

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3614183号

(P3614183)

(45) 発行日 平成17年1月26日(2005.1.26)

(24) 登録日 平成16年11月12日(2004.11.12)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

C 1 2 N 15/00  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 P 21/08  
 // A 6 1 K 39/395  
 (C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/00 Z N A  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 P 21/08  
 A 6 1 K 39/395 U  
 A 6 1 K 39/395 A B A D

請求項の数 21 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-115367  
 (22) 出願日 平成6年5月27日(1994.5.27)  
 (65) 公開番号 特開平7-46998  
 (43) 公開日 平成7年2月21日(1995.2.21)  
 審査請求日 平成11年7月21日(1999.7.21)  
 (31) 優先権主張番号 特願平5-129787  
 (32) 優先日 平成5年5月31日(1993.5.31)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM BP-4267  
 微生物の受託番号 FERM BP-4268  
 微生物の受託番号 FERM BP-4269  
 微生物の受託番号 FERM BP-4270

(73) 特許権者 000003311  
 中外製薬株式会社  
 東京都北区浮間5丁目5番1号  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100088269  
 弁理士 戸田 利雄  
 (74) 代理人 100082898  
 弁理士 西山 雅也  
 (72) 発明者 土屋 政幸  
 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中  
 外製薬株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトインターロイキン-6に対する再構成ヒト抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 次のアミノ酸配列(1):

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr  
 Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His  
 Phe Trp Gly Thr Pro Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 Lys

から成る軽(L)鎖可変(V)領域、及び

(b) ヒトL鎖定常(C)領域、

から成る、ヒトインターロイキン-6に対する再構成ヒト抗体L鎖。

【請求項2】

(a) 次のアミノ酸配列(2):

10

20

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Arg Pro Thr  
 Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser  
 Thr Ser Gly Met Thr Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr  
 Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Gly Arg Leu Ala Val Ser Lys Asp Thr  
 Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Ser Met Asn Thr Val Gly Pro Gly  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Asp Tyr Asp Glu  
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

10

から成る重（H）鎖V領域、及び

（b）ヒトH鎖C領域、

から成るヒトインターロイキン - 6 に対する再構成ヒト抗体H鎖。

【請求項3】

（a）次のアミノ酸配列（3）：

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Arg Pro Thr  
 Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn  
 Thr Ser Gly Met Thr Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr  
 Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Gly Arg Leu Ala Val Ser Lys Asp Thr  
 Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Ser Met Asn Thr Val Gly Pro Gly  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Asp Tyr Asp Glu  
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

20

から成るH鎖V領域、及び

（b）ヒトH鎖C領域、

から成るヒトインターロイキン - 6 に対する再構成ヒト抗体H鎖。

【請求項4】

（1）（a）次のアミノ酸配列（1）：

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr  
 Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His  
 Phe Trp Gly Thr Pro Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 Lys

40

から成る軽（L）鎖可変（V）領域、及び

（b）ヒトL鎖定常（C）領域、

から成るL鎖；並びに

（2）（a）次のアミノ酸配列（2）：

50

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Arg Pro Thr  
 Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser  
 Thr Ser Gly Met Thr Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr  
 Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Gly Arg Leu Ala Val Ser Lys Asp Thr  
 Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Ser Met Asn Thr Val Gly Pro Gly  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Asp Tyr Asp Glu  
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

10

から成る重（H）鎖V領域、及び

（b）ヒトH鎖C領域、

から成るH鎖；

から成る、ヒトインターロイキン - 6 に対する再構成ヒト抗体。

【請求項5】

（1）（a） 次のアミノ酸配列（1）：

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr  
 Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His  
 Phe Trp Gly Thr Pro Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 Lys

20

30

から成る軽（L）鎖可変（V）領域、及び

（b）ヒトL鎖定常（C）領域、

から成るL鎖；並びに

（2）（a） 次のアミノ酸配列（3）：

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Arg Pro Thr  
 Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn  
 Thr Ser Gly Met Thr Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu  
 Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr  
 Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Gly Arg Leu Ala Val Ser Lys Asp Thr  
 Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Ser Met Asn Thr Val Gly Pro Gly  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Asp Tyr Asp Glu  
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

40

から成る重（H）鎖V領域、及び

（b）ヒトH鎖C領域、

から成るH鎖；

から成る、ヒトインターロイキン - 6 に対する再構成ヒト抗体。

50

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載の再構成ヒト抗体 L 鎖をコードする DNA。

## 【請求項 7】

請求項 2 に記載の再構成ヒト抗体 H 鎖をコードする DNA。

## 【請求項 8】

請求項 3 に記載の再構成ヒト抗体 H 鎖をコードする DNA。

## 【請求項 9】

請求項 6 に記載の L 鎖をコードする DNA を含んで成る組換えベクター。

## 【請求項 10】

請求項 7 に記載の H 鎖をコードする DNA を含んで成る組換えベクター。

10

## 【請求項 11】

請求項 8 に記載の H 鎖をコードする DNA を含んで成る組換えベクター。

## 【請求項 12】

請求項 6 に記載の L 鎖をコードする DNA 及び請求項 7 に記載の H 鎖をコードする DNA を含んで成る組換えベクター。

## 【請求項 13】

請求項 6 に記載の L 鎖をコードする DNA 及び請求項 8 に記載の H 鎖をコードする DNA を含んで成る組換えベクター。

## 【請求項 14】

請求項 9 に記載の組換えベクター及び請求項 10 に記載の組換えベクターにより同時形質転換された形質転換体。

20

## 【請求項 15】

請求項 9 に記載の組換えベクター及び請求項 11 に記載の組換えベクターにより同時形質転換された形質転換体。

## 【請求項 16】

請求項 12 に記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換体。

## 【請求項 17】

請求項 13 に記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換体。

## 【請求項 18】

請求項 4 に記載の再構成ヒト抗体の製造方法において、請求項 14 に記載の形質転換体を培養し、そして培養物から当該再構成ヒト抗体を採取することを含んで成る方法。

30

## 【請求項 19】

請求項 5 に記載の再構成ヒト抗体の製造方法において、請求項 15 に記載の形質転換体を培養し、そして培養物から当該再構成ヒト抗体を採取することを含んで成る方法。

## 【請求項 20】

請求項 4 に記載の再構成ヒト抗体の製造方法において、請求項 16 に記載の形質転換体を培養し、そして培養物から当該再構成ヒト抗体を採取することを含んで成る方法。

## 【請求項 21】

請求項 5 に記載の再構成ヒト抗体の製造方法において、請求項 17 に記載の形質転換体を培養し、そして培養物から当該再構成ヒト抗体を採取することを含んで成る方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【産業上の利用分野】

本発明は、ヒトインターロイキン - 6 (IL - 6) に対するマウスモノクローナル抗体 SK 2 の可変領域 (V 領域) とヒト抗体の定常領域 (C 領域) とから成るヒト/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 - 6 に対するマウスモノクローナル抗体 SK 2 の CDR により置き換えられている再構成 (reshaped) ヒト抗体およびそれらの抗体を構成する L 鎖または H 鎖に関する。

## 【0002】

50

本発明はさらに、上記の抗体特にそのV領域をコードする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-6に対するキメラ抗体の製造方法、及びヒトIL-6に対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

【0003】

【従来の技術】

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 (Kishimotoら、Blood, 74, 1-10, 1989)。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。

10

【0004】

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; Clein, B.ら、Eur. Cytokine Net. 1, 193-201, 1990)。従って、IL-6の機能を阻害する抗体はヒト患者における治療剤として有用であることが期待される。

【0005】

現に、形質細胞腫を有する末期患者を治療するためにヒトIL-6に対するマウスモノクローナル抗体を用いた臨床研究において、形質細胞腫細胞の増殖のブロック、並びに循環M蛋白質、血清カルシウム、血清IgG及びC-反応性蛋白質の低下が示された (Klein, B.ら、Blood, 78, 1198-1204, 1991; Klein, B.ら、Res. Immunol., 143, 774-776, 1992)。

20

【0006】

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。さらに、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。

30

【0007】

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。

【0008】

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, 86, 4220-4224, 1989)。

40

【0009】

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)をヒト抗体可変領域に移植して「再構成」(reshaped)ヒト抗体可変領域を作製する。

【0010】

50

次に、これらの再構成ヒト可変領域をヒト抗体定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト型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。

【0011】

再構成ヒト抗体についてはさらに、Riechmann, L.ら、Nature, 332, 323-327, 1988; Verhoeye, M.ら、Science, 239, 1534-1536, 1988; Kettleborough, C.A.ら、Protein Engng. 4, 773-783, 1991; Maeda, H.ら、Human Antibodies and Hybridoma, 2, 124-134, 1991; Gorman, S.D.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Tempest, P.R.ら、Bio/Technology, 9, 266-271, 1991; Co, M.S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869-2873, 1991; Carter, P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; Co. M.S.ら、J. Immunol. 148, 1149-1154, 1992; 及び Sato, K.ら、Cancer Res. 53, 1-6, 1993を参照のこと。

10

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

前記のごとく、再構成ヒト抗体は治療目的のために有用であると予想されるが、ヒトIL-6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、特定の抗原に対して十分に活性がある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(例えば、Sato, K.ら、Cancer Res. 53, 851-856(1993))。

20

【0013】

本発明者らはヒトIL-6に対するマウスモノクローナル抗体SK2が*in vivo*動物実験でIL-6の機能を強く阻害し、従って、IL-6関連疾患に対する治療剤として期待できることを見出した(Saito, H.ら、第21回日本免疫学会総会、学術集会記録、21, 116, 1991)。従って、本発明は、ヒトIL-6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。

30

【0014】

【課題を解決するための手段】

従って、本発明はヒトIL-6に対するマウスモノクローナル抗体SK2の再構成ヒト抗体に関する。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、マウスモノクローナル抗体SK2の再構成ヒト抗体並びにキメラ抗体の製造のための遺伝子工学的方法に関する。

【0015】

具体的には、本発明は、

(1) ヒト抗体L鎖C領域、及びヒトIL-6に対するマウスモノクローナル抗体SK2のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに

40

(2) ヒト抗体H鎖C領域、及びヒトIL-6に対するマウスモノクローナル抗体SK2のH鎖V領域を含んで成るH鎖；

を含んで成る、ヒトIL-6に対するキメラ抗体、さらには、

(1) ヒト抗体L鎖V領域のフレームワーク領域(FR)、及び

(2) ヒトIL-6に対するマウスモノクローナル抗体SK2のL鎖V領域のCDR、を含んで成る、再構成ヒトL鎖V領域；並びに

(1) ヒト抗体H鎖V領域のFR、及び

(2) ヒトIL-6に対するマウスモノクローナル抗体SK2のH鎖V領域のCDR、を含んで成る、再構成ヒトH鎖V領域から構成されるヒトIL-6に対するマウスモノク

50

ローナル抗体 S K 2 の再構成ヒト抗体に関する。

本発明はまた、前記種々の抗体を構成する L 鎖または H 鎖のポリペプチド、およびそれらをコードする DNA に関する。

さらに、本発明は、上記 DNA を含んで成る発現ベクターおよびそれら発現ベクターにより形質転換された宿主に関する。

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

【 0 0 1 6 】

【 具体的な説明 】

マウス抗体 V 領域をコードする DNA のクローニング

10

ヒト I L - 6 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、マウスモノクローナル抗体産生細胞から全 RNA を調製した後、既知の方法により一本鎖 c DNA に変換し、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 法を用いて、目的とする DNA を増幅することで得られる。この全 RNA の供給源として、ヒト I L - 6 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、S K 2 を挙げるができる。ハイブリドーマ S K 2 の作製方法を参考例 1 に後記する。

【 0 0 1 7 】

( 1 ) 全 RNA の採取

本発明において、全 RNA を採取するため、ハイブリドーマ細胞を破壊し、グアニジンチオシアネート処理後、塩化セシウム密度勾配遠心を行った ( Chirgwin ら、Biochemistry, 18, 5294, 1979 ) が、すでに他の蛋白質の遺伝子をクローニングする際に用いられた方法、例えばバナジウム複合体等のリボヌクレアーゼインヒビター存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行う ( Berger, S. L. ら Biochemistry, 18, 5143, 1979 ) 方法を用いることができる。

20

【 0 0 1 8 】

( 2 ) 一本鎖 c DNA の採取

上記の如くして得た全 RNA から一本鎖 DNA を得るには、全 RNA を鋳型にして、その 3' 末端にある poly A 鎖に相補的なオリゴ ( d T ) をプライマーとして逆転写酵素で処理して全 RNA に相補的な一本鎖 DNA ( c DNA ) を合成する ( Larrik, J. W. ら、Bio/Technology, 7, 934, 1989 ) ことができる。また、その時に、ランダムプライマーを用いてもよい。

30

【 0 0 1 9 】

( 3 ) ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 法によるマウス抗体 V 領域の増幅

次にポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 法を用いて前記 c DNA からマウス抗体 V 領域の特異的増幅を行う。マウス抗体 V 領域の増幅には、Jones, S. T. ら Bio/Technology, 9, 88-89, 1991 に記載されているプライマーを用いることができる。ハイブリドーマ S K 2 が産生するマウスモノクローナル抗体 S K 2 のクローニングに用いるプライマーを決定するにあたり、H 鎖および L 鎖のタイピングをして両鎖の型を決める必要がある。

40

【 0 0 2 0 】

マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (アマシャムインターナショナル plc 社製) を用いて、S K 2 抗体のタイピングを行った結果、S K 2 抗体は C 型 L 鎖および C 1 型の H 鎖を有することが明らかになった。S K 2 のタイピングについて参考例 2 に後記する。

次に、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 法を用いてマウスモノクローナル抗体のカッパ ( ) 型 L 鎖 V 領域を増幅するため、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。

50

## 【0021】

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：13～24に示す12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：25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。

## 【0022】

なお、本実施例では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を含有するものを使用している。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限り、他の制限酵素切断部位でもよい。

## 【0023】

次に、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断片を得るために、増幅生成物を制限酵素SalI及びXmaIで切断した後、低融点アガロースまたはカラム(PCR産物精製用キット(QIAGEN等)、DNA精製用キット(GENECLEANII等)など)により、分離・精製を行う。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。

## 【0024】

クローン化されたDNAの配列決定は任意の常法例えば、シークエネースバージョン2.0(ユナイテッドステイツバイオケミカルコーポレーション社製)を用い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及び2に具体的に記載する。

## 【0025】

相補性決定領域(CDR)

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鎖上の可変領域は共通性のある比較的保存された4個のフレームワークと3個の超可変又は相補性決定領域(CDR)により連結されている(Kabat, E. A.ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. Health and Human Services 1983)。

## 【0026】

前記4個のフレームワーク領域(FR)の多くの部分はβ-シート構造をとり、その結果3個のCDRはループを形成する。CDRはある場合にはβ-シート構造の一部を形成することもある。3個のCDRはFRによって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして対をなす領域の3個のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。

## 【0027】

これらのCDR領域は、得られた抗体のV領域のアミノ酸配列と既知抗体のV領域の既知アミノ酸配列とを照合することによって、Kabat, E. A.ら、「Sequence of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができ、実施例3において具体的に説明する。

## 【0028】

キメラ抗体の作製

ヒトIL-6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認する必要がある。この目的のため、キメラ抗体

10

20

30

40

50

を作製した。さらに実施例 1 に記載されるモノクローナル抗体 S K 2 のクローン化された D N A のヌクレオチド配列から推定されるマウス抗ヒト I L - 6 抗体のアミノ酸配列を既知のマウス及びヒトの抗体の V 領域と比較した。

【 0 0 2 9 】

モノクローナル抗体 S K 2 のマウス L 鎖及び H 鎖 V 領域をコードする D N A 断片がクローニングされれば、これらのマウス V 領域をヒト抗体定常領域をコードする D N A と連結して発現させることによってキメラ抗ヒト I L - 6 抗体が得られる。

キメラ抗体を作製するための基本的な方法は、クローン化された c D N A に存在する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抗体 C 領域をコードする配列に連結することを含んで成る。

10

【 0 0 3 0 】

前記ヒト抗体 C 領域は任意のヒト L 鎖 C 領域およびヒト H 鎖 C 領域であることができ、例えばヒト L 鎖 C あるいは H 鎖 C 1 や C 4 を各々挙げるができる。

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 D N A 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 D N A 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 - ビトロ又はイン - ビボで培養してキメラ抗体を製造する (例えば W O 9 1 - 1 6 9 2 8 ) 。

20

【 0 0 3 1 】

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 D N A 並びにマウス H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする D N A 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。

キメラ抗体の作製を実施例 4 に記載する。

【 0 0 3 2 】

マウス S K 2 型 L 鎖リーダー領域及び V 領域をコードする c D N A を P C R 法を用いてサブクローンし、ヒトゲノム L 鎖 C 鎖領域をコードする D N A を含有する発現ベクターに連結する。マウス S K 2 抗体の 1 型 H 鎖リーダー及び V 領域をコードする c D N A を、P C R 法を用いてサブクローン化し、ヒト - 1 C 領域をコードするゲノム D N A を含有する発現ベクターに連結する。

30

【 0 0 3 3 】

特に設計された P C R プライマーを用いて、マウス S K 2 の V 領域をコードする c D N A 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、それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つ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 (例えば、本発明では K o z a k 配列の導入により転写効率を上げるように工夫されている)。次に、これらのプライマーを用いて P C R により増幅して得たマウス S K 2 の V 領域を、所望のヒト C 領域をすでに含有する H E F 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 ( t r a n s i e n t ) 発現又は安定な発現のために適当である。

40

【 0 0 3 4 】

マウス S K 2 抗体中に存在する V 領域と同じ V 領域を有するキメラ S K 2 抗体の作製に加えて、キメラ S K 2 抗体の第二のバージョン ( N T S ) を作製した。キメラ S K 2 抗体 N T S においては、H 鎖 V 領域中の位置 3 0 のアミノ酸がアスパラギンからセリンに変えられている。

【 0 0 3 5 】

マウス H 鎖サブグループ I ( F i s c h m a n n , T . O . ら、J . B i o l . C h e m . 2 6 6 , 1 2 9 1 5 , 1 9 9 1 ) に属するマウス H 鎖 V 領域においては、位置 3 0 の最も典型的なアミノ酸はセリンである ( K a b a t , E . A . ら、U S D e p t H e a

50

lth and Human Services US Government Printing Offices, 1991)。

【0036】

マウスSK2抗体のH鎖V領域中の位置30に非典型的なアミノ酸であるアスパラギンを有することの重要性を評価するため、位置30を典型的なアミノ酸であるセリンに変えた。この変更は、PCR-変異誘発法(M. Kammanら、Nucleic Acids Res. 15, 5404, 1989)を用いてH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。キメラSK2抗体は、もとのSK2抗体と同様にH鎖V領域の位置30にグリコシル化部位を有するのに対して、変異型キメラSK2抗体NTSはグリコシル化部位を有しない。

10

【0037】

キメラSK2抗体はヒトIL-6に結合する活性を示した。キメラSK2抗体NTSも同様にヒトIL-6に結合する。従って正しいマウス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。また、SK2抗体H鎖V領域のグリコシル化は、SK2抗体の結合活性のためには必要でないことが示された。

【0038】

再構成ヒトの抗体の構築

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト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SK2抗体のL鎖及びH鎖のV領域を、Protein Data Bankを用いて構造が解明されているすべての既知抗体のV領域と比較した。その結果を表1にまとめる。

20

【0039】

【表1】

マウスSK2抗体V領域と種々のサブグループの  
ヒトV領域のコンセンサス配列との間の同一性(%)

A. L鎖V領域

	HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
SK2	60.3%	51.3%	56.0%	56.6%

30

B. H鎖V領域

	HSGI	HSGII	HSGIII
SK2	36.2%	59.2%	44.7%

40

【0040】

マウスSK2のL鎖V領域はヒトL鎖V領域のサブグループI(HSGI)のコンセンサス配列に最も類似しており、60.3%の相同性が存在する。マウスSK2のH鎖V領域はヒトH鎖V領域のサブグループII(HSGII)のコンセンサス配列に最も類似しており、59.2%の相同性が存在する。

【0041】

ヒト抗体中のV領域との比較から、再構成ヒトSK2抗体V領域の設計の基礎となるヒトV領域のFRを選択することが可能である。再構成ヒトSK2抗体L鎖V領域の設計のためにはサブグループI(HSGI)に属するヒトL鎖V領域を使用し、そして再構成ヒト

50

SK2抗体H鎖V領域の設計のためにはサブグループII(HSGII)に属するヒト抗体H鎖V領域を用いるのがよく、さらにサブグループ内で、できるだけ相同性の高いものを選ぶことが最善であろう(Kabat, E. A.ら、US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)。

#### 【0042】

##### 再構成ヒトSK2抗体V領域の設計

再構成ヒトSK2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SK2抗体L鎖V領域は、サブグループIに属するヒト型抗体L鎖V領域に最も類似していた(表1)。マウスSK2抗体のL鎖V領域は既知ヒト抗体L鎖V領域との比較において、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63%の類似性を示した。従って、再構成ヒトSK2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

#### 【0043】

再構成ヒトSK2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に基づくFR(Riechmann, L.ら、Nature 332, 323-327, 1988)(WO92-19759に記載の再構成ヒトPM-1のL鎖V領域のバージョン「a」)と同一であり、そしてマウスCDRはマウスSK2のL鎖V領域中のCDRと同一とした。第二のバージョン(バージョン「b」)はバージョン「a」と比べて、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。

20

#### 【0044】

すなわちバージョン「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るのに対し、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SK2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SK2抗体のL鎖V領域、REIのFR及び再構成SK2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。

#### 【0045】

##### 【表2】

	FR1		CDR1
	1	2	3
	1234567890	1234567890123	45678901234
VLSK2	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC		RASENIYSNLA
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		
RVLa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		RASENIYSNLA
RVLb	-----		-----

	FR2	CDR2
	4	5
	567890123456789	0123456
VLSK2	WYQQKQGKSPQLLVY	AATYLAD
REI	WYQQKPGKAPKLLIY	
RVLa	WYQQKPGKAPKLLIY	AATYLAD
RVLb	-----	-----

	FR3			CDR3
	6	7	8	9
	78901234567890	123456789012345678		901234567
VLSK2	GVPSRFGSGSGGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC			QHFWGTPP-
REI	GVPSRFGSGSGGTDFTFITISLQPEDIATYYC			
RVLa	GVPSRFGSGSGGTDFTFITISLQPEDIATYYC			QHFWGTPP-
RVLb	-----Y-----			

	RF4
	1
	0
	8901234567
VLSK2	FGSGTKLEIK
REI	FGQGTKVEIK
RVLa	FGQGTKVEIK
RVLb	-----

注：REIのFR中の5個の下線を付したアミノ酸はヒトREIのアミノ酸配列（Palmer, W.ら、Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem., 356, 167-191, 1975）とは異なるアミノ酸の位置を示す。

【0046】

マウスSK2抗体のH鎖V領域中のFRはサブグループIIに属するヒトH鎖V領域に最も類似している（表1）。マウスSK2抗体のH鎖V領域は既知のヒト抗体H鎖V領域との比較において、ヒトH鎖V領域のサブグループIIの1構成員であるヒトH鎖V領域DAW（Press, E.M.ら、Biochem. J. 117, 641, 1970）に非常に類似していた（60.8%）。さらには、CDRのサイズもマウスSK2抗体とヒト抗体DAWとの間で非常に類似していた。このため、ヒト抗体DAWのFRを、再構成ヒトSK2抗体のH鎖V領域の作製のための出発材料として用いた。

【0047】

再構成ヒトSK2抗体H鎖V領域の2種類のバージョンを設計した。バージョン「a」においてはFRはDAWのそれと同じであり、バージョン「b」においてはヒトFR1中の

10

20

30

40

50



；そして前記ヒトH鎖C領域は任意のヒトH鎖C領域であることができ、例えばヒト - 1 C 領域、ヒト - 4 C 領域等である。

【0051】

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-ピボ又はイン-ピトロで培養して再構成ヒト抗体を生産せしめる（例えば、WO91-16927）。

10

【0052】

あるいは、再構成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-ピボ又はイン-ピ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。

以上のようにして目的とするキメラ抗体あるいはヒト型化抗体をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生したキメラ抗体あるいはヒト型化抗体は、細胞内または細胞外から分離し均一にまで精製することができる。

【0053】

なお、本発明の目的蛋白質であるキメラ抗体あるいはヒト型化抗体の分離・精製を、プロテインAアガロースカラムを用いて行うことができる。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる分離・精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せれば、キメラ抗体あるいはヒト型化抗体は分離・精製することができる。

20

【0054】

ヒトIL-6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。

30

【0055】

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<sub>H</sub>-HC<sub>1</sub>, HCMV-V<sub>L</sub>-HC<sub>K</sub> 等であって、pSV2neoに由来するもの(図2を参照のこと)(WO92-19759)が含まれる。

【0056】

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺伝子発現のプロモーターとしてはレトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV40) などのウイルスプロモーターやヒト・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) などの哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えばSV40のプロモーターを使用する場合は、Mulliganらの方法(Nature 277 108 (1979))、また、HEF-1プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S.らの方法(Nucleic Acids Research, 18, 5322, 1990)に従えば容易に実施することができる。

40

【0057】

複製起原としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、牛パピローマウイルス(BPV)等の由来のものを用いることができ、さらに宿主細胞系中での遺伝子コピ

50

一増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、ホストトランスフェラーゼ A P H ( 3 ) I I あるいは I ( n e o ) 遺伝子、チミジンキナーゼ ( T K ) 遺伝子、大腸菌キサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ ( E c o g p t ) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 ( D H F R ) 遺伝子等を含むことができる。

【 0 0 5 8 】

【実施例】

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 I L - 6 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

10

ヒト I L - 6 に対するマウスモノクローナル抗体 S K 2 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。

【 0 0 5 9 】

1 . 全 RNA の調製

ハイブリドーマ S K 2 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、ハイブリドーマ S K 2 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 SW40 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。

20

【 0 0 6 0 】

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  $\mu$  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  $\mu$  l に溶解した。

【 0 0 6 1 】

2 . 一本鎖 cDNA の合成

30

J . W . Larrick ら、Bio / Technology, 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  $\mu$  g を 40 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>、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  $\mu$  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  $\mu$  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。

40

【 0 0 6 2 】

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 ( Techne 社 ) を用いて 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、マウスカップ型 L 鎖リーダー配列とハイブリダイズする配列番号 : 1 ~ 11 に示す MKV ( Mouse Kappa Variable ) プライマー ( S . T . Jones ら、Bio / Technology, 9, 88, 1991 )、及びマウス型 L 鎖 C 領域とハイブリダイズする配列番号 : 12 に示す MKC ( Mouse Kappa Constant ) プライマー ( S . T . Jones ら、Bio / T

50

technology, 9, 88, 1991) を用いた。

【0063】

PCR 溶液 100  $\mu$ l は、10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.25 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 ユニットの DNA ポリメラーゼ AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus 社)、0.25  $\mu$ M のそれぞれの MKV プライマー、2.75  $\mu$ M の MKC プライマー及び一本鎖 cDNA 合成の反応混合物 1  $\mu$ l を含有する。これを 50  $\mu$ l の鉱油で覆った後、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。

10

【0064】

(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 ~ 24 に示す MHV (Mouse Heavy Variable) プライマー 1 ~ 12、及び配列番号：25 に示す MHC-G1 (Mouse Heavy Constant) プライマー (S. T. Jones ら、Bio/Technology, 9, 88, 1991) を使用した。

【0065】

cDNA の増幅は、1  $\mu$ M の MHV プライマーと 1  $\mu$ M の MHC-G1 プライマーの組合せとして各々の MHV 1 ~ 12 プライマーについて別々に増幅した点を除いて、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

【0066】

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 断片を低融点アガロース (FMC Bio. Products, 米国) にて精製し、そして 10 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 150 mM NaCl を含有する 100 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中で 10 ユニットの制限酵素 SalI (GIBCO BRL 社製) を用いて 37 にて 3 時間消化した。

【0067】

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 社製) により 37 にて 2 時間消化し、そして生ずる DNA 断片を、1.5% 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

【0068】

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 (pH 7.5) 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 (pH 7.5) に溶解した。

【0069】

こうして、マウスカップ型 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

【0070】

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プ型 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  $\mu$ g 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  $\mu$ g と、50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオスレイトール、1 mM スペルミジン、

50

1 mM ATP, 0.1  $\mu$ g/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。

#### 【0071】

次に、7  $\mu$ l の上記連結混合物を大腸菌DH5 のコンピテント細胞200  $\mu$ l 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800  $\mu$ l 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、2 $\times$ YT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。

#### 【0072】

この形質転換体を、50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含有する2 $\times$ YT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。

#### 【0073】

こうして得られた、ハイブリドーマSK2に由来するマウスC $\mu$ 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psk2-k2と命名した。

上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマSK2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pUC-SK2-V<sub>H</sub>と命名した。

#### 【0074】

##### 実施例2. 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<sup>TM</sup> Version 2.0キット (U.S. Biochemical社製、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  $\mu$ gを0.2N 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<sup>35</sup>S-dATPより標識した。

#### 【0075】

次に、標識されたDNAを、8M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。

プラスミドpsk2-k2に含まれるマウスSK2抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号26に示す。また、プラスミドpUC-SK2-V<sub>H</sub>に含まれるマウスSK2抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号27に示す。

#### 【0076】

なお、前記プラスミドpUC-SK2-V<sub>H</sub>を含有する大腸菌はEscherichia coli DH5 (pUC-SK2V<sub>H</sub>)として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成5年4月21日に、FERM BP-4269としてブダペスト条約に基き国際寄託された。

#### 【0077】

##### 実施例3. 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

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabata, E. A. ら, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」 U S Dept. Health and Human Services, 1983)。

【0078】

このような事実に基づき、ヒトIL-6に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabataらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表4に示す如く決定した。

【表4】

プラスミド	配列番号	CDR (1)	CDR (2)	CDR (3)
psk2-k2	26	24-34	50-56	89-96
pUC-SK2V <sub>H</sub>	27	31-37	52-67	100-109

10

【0079】

実施例4. クローン化cDNAの発現の確認 (キメラSK2抗体の作製)

発現ベクターの作製

キメラSK2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SK2 L鎖及びH鎖V領域をコードするcDNAクローンpsk2-k2及びpUC-SK2-V<sub>H</sub>をPCR法により修飾した。そしてHEF発現ベクター (前記、WO92-19759参照) (図1を参照のこと) に導入した。

20

【0080】

L鎖V領域のための後方プライマーSK2K2B (配列番号: 28) 及びH鎖V領域のための後方プライマーSK2H1S (配列番号: 30) は、各々のV領域のリーダー配列の最初をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozakコンセンサス配列 (Kazak, M. ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) 及びHindIII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SK2K2A (配列番号: 29) 及びH鎖V領域のための前方プライマー64hch-A (配列番号: 31) は、J領域の末端をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つスプライスドナー配列及びBamHI制限部位を有するように設計した。

30

【0081】

10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 250µM dNTPs, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 100pmole ずつの各プライマー、100ngの鋳型DNA (psk2-k2又はpUC-SK2-V<sub>H</sub>)、及び5uのAmpliTaq酵素を含有する100µlのPCR反応混合物を50µlの鉱油で覆い、94にて最初の変性の後、94にて1分間、50にて1分間、72にて1分間のサイクルを30回行い、最後に72にて10分間インキュベートした。

【0082】

PCR生成物を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIで消化し、そしてpUC19ベクター (Yanishke-Perronら、Gene (1985) 33: 103-109) にサブクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有する鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをpUC-SK2V<sub>L</sub>と命名した。プラスミドpUC-SK2V<sub>L</sub>を含有する大腸菌はEscherichia coli DH5 (pUC-SK2V<sub>L</sub>)として工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成5年4月21日に、FERM BP-4270としてブタペスト条約に基き国際寄託された。正しいDNA配列を有するH鎖V領域およびL鎖V領域のHindIII-BamHI断片を切出し、H鎖V領域については発現ベクターHEF-V<sub>H</sub>-g1に導入してHEF-SK2h-g1を得、L鎖V領域についてはHEF-V<sub>L</sub>-gkに導入してHEF-SK2k-

40

50

g kを得た。

【0083】

さらに、H鎖V領域に於いて、ほとんどの抗体のH鎖は、位置30のセリンが保存されているが、マウスSK2抗体H鎖においては位置30がアスパラギンであることから、キメラSK2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、HEF-SK2h-g 1を鋳型として後方プライマーSK2H1Sと前方プライマーSK2HM1B（配列番号：32）及び前方プライマー64hch-Aと後方プライマー（SK2HM1）（配列番号：33）の組合せを用いてPCR変異誘導法により、位置30がアスパラギンからセリンに変わるように設計した。

【0084】

変異型H鎖V領域は、プライマーSK2H1SとSK2HM1B、又はプライマーSK2HM1と64hch-Aを用い、鋳型DNAとしてプラスミドHEF-SK2h-g 1を用い、前記と同様にしてPCRを行った。PCR増幅の後、2つのPCR生成物を低融点アガロースゲルを用いて精製し、第2のPCRのために用いた。

【0085】

1µgずつの2つの第一PCR生成物及び5uのAmpliTaqを含有する98µlのPCR混合物を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た後、100pmole ずつの外部プライマー（SK2H1S及び64hch-A）を加えた。PCR混合物を50µlの鉱油で覆い、そして前記と同じ条件で第二PCRを行った。412bpのDNA断片を精製し、HindIII及びBamHIで消化し、そして発現ベクターHEF-V<sub>H</sub>-g 1に挿入し、配列決定の後、正しい配列を含むプラスミドHEF-SK2h-NTSを得た。

【0086】

COS細胞へのトランスフェクション

キメラSK2抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターをCOS細胞において試験した。HEF-SK2k-g kと、HEF-SK2h-g 1又はHEF-SK2h-NTSのいずれかとを、GenePulser装置（BioRad社製）を用いて電圧ポレーションによりCOS細胞に同時形質転換した。各DNA（10µg）を、PBS中 $1 \times 10^7$ 細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、1,900V、25µFの容量にてパルスを与えた。

【0087】

室温にて10分間の回復期間の後、電圧ポレーション処理された細胞を、ツニカマイシン（Sigma社製）を2µg/ml含有するか、又は含有しない10%のγグロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液（GIBCO社製）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、5倍量の結合緩衝液で平衡化したプロテインAアガロースカラム（Affi-Gel Protein A MAPSIIキット、BioRad）に適用した。カラムを15倍量の結合緩衝液で洗浄し、次に5倍量の溶出緩衝液で溶出した。溶出液を濃縮し、そしてマイクロコンセンレーター（Centricon 100, Amicon社製）を用いて緩衝液をPBSに変えた。

【0088】

ELISA

抗原結合測定のためのELISAプレートを次の様にして調製した。96穴プレートを、SK2が認識するエピトープとは異なるヒトIL-6のエピトープを認識するマウスモノクローナル抗体MH166（Matsuda, T.ら、Eur. J. Immunol. 18, 951-956, 1988）でコートし、ブロッキングの後、組換えヒトIL-6を添加した。キメラSK2抗体のサンプルを順次希釈して、各穴に加え、次にアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-ヒトIgG抗体（Sigma社製）を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質溶液を加え、次に405nmでの吸光度を測定した。

【0089】

10

20

30

40

50

結合阻害測定のため、E L I S A プレートを次の様にして調製した。96穴プレートを、ヒト I L - 6 レセプター ( I L - 6 R ) に対して特異的なマウスモノクローナル抗体 M T - 1 8 ( H i r a t a , Y . ら、J . I m m u n o l . , 1 4 3 , 2 9 0 0 - 2 9 0 7 , 1 9 8 9 ) によりコートし、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 ) ( Y a s u k a w a , K . ら、J . B i o c h e m . 1 0 8 , 6 7 3 - 6 7 6 , 1 9 9 0 ) を加えた。サンプルを順次希釈して、ビオチン化 I L - 6 と共に各穴に加え、次いでアルカリホスファターゼ結合ストレプトアビディンを加えた後、前記のようにして、405nmにおける吸光度を測定した。

#### 【0090】

抗原結合測定の結果を図4に示し、結合阻害測定の結果を図5に示す。H鎖V領域の30位がアスパラギンである。キメラ抗体およびH鎖V領域の30位がセリンに変異しているキメラ抗体 ( N T S ) は、ツニカマイシンによる糖付加阻害の影響を受けることなく、同様の抗原結合性及び結合阻害活性を示した。従って、H鎖V領域の30位のアミノ酸の変異及び糖鎖の有無は抗原結合性に何ら影響を与えないことが明らかになった。

#### 【0091】

S D S / P A G E 及びウエスタンブロットを用いたマウス S K 2 抗体の糖鎖の分析

マウス S K 2 抗体から F a b 断片および F c 断片を I m m u n o P u r e F a b P r e p a r a t i o n k i t ( P i e r c e 社製 ) を用いて調製し、次に N - グリカナーゼ ( G e n z y m e 社製 ) を用いて脱グリコシル化された断片を調製した。

#### 【0092】

これらの断片を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、そして次にクマシーブリリアントブルー ( C o o m a s s i e B r i l l i a n t B l u e , B i o R a d 社製 ) により染色するか、又は電気泳動的にニトロセルロースフィルターに移行させた。F d 断片に付加されている糖を分析するため、フィルターをレクチンのパネル ( L e c t i n - L i n k , G e n z y m e 社製 ) にかけた。

#### 【0093】

図3に示すごとく、マウス S K 2 抗体からの F d 断片は S D S / P A G E において約 3 4 k d 及び 3 3 k d のバンドを示し、この比率は約 1 : 1 であった。N - グリカナーゼにより脱グリコシル化された F d 断片は約 2 9 k d の分子量を示し、これは F d 断片のアミノ酸組成から計算した値と一致した。また、34kdのF d断片と33kdのF d断片は種々のレクチンに対して異なる反応性を示した。

#### 【0094】

すなわち 3 4 k d の F d は D a t u r a S t r a m o n i u m A g g l u t i n i n ( D S A ) + 、 R i c i n u s C o m m u n i s A g g l u t i n i n ( R C A ) + + 、 P h a s e o l u s V u l g a r i s E r y t h r o l e c t i n ( P H A - E ) + + + 、 C o n c a n a v a l i n A ( C o n A ) - 、 W h e a t G e r m A g g l u t i n i n ( W G A ) - であるのに対して、33kdのF dはD S A - , R C A + , P H A - E + + + , C o n A - , W C A - であった。これらの結果、マウス S K 2 抗体は、H鎖V領域に少なくとも2つのタイプのN型糖鎖を有することが明らかになった。

#### 【0095】

実施例 5 . 再構成ヒト S K 2 抗体の作製

再構成ヒト S K 2 抗体 L 鎖 V 領域の作製

再構成ヒト S K 2 抗体 L 鎖を、P C R 法による C D R - グラフティングにより作製した。この方法を図6に模式的に示す。ヒト抗体 R E I 由来の F R を有する再構成ヒト抗体 S K 2 ( パージョン「 a 」 ) の作製のために 8 個の P C R プライマーを使用した。外部プライマー A ( 配列番号 : 3 4 ) 及び H ( 配列番号 : 3 5 ) は、p U C ベクターの D N A 配列とハイブリダイズするように設計された。

#### 【0096】

C D R - グラフティングプライマー B ( 配列番号 : 3 6 ) 、 C ( 配列番号 : 3 7 ) 及び D ( 配列番号 : 3 8 ) はセンス D N A 配列を有し、そして C D R - グラフティングプライマ

10

20

30

40

50

ーE (配列番号: 39)、F (配列番号: 40) 及びG (配列番号: 41) はアンチ-センスDNA配列を有しそしてそれぞれプライマーB, C及びDの5' - 末端のDNA配列に対する相補的DNA配列(15~35bp)を有する。

#### 【0097】

第一PCR段階において4つの反応A-E, B-F, C-G、及びD-Hを行い、そして各PCR生成物を精製した。第一PCRからの4つのPCR生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブリさせた(WO92-19759参照)。次に、外部プライマーA及びHを加えて、再構成ヒトSK2抗体L鎖V領域をコードする全長DNAを増幅した(第2PCR)。前記PCRにおいては、ヒト抗体REIからのFRに基く再構成ヒトPM-1抗体L鎖V領域バージョン「a」をコードするプラスミドpUC-RVL-PM1a-4 (WO92-19759)を鋳型として用いた。 10

#### 【0098】

第一PCR段階においては、10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 250µM dNTPs, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>、100ngの鋳型DNA、100pmoleの各プライマー及び5uのAmpli Taqを含有する100µlのPCR混合物を用いた。各PCRチューブは50µlの鉱油で覆膜した。最初に94℃で変性した後、94℃にて1分間、50℃又は55℃にて1分間及び72℃にて1分間の反応サイクルを行い、次に72℃にて10分間インキュベートした。

#### 【0099】

PCR生成物A-E (187bp), B-F (87bp), C-G (152bp) 及びD-H (65bp) を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、第二PCRでアッセンブリした。第二PCRにおいては、1µgの各第一PCRの生成物、及び5uのAmpli Taqを含有する98µlのPCR混合物を、94℃にて2分間、50℃にて2分間及び72℃にて2分間で2サイクルインキュベートし、そして次に100pmoleの各外部プライマー(A及びH)を加えた。PCRチューブを50µlの鉱油で覆い、そして前記と同一の条件で30サイクルのPCRを行った。 20

#### 【0100】

第二PCRにより生じた399bpのDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルで精製し、BamHI及びHindIIIで消化し、得られたDNA断片をHEF発現ベクターHEF-V<sub>L</sub>-gkにクローニングした。DNA配列決定の後、再構成ヒトSK2抗体L鎖V領域のバージョン「a」の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVL-SK2aと命名した。本プラスミドHEF-RVL-SK2aに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号: 52に示す。 30

#### 【0101】

再構成ヒトSK2抗体L鎖V領域のバージョン「b」を、PCRを用いる変異誘発によって作製した。変異原プライマーFTY-1 (配列番号: 42) 及びFTY-2 (配列番号: 43) は、71位のフェニルアラニンがチロシンに変異するように設計した。プラスミドHEF-RV1-SK2aを鋳型DNAとして用いた。最終PCR生成物を精製し、BamHI及びHindIIIで消化し、得られたDNA断片をHEF-発現ベクターHEF-V<sub>L</sub>-gkにクローニングしてプラスミドHEF-RVL-SK2bを得た。本プラスミドHEF-RVL-SK2bに含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号: 53に示す。 40

#### 【0102】

##### 再構成ヒトSK2抗体H鎖V領域の作製

再構成ヒトSK2抗体H鎖V領域をコードするDNAを次の様にして設計した。ヒト抗体DAWのFRをコードするDNA配列をV領域(Kabat, E.A.ら、US Dept Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)の「codon usage」に基いて設計し、そしてマウスSK2抗体H鎖V領域のCDRをコードするDNA配列とつなげることにより、再構成ヒトSK2抗体H鎖V領域のバージョン「a」をコードする全長 50

DNAを設計した。

【0103】

次に、このDNA配列のそれぞれ5'-側及び3'-側にHindIII認識部位/KOZAKコンセンサス配列及びBamHI認識部位/スプライドナー配列を付加して、HEF発現ベクターに挿入できるようにした。

こうして設計したDNA配列を6個のオリゴヌクレオチドに分け、そして次に、これらのオリゴヌクレオチドのアセンブリーを妨害する可能性のあるオリゴヌクレオチド中の二次構造についてコンピューター解析した。

【0104】

6個のオリゴヌクレオチド配列を配列番号：44～49に示す。これらのオリゴヌクレオチドは93～96塩基の長さを有し、20～24bpのオーバーラップ領域を有する。オリゴヌクレオチドの内の3個、すなわち、HP1（配列番号：44）、HP3（配列番号：46）及びHP5（配列番号：48）はセンスDNA配列を有し、そして他の3個、すなわち、HP2（配列番号：45）、HP4（配列番号：47）及びHP6（配列番号：49）はアンチセンスDNA配列を有する。これら6個のオリゴヌクレオチドのPCR法によるアセンブリーの方法を図7に示す。

【0105】

2pmoleずつの6種のオリゴヌクレオチド及び5uのAmpliTaqを含有する98μlのPCR混合物を、94℃にて2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分間のから成る3サイクルのインキュベーションを行い、次に72℃にて10分間インキュベートした。50μmoleずつのHP1及びHP6を外部プライマーとして添加した後、PCRチューブを50μlの鉱油で覆い、そして94℃にて1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30サイクルを行い、そして次に72℃にて10分間インキュベートした。

【0106】

448bpのDNA断片を1.5%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、そして次にHEF発現ベクターHEF-V<sub>H</sub>-g1にクローニングした。DNA配列決定の後、正しいH鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVH-SK2aと命名した。本プラスミドHEF-RVH-SK2aに含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：54に示す。

【0107】

バージョン「b」を、PCR法による変異誘発を用いて作製した。変異原プライマーRSK2-STNA（配列番号：50）及びRSK-STNB（配列番号：51）を、30位のセリンがアスパラギンに変る様に設計した。プラスミドRVH-SK2aを鋳型DNAとして使用した。最終PCR生成物を精製し、BamHI及びHindIIIにより消化し、そして次にHEF発現ベクターHEF-V<sub>H</sub>-g1にクローニングし、プラスミドHEF-RVH-SK2bを得た。本プラスミドHEF-RVH-SK2bに含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：55に示す。

【0108】

再構成ヒトSK2抗体の各鎖を評価するため、まず、再構成ヒトSK2抗体L鎖のための2種類の発現ベクターHEF-RVL-SK2a（バージョン「a」）及びHEF-RVL-SK2b（バージョン「b」）のいずれかと、キメラSK2抗体H鎖のための発現ベクターHEF-SK2h-g1とによりCOS細胞を前記のようにして同時トランスフェクションし、前記のようにして抗体生成物を回収した後、前記のようにして抗原結合測定にかけた。

【0109】

この結果を図8に示す。図8に示すように、陽性対照としてのキメラ抗体（ChL/ChH）と、再構成L鎖バージョン「a」とキメラH鎖とから成る抗体（RVL a/ChH）、と再構成L鎖バージョン「b」とキメラH鎖とから成る抗体（RVL b/ChH）との

10

20

30

40

50

間には抗原結合性に差がなく、71位におけるチロシン残基のフェニルアラニン残基への変化は抗原結合性に影響を与えないことが示された。

【0110】

次に、再構成ヒト化SK2抗体L鎖の2つのバージョンと再構成ヒト化SK2抗体H鎖の2つのバージョンとの組合せを評価するため、HEF-RVL-SK2aとHEF-RVH-SK2a、HEF-RVL-SK2aとHEF-RVH-SK2b、HEF-RVL-SK2bとHEF-RVH-SK2a、又はHEF-RVL-SK2bとHEF-RVH-SK2bとによりCOS細胞を同時トランスフェクションし、前記のようにして得られた抗体について抗原結合測定を行った。その結果を図9に示す。図9から明らかな通り、再構成ヒトH鎖と再構成ヒトV鎖とのすべての組合せが、キメラSK2抗体に匹敵する良好な抗原結合性を示した。

10

【0111】

なお、前記プラスミドHEF-RVL-SK2bを含有する大腸菌は*Escherichia coli* DH5 (HEF-RVL-SK2b)、およびプラスミドHEF-RVH-SK2aを含有する大腸菌は*Escherichia coli* DH5 (HEF-RVH-SK2a)として工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成5年4月21日に、各々FERM BP-4267、およびFERM BP-4268としてブダペスト条約に基き国際寄託された。

【0112】

これに対して、図10に示すように、結合阻害(IL6とIL-6Rと結合を阻害する抗体の能力)測定においては、再構成ヒトSK2抗体L鎖バージョン「b」(RvLb)と再構成ヒトSK2抗体H鎖バージョン「a」(RvHa)との組合せのみが、マウスモノクローナル抗体SK2及びキメラSK2抗体に匹敵する結合阻害活性を示し、この組合せがヒト抗体における機能的抗原結合部位を形成することが示唆された。

20

【0113】

他方、再構成ヒトSK2抗体L鎖バージョン「a」(RvLa)と再構成ヒトSK2抗体H鎖バージョン「a」(RvHa)との組合せ、及びRvLaとRvHbとの組合せは低い結合阻害活性を示し、L鎖中の71位にフェニルアラニンを有する抗体は良好な抗原結合活性を示すが機能的抗原結合部位を再形成することが示唆された。

これらのことからヒト抗体L鎖のCDR1領域に於けるループ構造には、71位のチロシンは機能的な抗原結合部位を再構成するのに必須であると言える。

30

【0114】

参考例1. ハイブリドーマSK2の作製

抗-ヒトIL-6モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマはヒトIL-6で免役したBALB/cマウスの脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞株P3U1をポリエチレングリコールを用いた常法により融合して作製した。IL-6とIL-6Rの結合を阻害する活性を指標としたスクリーニングを行い、結合阻害活性を有する17種のクローンを得た。これらのクローンをマウスの腹腔内に移植し、得られた腹水をプロテインAアガロースカラムにかけ、精製マウスモノクローナル抗体を得た。

【0115】

参考例2. マウスモノクローナル抗体SK2のタイピング

ハイブリドーマSK2から産生されるマウスモノクローナル抗体SK2のL鎖およびH鎖のタイプを調べるために、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(アマシャムインターナショナルplc社製)を用いてタイピングを行った。その結果、SK2抗体は型軽鎖および1型重鎖を有することが明らかになった。

40

【0116】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG

40

10

【0117】

配列番号：2

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGAGWCAG ACACACTCCT GYTATGGGT

39

20

【0118】

配列番号：3

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGSGTTG

40

30

【0119】

配列番号：4

配列の長さ：43

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTGGMWTC TTG

43

10

【0120】

配列番号：5

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTWC AGGTGCAGAT TWTCAGCTTC

40

20

【0121】

配列番号：6

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGGTKCY YTGYSAGYT YCTGRGG

37

30

【0122】

配列番号：7

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCWTC AAGATGGAGTC ACAKWWYYCWG G

41

10

【0123】

配列番号：8

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTGGGGAY CTKTTTTYCM TTTTCAATT G

41

20

【0124】

配列番号：9

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG

35

30

【0125】

配列番号：10

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTTGTTGTC TATTTCT

37

10

【0126】

配列番号：11

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCC

38

20

【0127】

配列番号：12

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGATCCCGGG TGGATGGTGG GAAGATG

27

30

【0128】

配列番号：13

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT STTCTTC

37

10

【0129】

配列番号：14

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT

36

20

【0130】

配列番号：15

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGWTGT GGTAAACTG GGTTTTT

37

30

【0131】

配列番号：16

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGRAC TTTG GGYTCAGCTT GRTTT

35

10

【0132】

配列番号：17

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCCCTT

40

20

【0133】

配列番号：18

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGCTGTCY TRGSGCTRCT CTTCTGC

37

30

【0134】

配列番号：19

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGRATGGA GCKGGRTCTT TMTCTT

36

10

【0135】

配列番号：20

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGAGAGTGC TGATTCTTTT GTG

33

20

【0136】

配列番号：21

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGMTTGGG TGTGGAMCTT GCTATTCTTG

40

30

【0137】

配列番号：22

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCAGAC TTACATTCTC ATTCCTG

37

10

【0138】

配列番号：23

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTTG GGCTGATTTT TTTTATTG

38

20

【0139】

配列番号：24

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGATGGTGT TAAGTCTTCT GTACCTG

37

30

【0140】

配列番号：25

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG

28

10

【0141】

配列番号：26

配列の長さ：379

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：psk2-k2

特徴： 1..60 sig peptide

61..279 mat peptide

配列

【0143】

配列番号：27

配列の長さ：457

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：pUC-SK2-V<sub>H</sub>

特徴： 1..57 sig peptide

58..457 mat peptide

配列

【0144】

20

30

40

ATG GGC AGA CTT ACA TTC TCA TTC CTG CTA CTG ATT GTC CCT GCA	45	
Met Gly Arg Leu Thr Phe Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala		
	-15	-10
		-5
TAT GTC CTG TCC CAG GTT ACT CTG AAA GAG TCT GGC CCT GGG ATA	90	
Tyr Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile		10
	-1	1
		5
		10
TTG CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT TGT TCT TTC TCT GGT	135	
Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly		
	15	20
		25
TTT TCA CTG AAC ACT TCT GGT ATG ACC GTA GGC TGG ATT CGT CAG	180	
Phe Ser Leu Asn Thr Ser Gly Met Thr Val Gly Trp Ile Arg Gln		20
	30	35
		40
CCT TCA GGG AAG GGT CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TGG TGG AAT	225	
Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn		
	45	50
		55
GAT GAT AAG TAC TAT AAC CCA GCC CTG AAA GGC CGG CTC ACA ATC	270	
Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Gly Arg Leu Thr Ile		
	60	65
		70
TCC AAG GAT ACC TCC AAC AAC CAG GTA TTC CTC AAG ATC GCC AGT	315	30
Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser		
	75	80
		85
GTG GTC ACT GCA GAT ACT GCC ACA TAC TAC TGT GCT CGA ATG GAG	360	
Val Val Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu		
	90	95
		100
GAT TAC GAC GAA GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC	405	
Asp Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val		40
	105	110
		115
ACC GTC TCC TCA G	418	
Thr Val Ser Ser		
	120	

配列番号：28

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CCTGGATCCA CTCACGTTTT ATTTCCAAC T TGTC

35

10

【0146】

配列番号：29

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATAAGCTTG CCGCCACCAT GAGTGTGCTC ACTCAG

36

20

【0147】

配列番号：30

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATAAGCTTG CCGCCACCAT GGGCAGACTT ACATTC

36

30

【0148】

配列番号：31

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TGTTGGATCC ACTCACCTGA AGAGACAGTG ACTGAGGTTC

40

10

【0149】

配列番号：32

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CAGAAGTGA CAGTGAAAAA CCAGA

25

20

【0150】

配列番号：33

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTTTTCACTG TCCACTTCTG GTATGAC

27

30

【0151】

配列番号：34

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AACAGCTATG ACCATGA

17

10

【0152】

配列番号：35

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAATTCGGAT CCACTCACGT TTGATT

26

20

【0153】

配列番号：36

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GAATATTTAC AGTAATTTAG CATGGTACCA GCAGAAGCC

39

30

【0154】

配列番号：37

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TGCTGATCTA CGCCGCAACA TACTTAGCAG ATGGTGTGCC AAGCA

45

10

【0155】

配列番号：38

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTGGGGTACT CCTCCGTTCT GGCCAAGGGA CCAAGGT

37

20

【0156】

配列番号：39

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTACTGTAAA TATTCTCACT TGCTCTACAG GTGATGGTCA C

41

30

【0157】

配列番号：40

配列の長さ：45

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACCATCTGCT AAGTATGTTG CGTCGTAGAT CAGCAGCTTT GGAGC

45

10

【0158】

配列番号：41

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGGAGGAGTA CCCCAAAAAT GTTGGCAGTA GTAGGT

36

20

【0159】

配列番号：42

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGTACCGACT ACACCTTCAC CATCAGCAGC C

31

30

【0160】

配列番号：43

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGTGAAGGTG TAGTCGGTAC CGCTACCGCT A

31

10

【0161】

配列番号：44

配列の長さ：95

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GATAAGCTTG CCACCATGGA CTGGACCTGG AGGGTCTTCT TCTTGCTGGC

50

TGTAGCTCCA CGTGCTCACT CCCAAGTGAC TCTGAGGGAG TCTGG

95

20

【0162】

配列番号：45

配列の長さ：93

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AGTACTTAAT GAGAAGCCAG AGAAGGTGCA GGTGAGTGTC AGAGTCTGTG

50

TAGGTCTCAC AAGGGCAGGT CCAGACTCCC TCAGAGTCAC TTG

93

30

40

【0163】

配列番号：46

配列の長さ：95

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTCTCTGGCT TCTCATTAAG TACTTCTGGT ATGACCGTAG GCTGGATTCG 50

CCAACCTCCT GGAGAGGCAC TGGAGTGGCT GGCACACATT TGGTG 95

10

【0164】

配列番号：47

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTGGTTCTTG GATGTGTCTT TGGAGACGGC CAGTCGGCCT TTCAGGGCaG 50

GGTTATAGTA CTTATCATCA TTCCACCAAA TGTGTGCCAG CCACTC 96

20

【0165】

配列番号：48

配列の長さ：98

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TCCAAAGACA CATCCAAGAA CCAGGTTGTC CTGTCCATGA ACACCGTGGG 50

TCCCGGGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC AAGAATGGAG GATTACGA 98

30

40

【0166】

配列番号：49

配列の長さ：94

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GTCGGATCCA CTCACCTGAG GAGACGGTGA CCAGAATCCC TTGGCCCCAG 50

TAGTCCATAG CTTGTCGTA ATCCTCCATT CTTGCACAGT AATA 94

10

【0167】

配列番号：50

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

TTCTCATTAA ATACTTCTGG TATGACCGTA 31

20

【0168】

配列番号：51

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACCAGAAGTA TTTAATGAGA AGCCAGAGAA G 31

30

40

【0169】

配列番号：52

配列の長さ：376

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成

起源

10

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVL-SK2a

【0170】

特徴：ヒトIL-6に対する再構成ヒトSK2抗体のL鎖V領域バージョン（a）及びそれをコードする遺伝子

アミノ酸 -19--1：leader

20

アミノ酸 1-23：FR1

アミノ酸 24-34：CDR1

アミノ酸 35-49：FR2

アミノ酸 50-56：CDR2

アミノ酸 57-88：FR3

アミノ酸 89-96：CDR3

アミノ酸 97-106：FR4

30

配列

【0171】

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA	45	
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr		
	-15	-10
		-5
GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG	90	
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu		
	-1	1
		5
		10
AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGA GCA AGT	135	10
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser		
	15	20
		25
GAG AAT ATT TAC AGT AAT TTA GCA TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA	180	
Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
	30	35
		40
AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC GCC GCA ACA TAC TTA GCA GAT	225	
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Tyr Leu Ala Asp		20
	45	50
		55
GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC	270	
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
	60	65
		70
ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC	315	30
Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr		
	75	80
		85
TAC TGC CAA CAT TTT TGG GGT ACT CCT CCG TTC GGC CAA GGG ACC	360	
Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Pro Phe Gly Gln Gly Thr		
	90	95
		100
AAG GTG GAA ATC AAA C	376	
Lys Val Glu Ile Lys		40
	105	

配列番号：53

配列の長さ：376

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVL-SK2b

【0173】



60 65 70  
 ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC 315  
 Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr

75 80 85

TAC TGC CAA CAT TTT TGG GGT ACT CCT CCG TTC GGC CAA GGG ACC 360  
 Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Pro Phe Gly Gln Gly Thr 10

90 95 100

AAG GTG GAA ATC AAA C 376  
 Lys Val Glu Ile Lys

105

【0175】

配列番号：54

配列の長さ：418 20

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源 30

クローン：HEF-RVH-SK2a

【0176】

特徴：ヒトIL-6に対する再構成ヒト化SK2抗体のH鎖V領域バージョン（  
 a）及びそれをコードする遺伝子。

アミノ酸 -19--1：leader

アミノ酸 1-30：FR1

アミノ酸 31-37：CDR1 40

アミノ酸 38-51：FR2

アミノ酸 52-67：CDR2

アミノ酸 68-99：FR3

アミノ酸 100-109：CDR3

アミノ酸 110-120：FR4

配列

【0177】 50

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA	45	
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro		
	-15	-10
		-5
CGT GCT CAC TCC CAA GTG ACT CTG AGG GAG TCT GGA CCT GCC CTT	90	
Arg Ala His Ser Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu		
	-1	1
		5
		10
GTG AGA CCT ACA CAG ACT CTG ACA CTC ACC TGC ACC TTC TCT GGC	135	10
Val Arg Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly		
	15	20
		25
TTC TCA TTA AGT ACT TCT GGT ATG ACC GTA GGC TGG ATT CGC CAA	180	
Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Thr Val Gly Trp Ile Arg Gln		
	30	35
		40
CCT CCT GGA GAG GCA CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TGG TGG AAT	225	
Pro Pro Gly Glu Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn		20
	45	50
		55
GAT GAT AAG TAC TAT AAC CCT GCC CTG AAA GGC CGA CTG GCC GTC	270	
Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Gly Arg Leu Ala Val		
	60	65
		70
TCC AAA GAC ACA TCC AAG AAC CAG GTT GTC CTG TCC ATG AAC ACC	315	
Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Ser Met Asn Thr		
	75	80
		85
GTG GGT CCC GGG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA AGA ATG GAG	360	
Val Gly Pro Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu		
	90	95
		100
GAT TAC GAC GAA GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ATT CTG GTC	405	
Asp Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val		
	105	110
		115
ACC GTC TCC TCA G	418	40

Thr Val Ser Ser

120

【0178】

配列番号：55

配列の長さ：418

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

10

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVH-SK2b

【0179】

20

特徴：ヒトIL-6に対する再構成ヒト化SK2抗体のH鎖V領域バージョン（

b）及びそれをコードする遺伝子。

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-37: CDR1

アミノ酸 38-51: FR2

アミノ酸 52-67: CDR2

30

アミノ酸 68-99: FR3

アミノ酸 100-109: CDR3

アミノ酸 110-120: FR4

配列

【0180】

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA	45	
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro		
-15 -10 -5		
CGT GCT CAC TCC CAA GTG ACT CTG AGG GAG TCT GGA CCT GCC CTT	90	
Arg Ala His Ser Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu		
-1 1 5 10		
GTG AGA CCT ACA CAG ACT CTG ACA CTC ACC TGC ACC TTC TCT GGC	135	10
Val Arg Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly		
15 20 25		
TTC TCA TTA AAT ACT TCT GGT ATG ACC GTA GGC TGG ATT CGC CAA	180	
Phe Ser Leu Asn Thr Ser Gly Met Thr Val Gly Trp Ile Arg Gln		
30 35 40		
CCT CCT GGA GAG GCA CTG GAG TGG CTG GCA CAC ATT TGG TGG AAT	225	
Pro Pro Gly Glu Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn		20
45 50 55		
GAT GAT AAG TAC TAT AAC CCT GCC CTG AAA GGC CGA CTG GCC GTC	270	
Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Gly Arg Leu Ala Val		
60 65 70		
TCC AAA GAC ACA TCC AAG AAC CAG GTT GTC CTG TCC ATG AAC ACC	315	
Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Ser Met Asn Thr		
75 80 85		30
GTG GGT CCC GGG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA AGA ATG GAG	360	
Val Gly Pro Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu		
90 95 100		
GAT TAC GAC GAA GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ATT CTG GTC	405	
Asp Tyr Asp Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val		
105 110 115		40
ACC GTC TCC TCA G	418	
Thr Val Ser Ser		
120		

【図1】図1は、それぞれL鎖及びH鎖の発現のために有用な、ヒトEF1-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HEF-V<sub>L</sub>-gk及びHEF-V<sub>H</sub>-gkを示す。

【図2】図2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3】図3は、SK2抗体がグリコシル化されていることを示す電気泳動図である。

【図4】図4は、ヒトIL-6に結合する本発明のキメラ抗体の能力の確認のためのELISAの結果を示すグラフである。

【図5】図5は、ヒトIL-6へのIL-6の結合を阻害する本発明のキメラ抗体の能力の確認のためのELISAの結果を示すグラフである。

【図6】図6は、再構成ヒトSK2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7】図7は、再構成ヒトSK2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8】図8は、ヒトIL-6への結合についての、再構成ヒトL鎖+キメラH鎖から成る抗体の能力を示すグラフである。

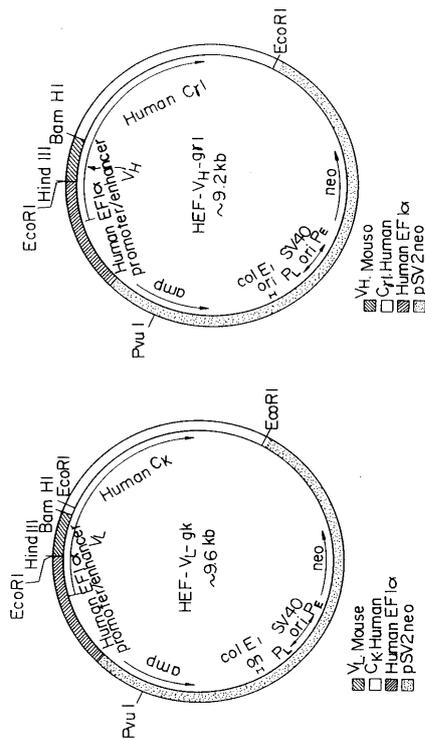
【図9】図9は、ヒトIL-6への結合についての、本発明の4種類の再構成ヒトSK2抗体の能力をキメラ抗体のそれと比較して示すグラフである。

【図10】図10は、IL-6RへのIL-6の結合を阻害する本発明の4種類の再構成ヒト化SK2抗体の能力を、SK2キメラ抗体及びマウスモノクローナル抗体SK2のそれと比較して示すグラフである。

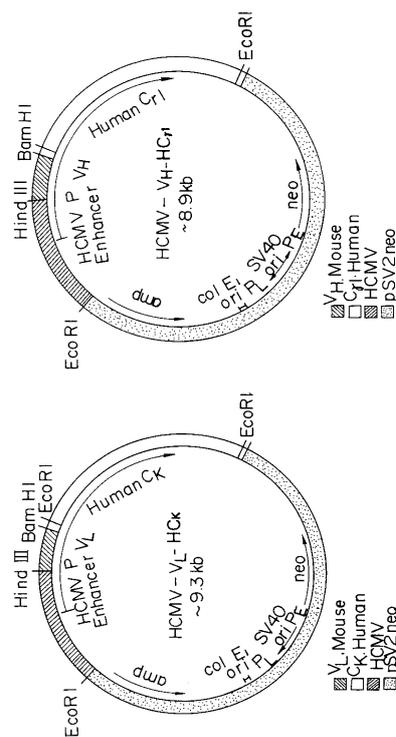
10

20

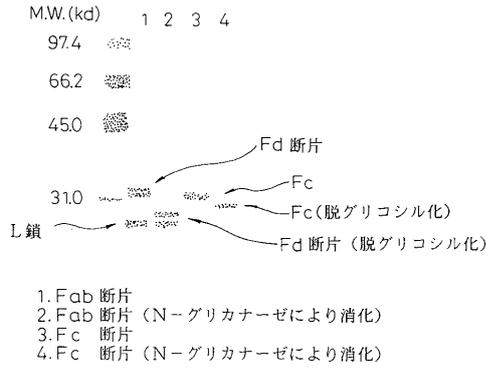
【図1】



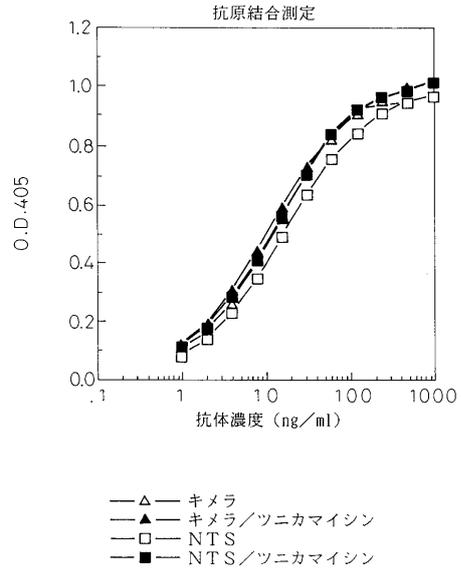
【図2】



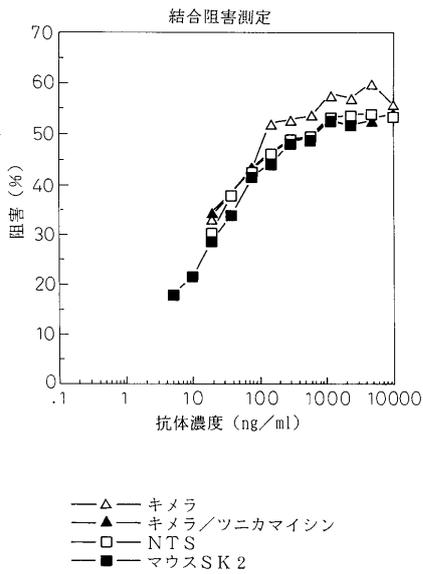
【 図 3 】



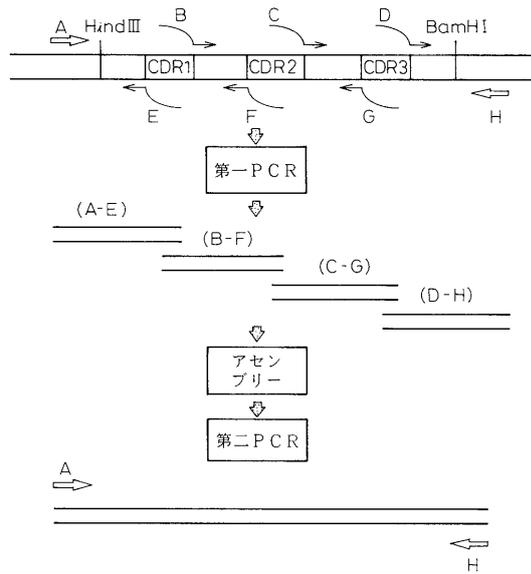
【 図 4 】



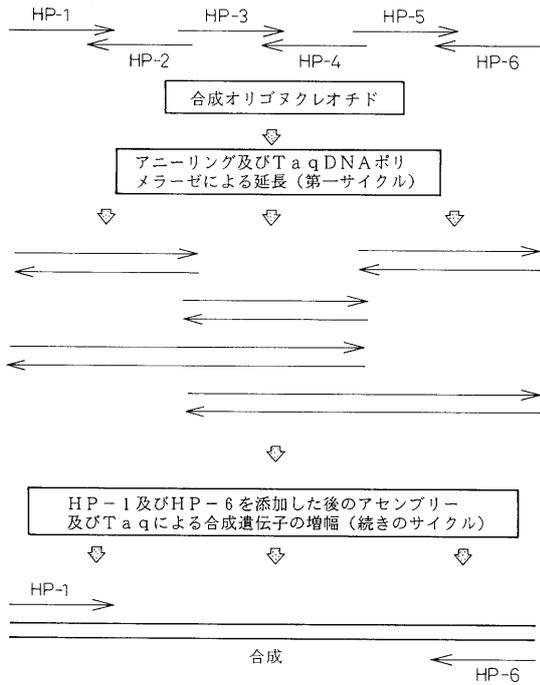
【 図 5 】



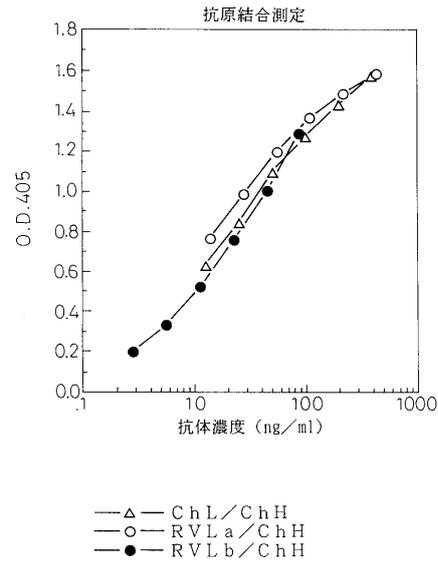
【 図 6 】



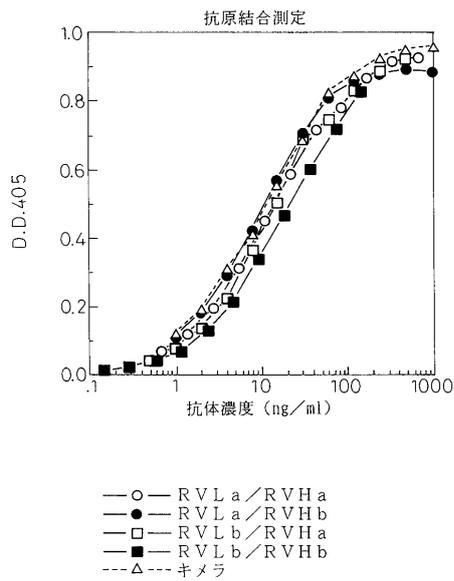
【 図 7 】



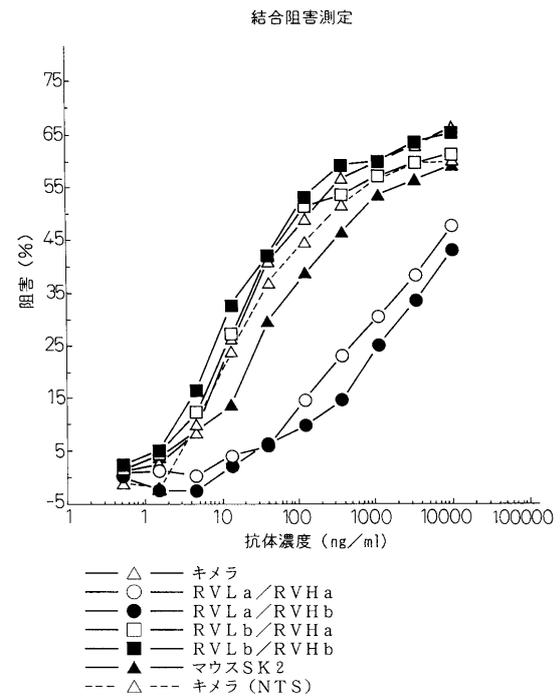
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> F I  
C 1 2 R 1:19 ) C 1 2 N 1/21  
( C 1 2 P 21/08 C 1 2 R 1:19  
C 1 2 R 1:91 ) C 1 2 P 21/08  
C 1 2 R 1:91

(72)発明者 佐藤 功  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 平田 裕一  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 特開昭61-47500(JP,A)  
日本免疫学会総会学術集会記録,1991,21,p.116  
Proc.NatI.Acad.Sci.USA., vol.86, pp.10029-10033 (1989)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
C07K 16/00 - 16/64  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTplusファイル(JOIS)  
REGISTRY/CA(STN)