために有用な、H E F - 1 プロモーター/エンハンサー系を含んで成る発現プラスミド H E F - 1 2 k - g k の作製の過程を示す。

【図 10】図 10 は、H 鎖の発現のために有用な、増幅のための欠陥 S V 4 0 プロモーター/エンハンサー配列に連結されたジヒドロフォレートレダクターゼ（d h f r）及び H C M V プロモーター/エンハンサーを含んで成る発現プラスミド D H F R - P M h - g 1 の作製の過程を示す。

【図 11】図 11 は、H 鎖の発現のために有用な、増幅のための欠陥 S V 4 0 - プロモーター/エンハンサー配列に連結された d h f r 遺伝子及び E F 1 プロモーター/エンハンサーを含んで成る発現プラスミド D H F R - E - R V h - P M 1 - f の作製の過程を示す。

【図 12】図 12 は、ヒト I L - 6 R への結合についての再構成ヒト P M - 1 抗体 L 鎖 V 領域のバージョン「a」及び「b」の能力を示すグラフである。

【図 13】図 13 は、ヒト I L - 6 R への結合についての再構成ヒト P M - 1 抗体 H 鎖 V 領域のバージョン「f」+再構成ヒト P M - 1 抗体 L 鎖 V 領域バージョン「a」の能力を示すグラフである。

【図 14】図 14 は、ヒト I L - 6 R への I L - 6 の結合を阻害する再構成ヒト P M - 1 抗体 H 鎖 V 領域のバージョン「f」+再構成ヒト P M - 1 抗体 L 鎖 V 領域バージョン「a」の能力を示すグラフである。

【図 15】図 15 は、それぞれ L 鎖及び H 鎖の発現のために有用な、ヒト E F I - プロモーター/エンハンサーを含んで成る発現プラスミド H E F - V_L - g k 及び H E F - V_H - g 1 を示す。

【図 16】図 16 は、再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 L 鎖 V 領域バージョン「a」をコードする D N A の作製の過程を示す。

【図 17】図 17 は、ヒト I L - 6 R に結合する再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 L 鎖 V 領域の能力の確認のための E L I S A の結果を示すグラフである。図中、標準 A U K 1 2 - 2 0（キメラ）はキメラ A U K 1 2 - 2 0 抗体を C H O 細胞により大量に製造して精製したものである。

【図 18】図 18 は、ヒト I L - 6 R に結合する再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体（L 鎖バージョン「a」+H 鎖バージョン「b」）の能力についての E L I S A の結果を示すグラフである。

【図 19】図 19 は、ヒト I L - 6 R に結合する再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体（L 鎖バージョン「a」+H 鎖バージョン「d」）の能力についての E L I S A の結果を示すグラフである。

【図 20】図 20 は、再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体 H 鎖 V 領域の化学合成の過程を示す。

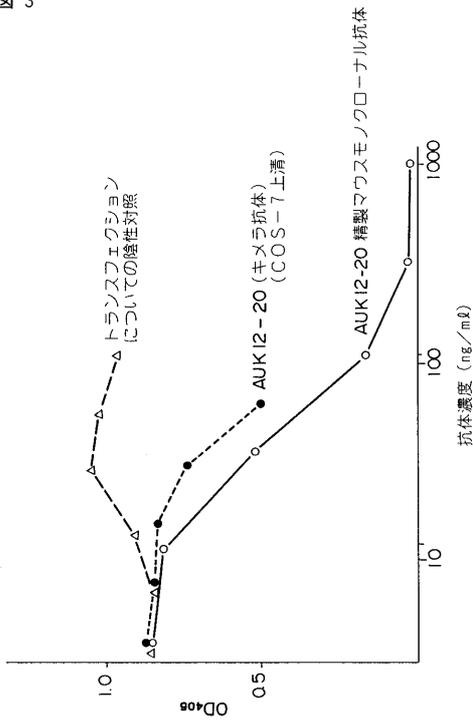
【図 21】図 21 は、ヒト I L - 6 R への I L - 6 の結合を阻害する再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体（L 鎖バージョン「a」+H 鎖バージョン「a」）の能力についての E L I S A の結果を示すグラフである。

【図 22】図 22 は、ヒト I L - 6 R への I L - 6 の結合を阻害する再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体（L 鎖バージョン「a」+H 鎖バージョン「b」）の能力についての E L I S A の結果を示すグラフである。

【図 23】図 23 は、ヒト I L - 6 R への I L - 6 の結合を阻害する再構成ヒト A U K 1 2 - 2 0 抗体（L 鎖バージョン「a」+H 鎖バージョン「c」）の能力についての E L I S A の結果を示すグラフである。

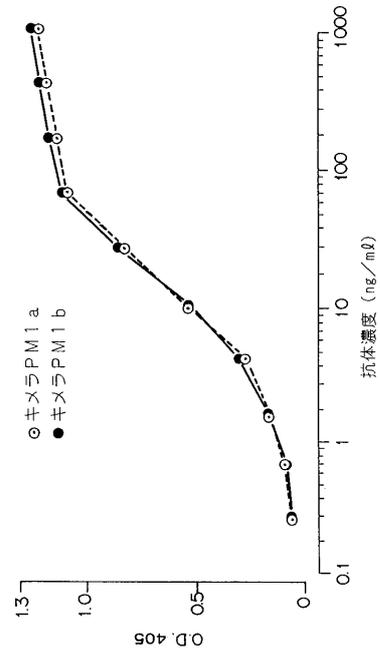
【 図 3 】

図 3



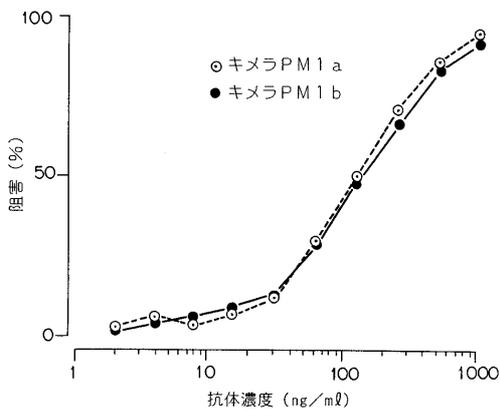
【 図 4 】

図 4



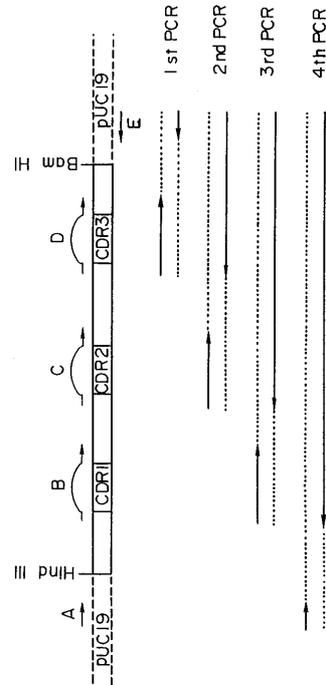
【 図 5 】

図 5

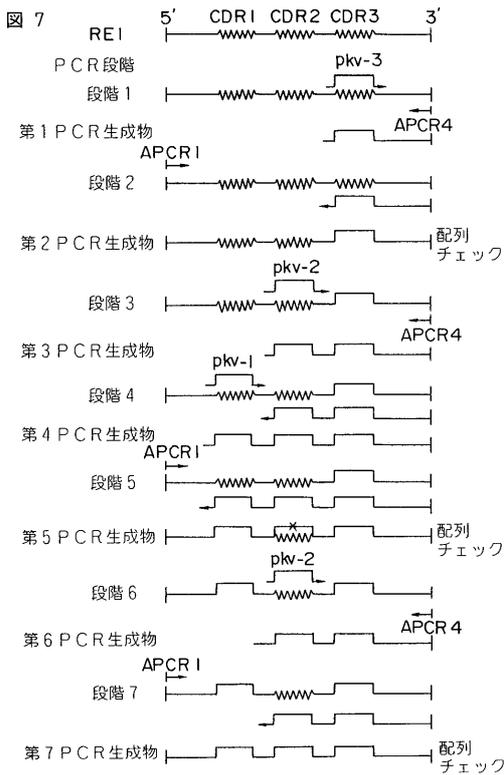


【 図 6 】

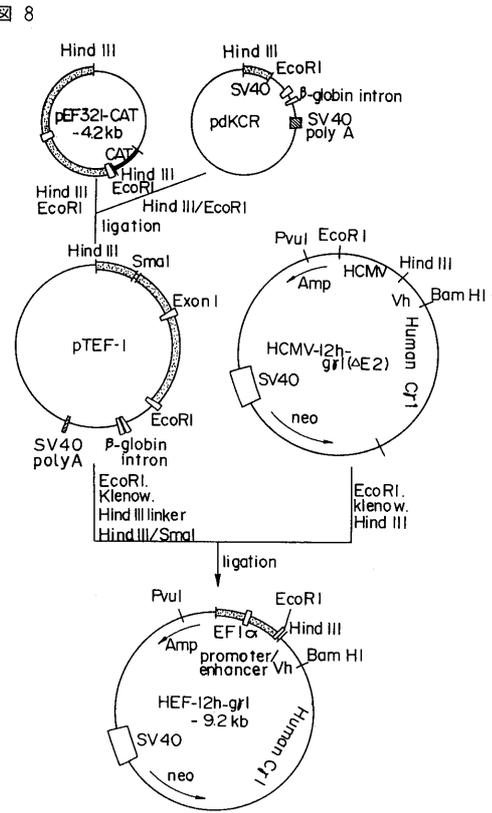
図 6



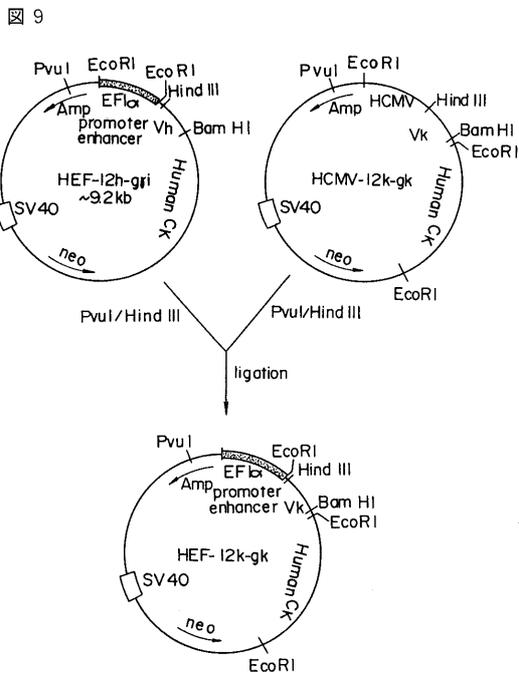
【 図 7 】



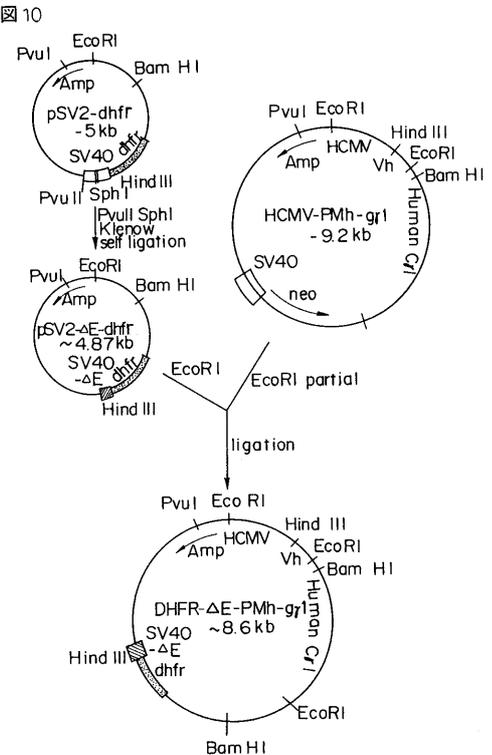
【 図 8 】



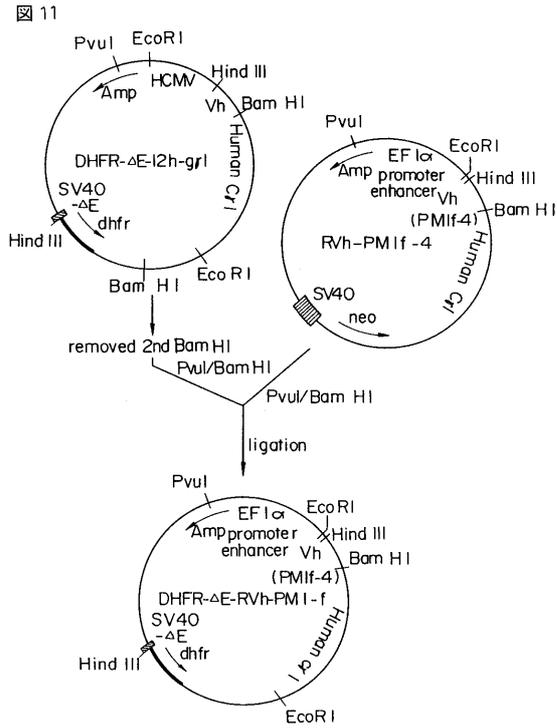
【 図 9 】



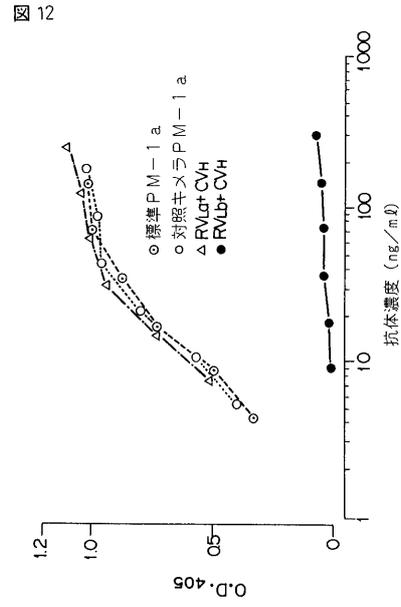
【 図 10 】



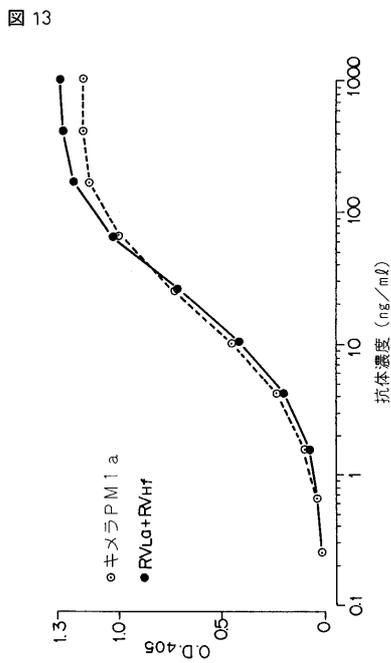
【 図 1 1 】



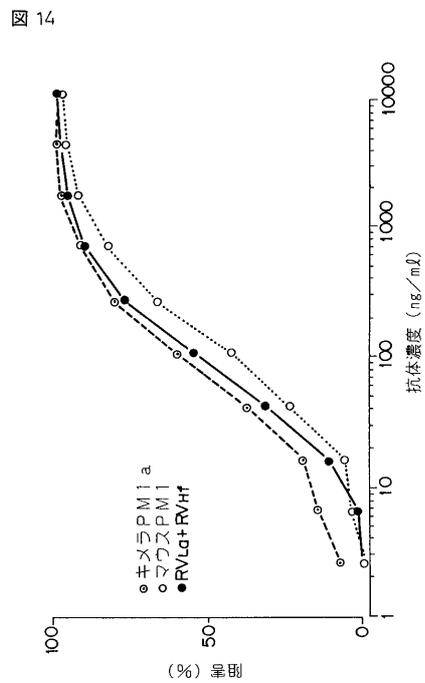
【 図 1 2 】



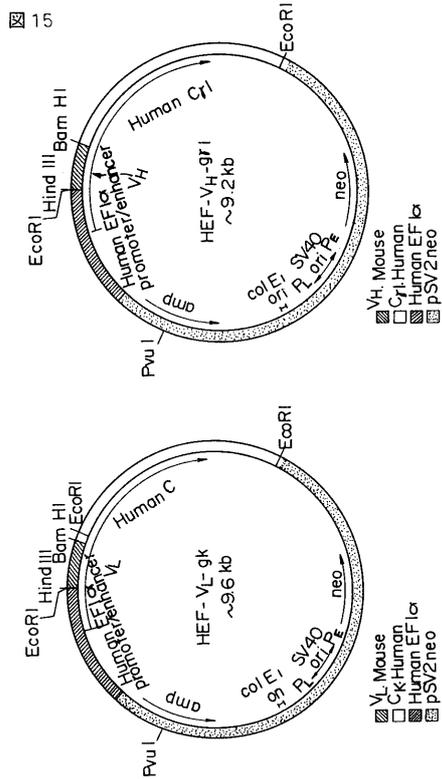
【 図 1 3 】



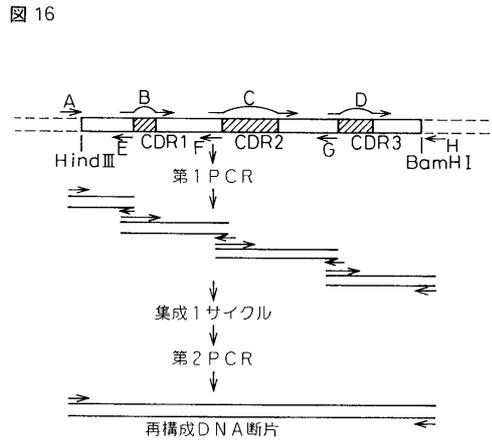
【 図 1 4 】



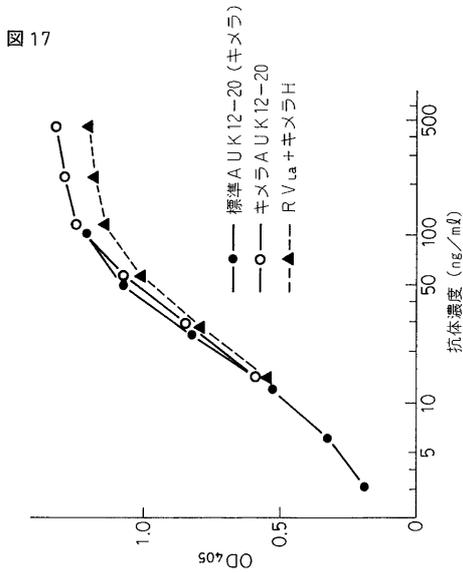
【 図 15 】



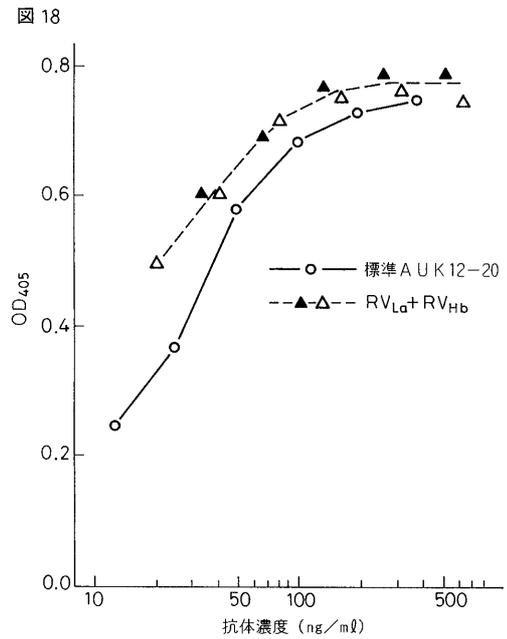
【 図 16 】



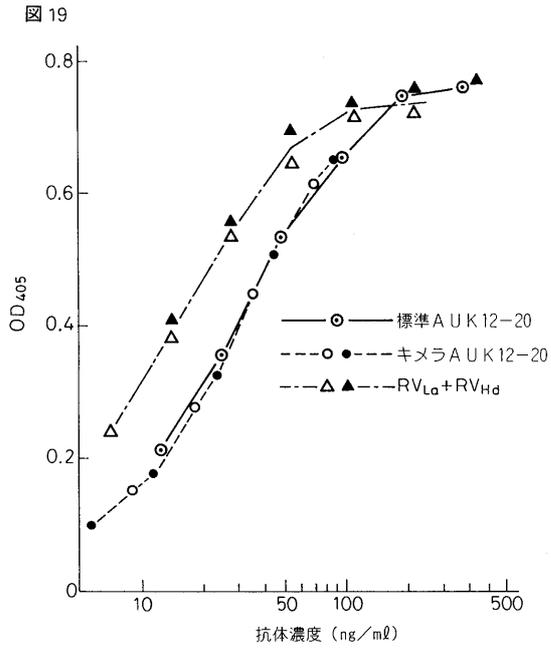
【 図 17 】



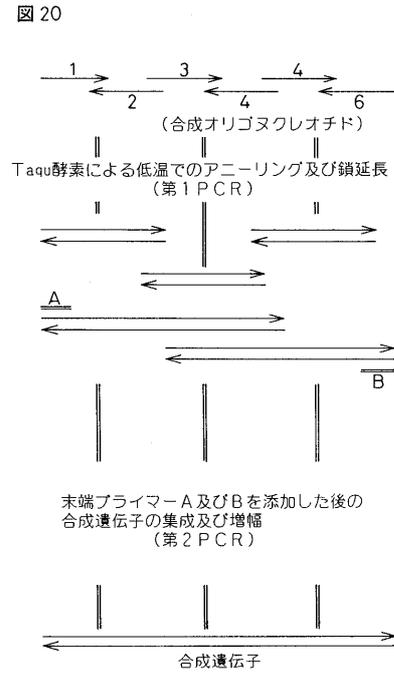
【 図 18 】



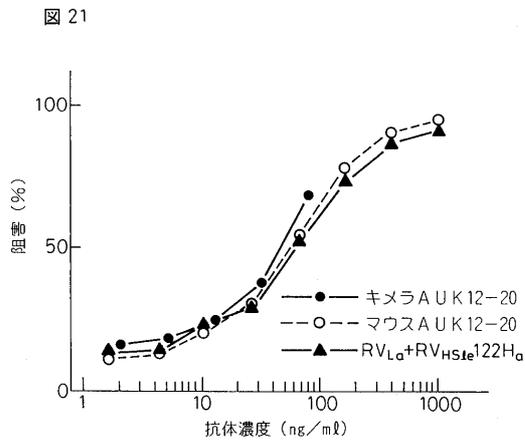
【 図 1 9 】



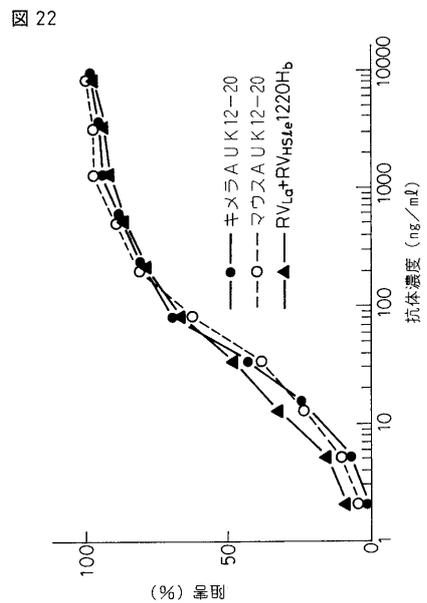
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】

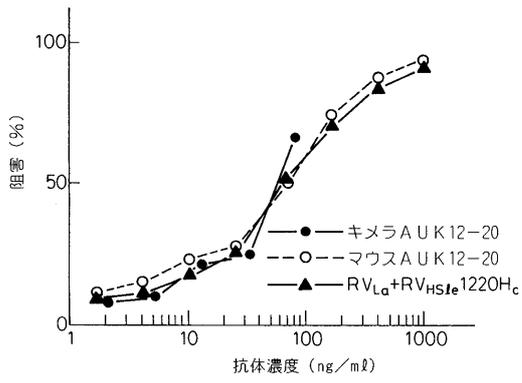


【 図 2 2 】



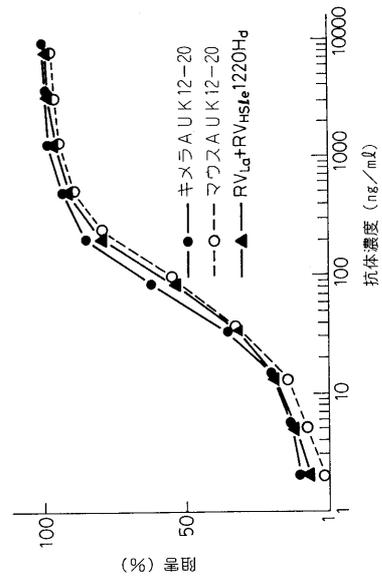
【 図 2 3 】

図 23



【 図 2 4 】

図 24



【 配 列 表 】

2004045433000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// C 0 7 K 16/24	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/24	Z N A
C 1 2 N 15/09	C 0 7 K 19/00	

(72)発明者 土屋 政幸

静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

(72)発明者 佐藤 功

静岡県御殿場市駒門1-135 中外製薬株式会社内

(72)発明者 ベンディッグ,メアリー マーガレット

イギリス国, ロンドン エヌダブリュ6 1ティーエックス, ウェスト ハンプステッド, ソレント ロード 64

(72)発明者 ジョーンズ, スティーブン タレン

イギリス国, ハートフォードシャイヤー ダブリュディー7 8エイチエー, ラッドレッド, ザ クローズ 10

(72)発明者 サルダナ, ホセ ウィリアム

イギリス国, ミドルセックス イーエヌ1 1ティーイー, エンフィールド, リンカーン ウェイ 22

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA26 BA43 CA07 HA20

4C084 AA01 AA02 BA44 CA18 CA23 DA18 NA06 ZB261

4C085 AA16 AA26 AA37 CC03 CC05 DD62 EE03

4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA02 DA76 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	针对人白细胞介素-6受体的嵌合抗体		
公开(公告)号	JP2004045433A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2003347675	申请日	2003-10-06
申请(专利权)人(译)	中外制药有限公司		
[标]发明人	土屋政幸 佐藤功 ペンディングメアリーマーガレット ジョーンズスティーブンタレン サルダナホセウィリアム		
发明人	土屋 政幸 佐藤 功 ペンディング,メアリー マーガレット ジョーンズ,スティーブン タレン サルダナ,ホセ ウィリアム		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/18 C07K16/24 C07K16/26 C07K16/28 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/13 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/2866 A61K38/00 C07K2317/24 C07K2319/00		
FI分类号	G01N33/53.P A61K39/395.T A61P35/00 G01N33/577.B A61K37/02 C12N15/00.A C07K16/24.ZNA C07K19/00 A61K38/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA26 4B024/BA43 4B024/CA07 4B024/HA20 4C084/AA01 4C084 /AA02 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/CA23 4C084/DA18 4C084/NA06 4C084/ZB261 4C085/AA16 4C085/AA26 4C085/AA37 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/DD62 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	1991095476 1991-04-25 JP 1992032084 1992-02-19 JP		
其他公开文献	JP3616087B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种针对人白介素6受体的新型重塑人抗体。用于人IL-6R的人抗体L链C区和小鼠单克隆抗体L链V区，以及人抗体H链C区和人IL-6R小鼠单克隆抗体H链V区 嵌合抗体。对人类给药时免疫原性低。
[选择图]无

表 8

プラスミド	配列番号：	受託番号
p 1 2 - k 2	2 4	N C I M B 4 0 3 6 7
p 1 2 - h 2	2 5	N C I M B 4 0 3 6 3
p P M - k 3	2 6	N C I M B 4 0 3 6 6
p P M - h 1	2 7	N C I M B 4 0 3 6 2
p 6 4 - k 4	2 8	N C I M B 4 0 3 6 8
p 6 4 - h 2	2 9	N C I M B 4 0 3 6 4
p 1 4 6 - k 3	3 0	N C I M B 4 0 3 6 9
p 1 4 6 - h 1	3 1	N C I M B 4 0 3 6 5

