

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-513539

(P2010-513539A)

(43) 公表日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 2 4
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
<b>C4OB 40/10 (2006.01)</b>	C 4 O B 40/10	4 H O 4 5
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	
<b>A61P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-542980 (P2009-542980)  
 (86) (22) 出願日 平成19年9月14日 (2007. 9. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年8月17日 (2009. 8. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/078568  
 (87) 国際公開番号 W02008/079466  
 (87) 国際公開日 平成20年7月3日 (2008. 7. 3)  
 (31) 優先権主張番号 60/871, 069  
 (32) 優先日 平成18年12月20日 (2006. 12. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509174093  
 エムエムアール インフォメーション シ  
 ステムズ, インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 90077 カリフォル  
 ニア州, ロサンジェルス, ナンバー702  
 , ビバリー グレン サークル 2934  
 1 / 2  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体とその製造法および使用法

(57) 【要約】

本発明は、キメラヒト抗体、組換え抗体、合成抗体、およびそれらをコードする核酸、およびこれらの免疫グロブリンを作製する方法および使用する方法を提供する。本発明は、これらのポリペプチドおよび/または抗体の組換えおよび合成ポリペプチドおよび核酸実施形態を提供する。本発明はまた、コンセンサスヒトフレームワーク領域、または「独立コンセンサスフレームワーク (ICF)」含むかまたはから成るポリペプチド、それらをコードする核酸、ならびにこれらのICFおよび/または本発明の抗体を、個々におよびコンビナトリアルライブラリーおよび組合わせて含むライブラリーおよびキットを提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- (1) 軽鎖BD22084 (配列番号225) および重鎖BD20332 (配列番号138) ;  
 (2) 軽鎖BD22085 (配列番号232) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (3) 軽鎖BD22086 (配列番号227) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (4) 軽鎖BD22088 (配列番号229) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (5) 軽鎖BD22087 (配列番号240) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (6) 軽鎖BD22089 (配列番号243) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (7) 軽鎖BD22090 (配列番号234) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (8) 軽鎖BD22095 (配列番号244) および重鎖BD20337 (配列番号148) ; 10  
 (9) 軽鎖BD22091 (配列番号242) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (10) 軽鎖BD22108 (配列番号230) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (11) 軽鎖BD22092 (配列番号235) および重鎖BD20338 (配列番号149) ;  
 (12) 軽鎖BD22094 (配列番号231) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (13) 軽鎖BD22096 (配列番号241) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (14) 軽鎖BD22092 (配列番号235) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (15) 軽鎖BD22102 (配列番号248) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (16) 軽鎖BD22097 (配列番号246) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (17) 軽鎖BD22104 (配列番号239) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (18) 軽鎖BD22085 (配列番号232) および重鎖BD20339 (配列番号150) ; 20  
 (19) 軽鎖BD22107 (配列番号226) および重鎖BD20339 (配列番号150) ;  
 (20) 軽鎖BD22100 (配列番号236) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (21) 軽鎖BD22103 (配列番号228) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (22) 軽鎖BD22105 (配列番号237) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (23) 軽鎖BD22101 (配列番号247) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (24) 軽鎖BD22106 (配列番号245) および重鎖BD20333 (配列番号142) ;  
 (25) 軽鎖BD22108 (配列番号230) および重鎖BD20338 (配列番号149) ;  
 (26) 軽鎖BD22109 (配列番号233) および重鎖BD20341 (配列番号154) ; または  
 (27) 軽鎖BD22111 (配列番号238) および重鎖BD20336 (配列番号144) ;  
 の組み合わせを有する少なくとも1つの可変領域を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。 30

## 【請求項 2】

軽鎖部分および重鎖部分が次の組み合わせ：

- (1) 軽鎖BD22084 (配列番号225) および重鎖BD20332 (配列番号138) ;  
 (2) 軽鎖BD22085 (配列番号232) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (3) 軽鎖BD22086 (配列番号227) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (4) 軽鎖BD22088 (配列番号229) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (5) 軽鎖BD22087 (配列番号240) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (6) 軽鎖BD22089 (配列番号243) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (7) 軽鎖BD22090 (配列番号234) および重鎖BD20337 (配列番号148) ; 40  
 (8) 軽鎖BD22095 (配列番号244) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (9) 軽鎖BD22091 (配列番号242) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (10) 軽鎖BD22108 (配列番号230) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (11) 軽鎖BD22092 (配列番号235) および重鎖BD20338 (配列番号149) ;  
 (12) 軽鎖BD22094 (配列番号231) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (13) 軽鎖BD22096 (配列番号241) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (14) 軽鎖BD22092 (配列番号235) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (15) 軽鎖BD22102 (配列番号248) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (16) 軽鎖BD22097 (配列番号246) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (17) 軽鎖BD22104 (配列番号239) および重鎖BD20337 (配列番号148) ; 50

- (18) 軽鎖BD22085 (配列番号232) および重鎖BD20339 (配列番号150) ;  
 (19) 軽鎖BD22107 (配列番号226) および重鎖BD20339 (配列番号150) ;  
 (20) 軽鎖BD22100 (配列番号236) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (21) 軽鎖BD22103 (配列番号228) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (22) 軽鎖BD22105 (配列番号237) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (23) 軽鎖BD22101 (配列番号247) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (24) 軽鎖BD22106 (配列番号245) および重鎖BD20333 (配列番号142) ;  
 (25) 軽鎖BD22108 (配列番号230) および重鎖BD20338 (配列番号149) ;  
 (26) 軽鎖BD22109 (配列番号233) および重鎖BD20341 (配列番号154) ; または  
 (27) 軽鎖BD22111 (配列番号238) および重鎖BD20336 (配列番号144)

10

の少なくとも1つのそれぞれの軽鎖および重鎖と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%または完全に配列が同一である、重鎖可変領域の少なくとも一部分および軽鎖可変領域の少なくとも一部分を含む抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

軽鎖の少なくとも一部分、重鎖の少なくとも一部分またはそれらの両方は

(1)それぞれKabatフレームワーク領域1 (KF1) ドメインの少なくとも一部分由来のアミノ酸を含む複数のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸コンセンサス配列から成る独立コンセンサスフレームワーク1 (ICF1) ドメインであって、前記複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン可変領域遺伝子の生殖系列配列から翻訳されるかまたは成熟免疫グロブリンから得られる前記ドメインを提供するステップ ;

20

(2)1F5抗体の可変領域由来の相補性決定域1 (CDR1) の少なくとも一部分を提供するステップ ;

(3)それぞれKabatフレームワーク領域2 (KF2) ドメインの少なくとも一部分由来のアミノ酸を含む複数のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸コンセンサス配列から成る独立コンセンサスフレームワーク2 (ICF2) ドメインであって、前記複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン可変領域遺伝子の生殖系列配列から翻訳されるかまたは成熟免疫グロブリンから得られる前記ドメインを提供するステップ ;

(4)1F5抗体の可変領域由来の相補性決定域2 (CDR2) の少なくとも一部分を提供するステップ ;

(5)それぞれKabatフレームワーク領域3 (KF3) ドメインの少なくとも一部分由来のアミノ酸を含む複数のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸コンセンサス配列から成る独立コンセンサスフレームワーク3 (ICF3) ドメインであって、前記複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン可変領域遺伝子の生殖系列配列から翻訳されるかまたは成熟免疫グロブリンから得られる前記ドメインを提供するステップ ;

30

(6)1F5抗体の可変領域由来の相補性決定域3 (CDR3) の少なくとも一部分を提供するステップ ; および

(7)任意に、それぞれKabatフレームワーク領域4 (KF4) ドメインの少なくとも一部分由来のアミノ酸を含む複数のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸コンセンサス配列から成る独立コンセンサスフレームワーク4 (ICF4) ドメインであって、前記複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン可変領域遺伝子の生殖系列配列から翻訳されるかまたは成熟免疫グロブリンから得られる前記ドメインを提供するステップ ;

40

ここで、以上のステップに記載のICFの少なくとも1つはゲノム核酸配列から誘導されたものであり、

(8)5'から3'の方向に、ICF1-CDR1-ICF2-CDR2-ICF3-CDR3および任意にICF4ドメインをコードする核酸を接続するステップ

を含んでなる方法より作製された配列から少なくとも部分的に誘導される、前記抗体またはその抗原結合フラグメント。

### 【請求項3】

抗体フラグメントがFabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、1本鎖抗体、Fvフラグメント、scFvフラグメント、抗体疑似体、Fdフラグメント、またはFd'

50

フラグメントである、請求項 2 に記載の抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 4】

抗原結合抗体フラグメントがFcと融合している、請求項 3 に記載の抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 5】

少なくとも1つの請求項 2 に記載の可変領域組合わせを含む構造を有する組換え、合成または単離された抗体。

【請求項 7】

少なくとも1つの請求項 2 に記載の可変領域組合わせを含む、キメラ抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

キメラ抗体フラグメントがキメラFab、キメラFab'、キメラF(ab')<sub>2</sub>、キメラ1本鎖抗体、キメラFv、キメラscFv、抗体疑似体、キメラFd、またはキメラFd'である、請求項 7 に記載のキメラ抗原結合抗体フラグメント。

【請求項 9】

CD20抗原と特異的に結合しかつ (a) 配列番号43~49のアミノ酸配列を含むICF1；(b) 配列番号163のアミノ酸配列を含むCDR1；(c) 配列番号58~61のアミノ酸配列を含むICF2；(d) 配列番号164のアミノ酸配列を含むCDR2；(e) 配列番号67~71、73、または74のアミノ酸配列を含むICF3；(f) 配列番号165のアミノ酸配列を含むCDR3；および/または (g) 配列番号83のアミノ酸配列を含むICF4；を含む軽鎖可変領域を含むものである、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

CD20抗原と特異的に結合しかつ (a) 配列番号6または7のアミノ酸配列を含むICF1；(b) 配列番号151のアミノ酸配列を含むCDR1；(c) 配列番号9、10、または11のアミノ酸配列を含むICF2；(d) 配列番号152のアミノ酸配列を含むCDR2；(e) 配列番号13、17、19、または20のアミノ酸配列を含むICF3；(f) 配列番号153のアミノ酸配列を含むCDR3；および/または (g) 配列番号21のアミノ酸配列を含むICF4；を含む重鎖可変領域を含むものである、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

請求項 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物または製剤。

【請求項 12】

さらに製薬上許容される担体または賦形剤を含む、請求項 11 に記載の医薬組成物または製剤。

【請求項 13】

疾患、感染、症状または毒物曝露を治療または改善する方法であって、

(a) 請求項 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物を提供するステップ；および

(b) 十分な量の前記抗体またはその抗原結合フラグメントを、それを必要とする個体に投与するステップ

を含んでなる前記方法。

【請求項 14】

免疫反応を抑制または抑止する方法であって、

(a) 請求項 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するステップ；および

(b) 十分な量の前記抗体またはその抗原結合フラグメントを、それを必要とする個体に投与するステップ

を含んでなる前記方法。

【請求項 15】

B細胞介在性免疫反応を抑制または抑止する方法であって、

(a) 請求項 2 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するステップ；および

(b) 十分な量の前記抗体またはその抗原結合フラグメントを、それを必要とする個体に投

10

20

30

40

50

与するステップ  
を含んでなる前記方法。

【請求項 16】

B細胞リンパ腫を治療する方法であって、  
(a)請求項2に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するステップ；および  
(b)十分な量の前記抗体またはその抗原結合フラグメントを、それを必要とする個体に投与するステップ  
を含んでなる前記方法。

【請求項 17】

十分な量の前記抗体またはその抗原結合フラグメントを被験者に投与するステップを含む方法によりB細胞介在性疾患を有する被験者を治療する医薬組成物の製造における、請求項2に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの使用。

10

【請求項 18】

疾患がB細胞リンパ腫である、請求項17に記載の使用

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は広く、遺伝子工学、分子免疫学および医学に関する。一態様において、本発明は、キメラ抗体（ヒト成分をもつキメラ抗体）などの抗体、それをコードする核酸、ならびにこれらの免疫グロブリンを作製する方法および使用方法を提供する。本発明は組換えおよび合成ポリペプチドならびにこれらのポリペプチドの核酸実施形態を提供する。本発明はまた、コンセンサスヒトフレームワーク領域または「独立コンセンサスフレームワーク領域（ICF）」を含むかまたはから成るポリペプチド、それらをコードする核酸、ならびに、これらのICFおよび/または本発明の抗体を個々におよびコンビナトリアルライブラリーおよび組合わせで含むライブラリーおよびキットを提供する。

20

【背景技術】

【0002】

抗体（または免疫グロブリン、Ig）は、免疫系が身体内の異物の存在に応答して産生するタンパク質である。免疫グロブリンはまた、免疫系の他の機能も果たしかつ介在する。免疫グロブリンをコードする核酸配列は最初にゲノム（生殖系列）のいくつかの遺伝子から誘導され、これらがその後、成熟中に再配置されかつ変異して、その最終的な成熟型における免疫グロブリンの多様性をさらに増加する。典型的な免疫グロブリンであるIgGは、4本の鎖（それぞれ可変領域と定常領域をもつ2本の重鎖と2本の軽鎖）により形成されるY型構造を有する。可変領域はさらに、様々なサブ域、例えばフレームワーク領域（FR）および相補性決定域（CDR）に分割することができる。

30

【0003】

免疫グロブリンは様々な疾患と症状、例えばアレルギー、移植拒絶、癌、および宿主対移植片病を治療するために用いられてきた。しかし、治療用抗体調製物をヒト患者に投与すると、抗体は時折、とりわけ反復投与後に、患者による抗体自身に対する望ましくない潜在的に危険な免疫反応（「免疫原性」）を引き起こす。免疫原性は、抗体が動物からなどの非ヒト供給源からである場合に特別な問題を起こしうる。抗体が治療モデルでしばしば利用されるマウス由来である場合、患者はヒト抗マウス抗体（HAMA）応答を発現しうる。HAMAのような望ましくない免疫原性を低減するために、動物抗体のある特定領域をヒト抗体の対応する領域によって置き換える、すなわち「ヒト化」することができる。「キメラ」抗体およびCDR移植抗体などの改変抗体が、免疫原性応答を低減するために開発されてきた。しかし、かかる置き換え戦略は免疫原性を十分に最小化できないしかつ免疫グロブリンの治療効力を低減しうる。従って、免疫原性を低減するか除去する一方、治療効力を維持しまたは改善する改変免疫グロブリンが必要である。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

50

## 【0004】

本発明は1つの種由来のフレームワークおよび抗原と結合する役割を果たす他の種由来の配列を有する抗体を提供する。代替の態様において、これらの抗体は単離された、組換え型または合成型である。代替の実施形態において、本発明の抗体のフレームワークセグメント（または「フレームワーク領域」またはFR）の少なくとも1つ、いくつか、または全てが生殖系列配列由来の核酸配列によりコードされ；そして一態様において、フレームワークセグメントの少なくとも1つ、いくつか、または全ては、本明細書に記載した「コンセンサス配列」である。一態様において、前記抗体フレームワークセグメントは、例えば、*in vivo*免疫治療薬または免疫診断薬として本発明の抗体を投与する動物、例えばヒトから誘導される。抗原と結合する役割を果たす抗体配列フラグメントは「相補性決定域」（またはCDR）とも呼ばれ、所望の抗原特異的抗体を作製するために利用する非ヒト動物から誘導される。代替の態様においては、該抗原を人為的にこの動物に投与してもよいし、あるいは、該抗原の天然もしくは偶発的環境曝露、例えば、感染または毒素もしくは毒物曝露、または該抗原の意図的投与の結果であってもよい。代替の実施形態において、FRはヒトゲノムポリペプチド由来の「コンセンサス配列」によりコードされ、かつCDRはマウス由来である。

10

## 【0005】

本発明は、治療しようとする被験体の生来の抗体に性質がより類似した本発明の抗体を設計して与える方法（「ヒトフレームワーク再アセンブリー」またはHuFR）を提供するものであって、該抗体には本発明の組換え抗体、例えば組換えヒト化抗体が含まれる。本方法は、重鎖（HC）と軽鎖（LC）可変領域のフレームワークサブ領域（FR1、FR2、FR3、およびFR4など）に対するコンセンサス配列を推論する方法を必然的に伴いするのであって、ここで各サブ領域に対するコンセンサス配列は他のフレームワークサブ領域とは独立して取得されかつ選択される。従って、核酸またはポリペプチドの多様なコレクションを、各フレームワークサブ領域について独立して選択されたコンセンサス配列のコンビナトリアルライブラリーから作製し、その後これを用いて、本発明の組換えヒト化抗体を含む、組換え抗体を作ることができる。これらのコンセンサス配列は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、およびウマなどの特別な生物の成熟免疫グロブリンまたは生殖系列配列の配列から誘導し、こうして特別な生物、動物および/またはヒトにおいて低減した免疫原性を有する抗体を作製することができる。

20

30

## 【0006】

本発明が提供する組換え重鎖もしくは軽鎖可変領域ポリペプチド、およびそれらをコードする核酸の可変領域には、少なくとも3つの「独立コンセンサス」フレームワークドメイン（ICF）：ICF1、ICF2、およびICF3を含みうる。組換え可変領域ポリペプチドはさらに独立コンセンサスフレームワーク4ドメイン（ICF4）を含みうる。

## 【0007】

一実施形態において、それぞれのICFドメインが含むアミノ酸コンセンサス配列は、生殖系列核酸配列から翻訳された複数のアミノ酸配列より決定されたものであって、それぞれがKF1、KF2、またはKF3などの対応するKabatフレームワーク領域（KF）ドメインの少なくとも一部分をコードするものである。一実施形態において、それぞれのICFドメインは、成熟KFドメインアミノ酸配列から決定されたアミノ酸コンセンサス配列を含む。一実施形態において、かかるコンセンサス配列（「コンセンサスである配列」）を得る方法は、点検によるかまたは当技術分野の配列アラインメントプログラムを用いてKabatフレームワークサブ領域（KF1、KF2、KF3、またはKF4など）の少なくとも一部分をコードするアミノ酸または核酸配列のセットをアラインするステップ；特定のサブ領域について（ヌクレオチドまたはアミノ酸などの）残基が各位置で現れる頻度を決定するステップ；およびサブ領域に対する一式のコンセンサス配列中に高頻度残基を合成し、こうしてICF1、ICF2、ICF3、またはICF4コンセンサス配列を作製するステップを含んでなる。ICFの例を重鎖ICF（表1および2を参照）および軽鎖ICF（表3および4を参照）について与える。

40

## 【0008】

50

本発明はまた、全長抗体、1本鎖抗体、二価抗体、Fabフラグメント、または1本鎖Fvなどの本発明の重鎖および軽鎖可変領域を含むIgポリペプチドも提供する。ICF1、2、および3ドメインは第1の動物種から誘導してもよく、またCDR1、2、および3ドメインを第2の動物種から誘導してもよい。CD20またはCD3などの抗原と結合する例示の抗体を提供する。

【0009】

本発明はさらに本発明のポリペプチドおよび核酸ならびにそれらのコンビナトリアルライブラリーを作る方法を提供する。本発明のポリペプチドのコンビナトリアルライブラリーは、異なるICF1、ICF2、およびICF3を異なる組合わせで組み合わせることができる。重鎖と軽鎖ライブラリーの個々のメンバー対のさらなる結合は、30,000を超える抗体のライブラリーを生じうる。このコンビナトリアルライブラリーを、所望の抗原との結合または免疫原性の低下などの所望の特性についてスクリーニングすることができる。

10

【0010】

本発明は、

(1) 軽鎖BD22084 (配列番号225) および重鎖BD20332 (配列番号138) ;  
 (2) 軽鎖BD22085 (配列番号232) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (3) 軽鎖BD22086 (配列番号227) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (4) 軽鎖BD22088 (配列番号229) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (5) 軽鎖BD22087 (配列番号240) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (6) 軽鎖BD22089 (配列番号243) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (7) 軽鎖BD22090 (配列番号234) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (8) 軽鎖BD22095 (配列番号244) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (9) 軽鎖BD22091 (配列番号242) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (10) 軽鎖BD22108 (配列番号230) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (11) 軽鎖BD22092 (配列番号235) および重鎖BD20338 (配列番号149) ;  
 (12) 軽鎖BD22094 (配列番号231) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (13) 軽鎖BD22096 (配列番号241) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (14) 軽鎖BD22092 (配列番号235) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (15) 軽鎖BD22102 (配列番号248) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (16) 軽鎖BD22097 (配列番号246) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (17) 軽鎖BD22104 (配列番号239) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (18) 軽鎖BD22085 (配列番号232) および重鎖BD20339 (配列番号150) ;  
 (19) 軽鎖BD22107 (配列番号226) および重鎖BD20339 (配列番号150) ;  
 (20) 軽鎖BD22100 (配列番号236) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (21) 軽鎖BD22103 (配列番号228) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (22) 軽鎖BD22105 (配列番号237) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (23) 軽鎖BD22101 (配列番号247) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (24) 軽鎖BD22106 (配列番号245) および重鎖BD20333 (配列番号142) ;  
 (25) 軽鎖BD22108 (配列番号230) および重鎖BD20338 (配列番号149) ;  
 (26) 軽鎖BD22109 (配列番号233) および重鎖BD20341 (配列番号154) ; または  
 (27) 軽鎖BD22111 (配列番号238) および重鎖BD20336 (配列番号144)

の組合わせを有する少なくとも1つ可変領域を含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

20

30

40

【0011】

本発明は、軽鎖部分および重鎖部分が次の組合わせ：

(1) 軽鎖BD22084 (配列番号225) および重鎖BD20332 (配列番号138) ;  
 (2) 軽鎖BD22085 (配列番号232) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (3) 軽鎖BD22086 (配列番号227) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;  
 (4) 軽鎖BD22088 (配列番号229) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;  
 (5) 軽鎖BD22087 (配列番号240) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;

50

- (6) 軽鎖BD22089 (配列番号243) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;
- (7) 軽鎖BD22090 (配列番号234) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (8) 軽鎖BD22095 (配列番号244) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (9) 軽鎖BD22091 (配列番号242) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (10) 軽鎖BD22108 (配列番号230) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (11) 軽鎖BD22092 (配列番号235) および重鎖BD20338 (配列番号149) ;
- (12) 軽鎖BD22094 (配列番号231) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (13) 軽鎖BD22096 (配列番号241) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (14) 軽鎖BD22092 (配列番号235) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (15) 軽鎖BD22102 (配列番号248) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (16) 軽鎖BD22097 (配列番号246) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;
- (17) 軽鎖BD22104 (配列番号239) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (18) 軽鎖BD22085 (配列番号232) および重鎖BD20339 (配列番号150) ;
- (19) 軽鎖BD22107 (配列番号226) および重鎖BD20339 (配列番号150) ;
- (20) 軽鎖BD22100 (配列番号236) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;
- (21) 軽鎖BD22103 (配列番号228) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (22) 軽鎖BD22105 (配列番号237) および重鎖BD20337 (配列番号148) ;
- (23) 軽鎖BD22101 (配列番号247) および重鎖BD20335 (配列番号143) ;
- (24) 軽鎖BD22106 (配列番号245) および重鎖BD20333 (配列番号142) ;
- (25) 軽鎖BD22108 (配列番号230) および重鎖BD20338 (配列番号149) ;
- (26) 軽鎖BD22109 (配列番号233) および重鎖BD20341 (配列番号154) ; または
- (27) 軽鎖BD22111 (配列番号238) および重鎖BD20336 (配列番号144)
- の少なくとも1つのそれぞれの軽鎖および重鎖と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%または完全に配列が同一である、重鎖可変領域の少なくとも一部分および軽鎖可変領域の少なくとも一部分を含む抗体またはその抗原結合フラグメントであって、
- 軽鎖の少なくとも一部分、重鎖の少なくとも一部分またはそれらの両方は
- (1)それぞれKabatフレームワーク領域1 (KF1) ドメインの少なくとも一部分由来のアミノ酸を含む複数のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸コンセンサス配列を含む独立コンセンサスフレームワーク1 (ICF1) ドメインであって、前記複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン可変領域遺伝子の生殖系列配列から翻訳されるかまたは成熟免疫グロブリンから得られる前記ドメインを提供するステップ ;
- (2)1F5抗体の可変領域由来の相補性決定域1 (CDR1) の少なくとも一部分を提供するステップ ;
- (3)それぞれKabatフレームワーク領域2 (KF2) ドメインの少なくとも一部分由来のアミノ酸を含む複数のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸コンセンサス配列を含む独立コンセンサスフレームワーク2 (ICF2) ドメインであって、前記複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン可変領域遺伝子の生殖系列配列から翻訳されるかまたは成熟免疫グロブリンから得られる前記ドメインを提供するステップ ;
- (4)1F5抗体の可変領域由来の相補性決定域2 (CDR2) の少なくとも一部分を提供するステップ ;
- (5)それぞれKabatフレームワーク領域3 (KF3) ドメインの少なくとも一部分由来のアミノ酸を含む複数のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸コンセンサス配列を含む独立コンセンサスフレームワーク3 (ICF3) ドメインであって、前記複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン可変領域遺伝子の生殖系列配列から翻訳されるかまたは成熟免疫グロブリンから得られる前記ドメインを提供するステップ ;
- (6)1F5抗体の可変領域由来の相補性決定域3 (CDR3) の少なくとも一部分を提供するステップ ; および
- (7)任意に、それぞれKabatフレームワーク領域4 (KF4) ドメインの少なくとも一部分由来のアミノ酸を含む複数のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸コンセンサス配列を含む独



立コンセンサスフレームワーク4 (ICF4) ドメインであって、前記複数のアミノ酸配列が免疫グロブリン可変領域遺伝子の生殖系列配列から翻訳されるかまたは成熟免疫グロブリンから得られる前記ドメインを提供するステップ；

ここで、以上のステップに記載のICFの少なくとも1つはゲノム核酸配列から誘導されたものであり、

(8)5'から3'の方向に、ICF1-CDR1-ICF2-CDR2-ICF3-CDR3および任意にICF4ドメインをコードする核酸を接続するステップ

を含んでなる方法より作製された配列から少なくとも部分的に誘導される、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0012】

10

本発明は、本発明の抗原結合抗体フラグメントを提供し、ここで抗体フラグメントはFabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、1本鎖抗体、Fvフラグメント、scFvフラグメント、抗体疑似体、Fdフラグメント、またはFd'フラグメントであり；またはあるいは本発明の抗原結合抗体フラグメントはFcと融合した抗体フラグメントであるかまたはを含む。

【0013】

本発明は、少なくとも1つの本発明の可変領域組合わせを含む構造を有する組換え、合成または単離された抗体を提供する。

【0014】

本発明は少なくとも1つの本発明の可変領域を含むキメラ抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

20

【0015】

本発明は、本発明のキメラ抗原結合抗体フラグメントを提供し、ここでキメラ抗体フラグメントはキメラFab、キメラFab'、キメラF(ab')<sub>2</sub>、キメラ1本鎖抗体、キメラFv、キメラscFv、抗体疑似体、キメラFd、またはキメラFd'である。

【0016】

本発明は、CD20と特異的に結合しかつ(a)配列番号43~49のアミノ酸配列を含むICF1；(b)配列番号163のアミノ酸配列を含むCDR1；(c)配列番号58~61のアミノ酸配列を含むICF2；(d)配列番号164のアミノ酸配列を含むCDR2；(e)配列番号67~71、73、または74のアミノ酸配列を含むICF3；(f)配列番号165のアミノ酸配列を含むCDR3；および/または(g)配列番号83のアミノ酸配列を含むICF4を含むものである、軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

30

【0017】

本発明は、CD20と特異的に結合しかつ(a)配列番号6または7のアミノ酸配列を含むICF1；(b)配列番号151のアミノ酸配列を含むCDR1；(c)配列番号9、10、または11のアミノ酸配列を含むICF2；(d)配列番号152のアミノ酸配列を含むCDR2；(e)配列番号13、17、19、または20のアミノ酸配列を含むICF3；(f)配列番号153のアミノ酸配列を含むCDR3；および/または(g)配列番号21のアミノ酸配列を含むICF4を含むものである、重鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0018】

40

本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物または製剤を提供し；そして一態様においては、該医薬組成物または製剤はさらに製薬上許容される担体または賦形剤を含む。

【0019】

本発明は、疾患、感染症、症状または毒物曝露を治療または改善する方法であって、(a)本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物を提供するステップ；および(b)前記抗体またはその抗原結合フラグメントの十分な量をそれを必要とする個体に投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【0020】

本発明は、免疫反応を抑制または抑止する方法であって、(a)本発明の抗体またはその

50

抗原結合フラグメントを提供するステップ；および(b)前記抗体またはその抗原結合フラグメントの十分な量をそれを必要とする個体に投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【0021】

本発明は、B細胞介在性免疫反応を抑制または抑止する方法であって、(a)本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するステップ；および(b)前記抗体またはその抗原結合フラグメントの十分な量をそれを必要とする個体に投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【0022】

本発明は、B細胞リンパ腫を治療する方法であって、(a)本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するステップ；および(b)前記抗体またはその抗原結合フラグメントの十分な量をそれを必要とする個体（例えば、ヒト）に投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

10

【0023】

本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントの有効量をB細胞介在性疾患または症状を有する被験体（例えば、ヒト）に投与するステップを含んでなる方法により、前記被験体を治療するための医薬組成物の製造に前記抗体またはそのフラグメント使用し；一態様において、該疾患はB細胞リンパ腫である。

【0024】

本発明の1以上の態様の詳細を次の図面と以下の明細書に記載する。本発明の他の特徴、目的および利点は明細書と図面から、および請求項から明らかであろう。

20

【0025】

本明細書に引用される全ての出版物、特許、特許出願、GenBank配列およびATCC寄託物は、本明細書に明示して参照により全ての目的のために組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】例示の重鎖または軽鎖の構成要素（アミノ酸配列またはそれをコードする核酸）の模式図であり、ヒトフレームワーク再アセンブリーを図解する。上段に出発マウス鎖が示され、これから3つのCDR（下線を付した）を得る。FR1、FR2、FR3、および任意にFR4に対応するそれぞれの位置に対して、様々な独立コンセンサスフレームワークドメイン（ICF）を与える。それぞれの位置にとって好ましいICFを独立して選択し、そしてマウスCDR、任意に定常ドメイン（二重下線を付した）とともにアセンブルして、組換えHuFR免疫グロブリン鎖を得る。

30

【図2】ヒト生殖系列 軽鎖可変領域に対する遺伝子から誘導されるアミノ酸配列の例を示す。

【図3】ヒト生殖系列 軽鎖可変領域に対する遺伝子から誘導されるアミノ酸配列の例を示す。

【図4】抗CD20細胞のELISAで抗CD20 HuFRクローンの特異的活性を示す抗CD20 ELISAアッセイから得たデータのグラフを図解する。下記実施例3で詳しく考察される。

【図5】抗CD20 ELISAでトップ抗CD20 HuFRクローンの特異的活性を比較するデータの棒グラフを図解する。下記実施例3で詳しく考察される。

40

【図6】アポトーシスアッセイの棒グラフであり、トップHuFRヒットのいくつかは参照抗体およびDVSA-CD20と同等以上の活性を有することを示す。下記実施例3で詳しく考察される。

【図7】細胞周期アッセイに対するものであり、HuFR抗CD20ヒットはヒトPBMCの細胞増殖をin vitroで誘導しないことを示す。下記実施例3で詳しく考察される。

【図8】CDCアッセイの棒グラフであり、下記実施例3で詳しく考察される。

【図9】ADCCアッセイの棒グラフであり、下記実施例3で詳しく考察される。

【図10】DVSA-CD3の軽鎖（上段）および重鎖（下段）の核酸配列を示す。下記実施例4で詳しく考察される。

50

【図11】DVSA-CD3の重鎖（上段）および軽鎖（中段）アミノ酸配列、ならびにDVSA-CD3の軽鎖（下段）を示す。下記実施例4で詳しく考察される。

【図12】トップ9抗CD3ヒットの重鎖および軽鎖のアラインメントを提供する。

【0027】

様々な図面中の類似（like）参照記号は類似エレメントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、キメラヒト抗体（ヒト構成要素をもつキメラ抗体）、組換え抗体、合成抗体などの抗体、それらをコードする核酸、ならびにこれらの免疫グロブリンを作製および使用する方法を提供する。本発明は、キメラ抗体および/または組換えもしくは合成抗体を含む、抗体を設計するための新規手法を提供する。本手法は、少なくとも部分的に、免疫グロブリン可変領域フレームワークサブ領域に対するコンセンサス配列の作製に基づくものであり、ここで各サブ領域に対するコンセンサス配列は他のサブ領域とは独立して得られる。

10

【0029】

一態様において、コンセンサス配列は生殖系列配列（と比較されて）から誘導され；従って、生殖系列で最も表現される配列を抗体設計で優先することができる。各フレームワークサブ領域に対する独立して選択されるコンセンサス配列のライブラリーによって、抗体のコンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例えば、（公知の抗原と特異的に結合する）公知の抗体のCDR域を保ちつつ、CDR域を、異なるフレームワークサブ領域組み合わせ中に再アSEMBルし、それにより同じCDR域を有し、しかし異なるフレームワーク配列を有する大きな抗体のコレクションを作製することができる。次いでこの抗体のコレクションを試験して、どのフレームワーク配列が、標的抗原に対する十分な結合アフィニティと結合活性を維持する一方、最小の免疫原性を与えるかを決定することができる。

20

【0030】

本発明は、キメラおよび/または組換え重鎖可変領域ポリペプチドを含む重鎖可変領域ポリペプチド、ならびに前記ポリペプチドをコードする（例えば、本発明のキメラ重鎖可変領域ポリペプチドをコードする）核酸から成る組成物およびライブラリーを提供する。本発明はまた、キメラおよび/または組換え軽鎖可変領域ポリペプチドの軽鎖可変領域ポリペプチド、ならびに前記ポリペプチドをコードする（例えば、キメラ軽鎖可変領域ポリペプチドをコードする）核酸の組成物およびライブラリーを提供する。キメラおよび/または組換え重鎖可変領域ポリペプチドを含む本発明の重鎖可変領域ポリペプチドは、二価免疫グロブリン（Ig）を作製するために、軽鎖可変領域ポリペプチド（例えば、本発明の軽鎖可変領域ポリペプチド）と結合していてもよい。

30

【0031】

本発明はまた、ICFを含む重鎖および軽鎖可変領域から作製された抗体組成物も提供する。代替の実施形態において、いずれかの公知の抗体（例えば、表5～6に示した例示の抗体）からのいずれかのCDRを、例えば表1～4に記載のICFと組み合わせるかまたは連結することができる。それだけでなく、これらをさらに、定常ドメイン（CD）（例えば、表7～8に示したもの）と組み合わせるかまたは連結して全長重鎖可変領域ポリペプチドまたは全長軽鎖可変領域ポリペプチドを作製することができる。ポリペプチドを組合わせて免疫グロブリンを作製すると、そのIgは、次の非限定の抗体例：1本鎖抗体、二価抗体（ジスルフィド連結抗体など）、Fabフラグメント、および1本鎖Fvに対する機能単位の役割を果たすことができる。

40

【0032】

さらに本発明は、ICFを含む重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸のコンビナトリアルライブラリーを作製する方法を提供する。本発明はまた、抗原に特異的かつ低下した免疫原性をもつ抗体を作製する方法も提供する。

【0033】

50

代わりの実施形態において、本発明の抗体（例えば、本発明のキメラおよび/または組換え抗体）は、限定されるものでなく、モノクローナル抗体、多特異的抗体、ヒト抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、1本鎖Fv(scFv)、1本鎖抗体、単ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab)フラグメント、ジスルフィド連結されたFv(sdFv)、抗イデオタイプ(抗Id)抗体、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを含みかつ包含する(を意味する)。代わりの実施形態において、本発明の抗体(例えば、本発明のキメラおよび/または組換え抗体)は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性フラグメント、すなわち、抗原結合部位を含有する分子を含む。抗体フラグメントはまた、限定されるものでないが、重鎖または軽鎖からの少なくとも1つのCDR3、CDR3を与えなかった免疫グロブリンからの少なくとも1つのCDR1またはCDR2、および少なくとも1つの、親分子(親抗体)のCDRの連鎖を近似する能力に基づいて重鎖または軽鎖から選択されるフレームワーク領域から成る小「抗体疑似体」であってもよい。免疫グロブリン分子はいずれの型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、クラス(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>およびIgA<sub>2</sub>)またはサブクラスであってもよい。

10

#### 【0034】

代わりの実施形態において、本発明の抗体(例えば、本発明のキメラおよび/または組換え抗体)は、例えば、2つの重鎖と2つの軽鎖を対で含む、生来の全長抗体の同等体を含んでもよい。代わりの実施形態において、本発明の抗体(例えば、本発明のキメラおよび/または組換え抗体)はサイズが約50kDの全長重鎖(長さがほぼ446アミノ酸)を含んでもよく;これは、一態様においては、重鎖可変領域遺伝子(ほぼ116アミノ酸)と定常領域遺伝子によりコードされてもよい。代わりの実施形態において、(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、およびμ配列などの異なるアイソタイプの重鎖定常領域をコードする異なる定常領域遺伝子が使用される。代わりの実施形態において、軽鎖可変領域遺伝子および定常領域遺伝子によりコードされた、サイズがほぼ25kD(長さがほぼ214アミノ酸)の全長軽鎖が使用される。軽鎖および/または重鎖の可変領域は、抗原との結合に参加し、そして定常領域は一般に抗体のエフェクター機能の役割を果たす。

20

#### 【0035】

代わりの実施形態において、本発明の抗体(例えば、本発明のキメラおよび/または組換え抗体)は、抗体鎖の重鎖および/または軽鎖の「可変領域」(抗体鎖のN末端成熟ドメインである)を含んでもよい。全てのドメイン、CDR、および残基番号は配列アラインメントと構造の知識に基づいて割り当てられる。代わりの実施形態において、本発明の抗体(例えば、本発明のキメラおよび/または組換え抗体)は、V<sub>H</sub>(抗体重鎖の可変ドメイン);またはV<sub>L</sub>(抗体軽鎖の可変ドメイン)を含んでもよく、そしてカッパ( )またはラムダ( )アイソタイプであってもよい。

30

#### 【0036】

代わりの実施形態において、本発明の抗体(例えば、本発明のキメラおよび/または組換え抗体)は免疫グロブリン軽鎖および/または重鎖可変領域を含んでもよく;一態様において、前記抗体は、3つまたは4つの分離された超可変領域(相補性決定域、またはCDRとも呼ばれる)を縁取りかつ包含するフレームワーク領域(FR)を含むかまたはから成ってもよい。代わりの実施形態において、FRとCDRの間の境界は常に定まったものではなく、特定の抗体および他の類似抗体と比較した可変性の程度と位置に依存しうる。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は一つの種内で比較的保存される。抗体のフレームワーク領域(すなわち、構成成分の軽鎖および重鎖の組合わせのフレームワーク領域)は、CDRを位置付けしかつアラインするのに役立つ。CDRは主に、抗原のエピトープと結合する役割を果たす。

40

#### 【0037】

代わりの実施形態において、Kabat系(公知であり広く使われるガイド)を用いて本発明のフレームワーク領域とCDRを同定する(Sequences of Proteins of Immunological Interest, E.Kabat et al., U.S.Department of Health and Human Services, (1987)および(1991)を参照されたい)。Kabatフレームワーク配列の同定は周知であり、従って

50

、日常利用されるプロトコルであり、例えば、米国特許第5,840,299号；米国特許出願第20050261480号を参照されたい。Kabatらは、抗体に対するアミノ酸配列を各サブクローンについて掲げ、そのサブクローンの各残基位置に対して最も普通に存在するアミノ酸を掲げている。Kabatらは、掲げた配列中の各アミノ酸に対して残基番号を割り当てる方法を用いており、この残基番号を割り当てる方法が当技術分野の標準になっている。Kabatらのスキームは、問題の抗体をKabatらのコンセンサス配列の1つとアラインメントすることにより、その要約に含まれていない他の抗体に拡張可能である。Kabatらの番号システムを用いることにより、異なる抗体内の対応位置のアミノ酸が容易に同定される。例えば、ヒト抗体のL50位置のアミノ酸はマウス抗体のアミノ酸位置L50と対応する位置を占める。

【0038】

当技術分野で使用される用語「CDR」は抗体可変配列内の相補性決定域を意味する。重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれに3つのCDRが存在し、これらは可変領域のそれぞれについてCDR1、CDR2およびCDR3と名付けられる。CDRは（類似配列の領域と比較して）大きい可変性を表すので、これらのCDRの正確な境界は、色々な系によって異なって定義することができる。広く使用されるKabatが記載したシステム（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)および(1991))は、抗体のいずれの可変領域にも応用できる残基番号システムを提供し、かつ3つのCDRを定義する残基境界を提供している。これらのCDRを「Kabat CDR」と呼ぶことにする。Chotiaらは、Kabat CDR内のある特定のサブ部分は、アミノ酸配列のレベルの多様性が大きいにも関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格コンフォメーションを採用

【0039】

用語「フレームワーク」、「フレームワーク領域」または「フレームワーク配列」は、可変領域からCDRを差し引いた残りの配列を意味する。CDR配列の正確な定義は、異なるシステムにより決定しうるので、フレームワーク配列の意味は対応して異なる解釈に従う。一実施形態においては、6つのCDR（軽鎖のCDR1、2、および3と重鎖のCDR1、2、および3）のフレームワーク領域内の位置を、効果的に、各鎖のフレームワーク領域を4つのサブ領域（FR1、FR2、FR3、およびFR4と名付けられる）に分割する。CDR1はFR1とFR2の間に；CDR2はFR2とFR3の間に；そしてCDR3はFR3とFR4の間に位置する。特別なサブ領域をFR1、FR2、FR3、またはFR4と規定することなく、他の場合のフレームワーク領域の意味は、単独の天然免疫グロブリン鎖の可変領域内に組合わされたサブ領域FR1、FR2、FR3、およびFR4を表す。代替の実施形態において、本発明のフレームワーク領域（FR）は、4つのサブ領域の1つからなる配列を含む、全フレームワーク配列の任意の部分を含むかまたはから成る（を表す）。代替の実施形態において、本発明のフレームワーク領域（FR）は、アミノ酸配列が生殖系列免疫グロブリン配列から誘導されることを特徴とする、Kabatフレームワーク領域（KF）ドメインから誘導されるアミノ酸を含むかまたはから成る。

【0040】

一実施形態において、免疫グロブリン配列に関する用語「生殖系列配列」は、特別な免疫グロブリンを発現する遺伝子再配列および体細胞超変異に導く成熟プロセスをまだ経ていない（免疫グロブリンコード配列を含有する）ゲノム配列を意味する（例えば、Shapiro et al., (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al., (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30を参照されたい）。「生殖系列」は、配偶子を生じかつ多世代を通して継続する一列の細胞を含みうる。

【0041】

一実施形態において、例えば、成熟免疫グロブリン、成熟(Ab)配列および/または成熟(Ab)型などに関する用語「成熟」は、任意の非生殖系列免疫グロブリン配列；例えば、任意のV領域が再配列された任意のアイソタイプの任意の再配列されたまたは改変された生

10

20

30

40

50

殖系列配列を含んでもよく、アフィニティ成熟した配列（例えば、*in vivo*または*in vitro*でのアフィニティ成熟プロセス後の）を含む。

【0042】

一実施形態において、用語「コンセンサス配列」は、一式の関係タンパク質（例えば、任意の特定のサブクラスの免疫グロブリン、例えば または などの軽鎖、またはアイソタイプ）またはサブユニット構造中のそれぞれの所在場所において、より高頻度に存在するアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を含むかまたはから成る（ことを意味する）。コンセンサス配列は、ある特別な種のまたは多数の種の免疫グロブリンに基づいてもよい。代替りの実施形態において、「より高頻度に」は、一式の関係タンパク質、例えば、任意の特別なサブクラス（例えば、 または などの軽鎖、またはアイソタイプ）またはサブユニット構造の免疫グロブリン中のそれぞれの残基所在場所（位置）において、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%、より高頻度に存在するアミノ酸残基を意味する。

10

【0043】

用語「誘導体」は他の分子から形成することができる分子を意味する。ヌクレオチド（例えば、核酸配列）またはタンパク質系薬剤（例えばタンパク質、ポリペプチド、ペプチドなど；例えば、抗体）の関係では、誘導体は本来の核酸配列（生殖系列配列などの）を含む薬剤、または本来の供給源から得られたかまたはアミノ酸残基置換、欠失および/または付加の導入により改変されたアミノ酸配列を含むタンパク質系薬剤を意味する。かかる薬剤の誘導体は、それが誘導された元の薬剤と類似のまたは同一の配列を保持する。

20

【0044】

本明細書で使用する「プレースホルダー」は、公知の免疫グロブリンのKabatフレームワーク領域1、2、および3、およびCDR1、2、および3を含む免疫グロブリン可変領域（例えば、軽鎖可変領域）をコードする核酸配列である。プレースホルダーは、プロセッシングされた成熟抗体の配列同一性と比較した生殖系列可変領域核酸の配列同一性に基づいて決定される（例えば、成熟抗体の核酸配列に最も類似した軽鎖可変領域生殖系列の配列）。プレースホルダーがいったん同定されると、次いで、例えば、本発明の重鎖可変領域分子と結合した一時的1本鎖分子として使用し、第2鎖と結合した重鎖の機能的特性を評価することができる。一実施形態において、プレースホルダーは軽鎖可変領域（例えば、鎖または鎖）である。

30

【0045】

本明細書で使用する「Kabatフレームワーク領域」（KF）は、免疫グロブリンのアミノ酸残基を番号付けするためのおよびFRおよびCDRの位置を割り当てるための標準Kabatスキームに対応する可変鎖フレームワーク領域（サブ領域）である（Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242）。例えば、このスキームに従えば、次のKabat番号を用いて可変重鎖フレームワークサブ領域を認識することができる：Kabatフレームワーク領域1（FR1に対応しうるKF1）は残基1～ほぼ残基29を含み；Kabatフレームワーク領域2（FR2に対応しうるKF2）はほぼ残基36～ほぼ残基49を含み；Kabatフレームワーク領域3（FR3に対応しうるKF3）はほぼ残基66～ほぼ残基94を含み；およびKabatフレームワーク領域4（FR4に対応しうるKF4）はほぼ残基103～ほぼ残基113を含む。

40

【0046】

さらに、このスキームに従えば、代替りの実施形態において、次のKabat番号を用いて可変軽鎖フレームワークサブ領域を認識することができる：Kabatフレームワーク領域1（FR1に対応しうるKF1）は残基1～ほぼ残基23を含み；Kabatフレームワーク領域2（FR2に対応しうるKF2）はほぼ残基35～ほぼ残基49を含み；Kabatフレームワーク領域3はほぼ残基57～ほぼ残基88（FR3に対応しうるKF3）を含み；およびKabatフレームワーク領域4はほぼ

50

残基96～ほぼ残基109（FR4に対応しうるKF4）を含む。

【0047】

本明細書で使用する「独立コンセンサスフレームワーク」（ICF）は、例えば、（1）生殖系列VまたはJ遺伝子、（2）再配列されたVDJ遺伝子、（3）再配列されたVJ遺伝子、および（4）公知の免疫グロブリンのアミノ酸配列（および/または同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列）、から得たコンセンサス配列であるアミノ酸または核酸コード配列を有するフレームワーク領域（例えば、FR1、FR2、FR3、FR4、それ故にKF1、KF2、KF3、またはKF4に対応しうる）を意味する。遺伝コードの縮重の故に、多数の機能的に同一の核酸がいずれかの所与のポリペプチドをコードする。例えば、コドンCGU、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGは全てアミノ酸アルギニンをコードする。従って、アルギニンがあるコドンにより規定された全ての位置で、そのコドンを、コードされたポリペプチドを変えることなく、記載した対応するコドンのいずれかに変更することができる。かかる核酸変異は「サイレント変異」である。当業者は、核酸配列中の各コドン（通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUGを除く）を改変して標準技法により機能的に同一の分子を取得できることを認識しうる。

10

【0048】

一実施形態において、それぞれのICFは可変領域中の他のICFから独立して選択されるコンセンサス配列を含む。換言すれば、一態様において、ICFコンセンサス配列は、他のフレームワークサブ領域から独立するある特定のフレームワークサブ領域を分析することから得られる（別々のフレームワークサブ領域を独立して分析することによるのではなく、全フレームワーク領域を調査することによりフレームワークコンセンサス配列を分析する方法とは対照的である）。独立選択は、可変鎖フレームワーク領域の少なくともある部分をコードする複数の生殖系列核酸配列から得たICF生殖系列核酸配列のプールをアラインするステップと、続いて、配列類似性によって配列のクラスターを形成し、各フレームワーククラスターからの配列を次に用いてコンセンサス配列を形成するステップを必要としうる。翻訳すると、コンセンサス配列は各残基位置に存在する最も高頻度のアミノ酸配列を示す。ドメインはICF1、ICF2、ICF3、またはICF4でありうる。可変フレームワーク領域アミノ酸残基は標準Kabat番号システムに対応しうる。ICF配列は、ICFドメインを決定するために使用される本来の生殖系列配列と同一でありうる。コンセンサス配列はまた、核酸コンセンサス配列中のヌクレオチド変化がなお同じアミノ酸配列をコードしうる、任意のゆらぎ（wobble）部位変化も含む。例えば、ヒトに対するコンセンサス配列を、ヒト生殖系列配列に基づいて決定することができる。次の非限定の例、例えば、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、家禽、ヤギ、サケ、およびハイブリドーマ細胞株に対するコンセンサス配列も、適当な生殖系列配列を利用して決定することができる。

20

30

【0049】

免疫グロブリン構造

免疫グロブリン（Ig）は抗体として機能する分子であって、抗原に応答して（すなわち、感染または免疫化を介して）形質細胞により産生される。免疫グロブリンは1つまたは少数の密接に関係する抗原と特異的に結合することができる。免疫グロブリンの主な機能は抗原と結合し、最終的に動物の保護をもたらしうる様々なエフェクター機能に介在することである。Igは、重鎖の定常領域におけるアミノ酸配列の差異に基づいて、5つの異なるクラス、例えば、ガンマ（ $\gamma$ ）重鎖（IgG）、ミュー（ $\mu$ ）重鎖（IgM）、アルファ（ $\alpha$ ）重鎖（IgA）、デルタ重鎖（IgD）、およびイプシロン（ $\epsilon$ ）重鎖（IgE）に分類される。所与のクラス内の全てのIgは類似した重鎖定常領域を有しうる。Igクラスはさらに、重鎖定常領域のアミノ酸配列の小差に基づいてサブクラスに分類することができる。サブクラス内のIgは、その差異が血清学的手法により検出される、類似した重鎖定常領域アミノ酸配列を有しうる。例えば、IgGサブクラスはIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含み、ここで重鎖はアミノ酸の差異によって、1-重鎖、2-重鎖という具合に分類される。他の例として、IgAサブクラスはIgA1およびIgA2を含み、ここで重鎖はアミノ酸の差異によって、1重鎖または2重鎖として分類される。

40

50

## 【0050】

免疫グロブリンはまた、軽鎖または重鎖などの軽鎖も含む。軽鎖型の区別は、軽鎖の定常領域におけるアミノ酸配列の差異に基づき、これは血清学的手法によっても検出することができる。軽鎖も、軽鎖の定常領域のアミノ酸配列中の差異に基づいて、サブタイプに分離することができる。例えば、サブタイプは 1、 1、 3、 および 4として分類される。

## 【0051】

免疫グロブリンは、異なる重鎖のクラスおよびサブクラスから構成されるので、不均質な分子の集団を含む。それぞれの重鎖は引き続いて、異なる軽鎖のタイプおよびサブタイプと結合しうる。その結果、異なる免疫グロブリン分子は、異なる $V_H$ と $V_L$ 領域による異なる抗原結合特性を有しうる。一般に、免疫グロブリンはその基本ユニットとして4本の鎖構造を含む。全長Igは、共有結合で連結された2本の重鎖（ほぼ50~70kD）および2本の軽鎖（それぞれほぼ23kD、または鎖など）を含む。それぞれの軽鎖も重鎖の1つと共有結合で連結されている。例えば、2本の重鎖および重鎖と軽鎖は鎖間ジスルフィド結合によりおよび非共有結合的相互作用により一緒に保持されている。鎖間ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリン分子の間で変化しうる。それぞれの鎖はN末端可変ドメイン（それぞれ長さでほぼ110アミノ酸である $V_H$ または $V_L$ ）およびC末端において1以上の定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメイン（長さでほぼ110アミノ酸である $C_L$ ）は重鎖の第1定常ドメイン（長さでほぼ330~440アミノ酸である $C_H$ ）と整列してジスルフィドで結合されている。軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。Ig重鎖は2個以上のさらなる $C_H$ ドメイン（ $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ など）を含みうる。例えば、ヒンジ領域を $C_{H1}$ と $C_{H2}$ 定常ドメインの間に同定することができる。ヒンジ領域は抗体分子にアームがY形状を形成する領域であり、この分子にいくらかの柔軟性を与える。

## 【0052】

以上考察しかつ規定したように、重鎖と軽鎖の可変ドメインはフレームワーク領域（FR）、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域、および鎖間ジスルフィド結合を含む（例えば、Chothia et al., (1985) J. Mol. Biol. 186 : 651-663 ; Novotny and Haber, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 4592-4596 ; Padlar et al., (1986) Mol. Immunol., 23(9) : 951-960 ; および S. Miller, J. (1990) Mol. Biol, 216 : 965-973を参照されたい）。

## 【0053】

Igの重鎖および軽鎖の可変領域は、フレームワーク領域内の類似性と差異に基づいて、グループおよびサブグループに分類することができる。この可変性は異なる可変領域遺伝子（V、D、およびJ遺伝子など）の産物の結果である。

## 【0054】

VDJ組換え、生殖系列配列、および免疫グロブリン多様性

Ig分子の重鎖および軽鎖可変領域はVセグメント（可変遺伝子セグメント）とJセグメント（接合遺伝子セグメント）を含む。V遺伝子はV-セグメントをコードし、J-セグメントはJ遺伝子がコードする領域を意味する。さらに、重鎖可変領域はD遺伝子がコードするDセグメント（多様性遺伝子セグメント）を含む。重鎖および軽鎖可変領域のVセグメントはFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、および数個のCDR3のアミノ酸から構成される。軽鎖可変領域のJセグメントは、残りのCDR3とFR4の全てを含む。重鎖可変領域においては、Jセグメントは一部分のCD3とFR4の全てを含み、ここでDセグメントはCD3の残りの部分を含む。例えば、軽鎖可変領域を作製するために、B細胞分化中に、軽鎖可変領域遺伝子の再配列の結果として、JセグメントがVセグメントに加えられる。重鎖の場合、重鎖可変領域を作製するために、JセグメントだけでなくDセグメントがVセグメントに加えられる。

## 【0055】

免疫グロブリン多様性は、コンビナトリアルアセンブリー（例えば、V(D)J組換え）、接合アセンブリー、軽鎖カップリング（例えば、と軽鎖の異なる組み合わせを利用できるが、全ての重鎖対がとと等しくうまくではない）、および体細胞超変異などの様々



なプロセスの結果である。

【 0 0 5 6 】

複数の生殖系列遺伝子のコンビナトリアルアセンブリーは可変領域のコーディングと様々な体細胞イベントに関わる。V(D)J組換えは発生中のB細胞において構成要素V、D、およびJ遺伝子セグメントからIg遺伝子のアセンブルする。体細胞イベントは、可変(V)遺伝子セグメントの多様性(D)および接合(J)遺伝子セグメントとの無作為組換えによって、重鎖可変領域の完全なV<sub>H</sub>域、すなわちV(D)Jドメインを作製することを含む。簡単に説明すると、最初の組換えイベントは、発生中のB細胞の重鎖遺伝子座の1つのD遺伝子セグメントと1つのJ遺伝子セグメントとの間で起こる。これらの2つの遺伝子の間のDNAが欠失される。このD-J組換えイベントに次いで、新しく形成されるDJ複合体の上流の領域からの1個のV遺伝子が接合して、再配列したVDJ遺伝子の形成をもたらされる。新しいVDJ遺伝子のVとDセグメントの間の他の遺伝子がここで欠失される。免疫グロブリン軽鎖遺伝子座のカッパ( )とラムダ( )鎖は、軽鎖がDセグメントを欠くことを除くと、重鎖可変領域と同様に組み換わり、このイベントも可変(V)および接合(J)遺伝子セグメントの無作為組換えを必然的に伴い、軽鎖可変領域の完全なV<sub>L</sub>域、すなわちVJドメインを作製することができる。

10

【 0 0 5 7 】

接合多様性も組換えプロセス中に達成されるIg多様性に寄与する。D遺伝子セグメントがJ遺伝子セグメントと接続され、かつ次いでV遺伝子セグメントがDJ域と接続される場合、このプロセス自身が不正確であり、V(D)Jドメインの接合部において様々なアミノ酸をコードするヌクレオチドを喪失または付加しうる。多様性の作製に関わるこれらの機構が発生中のB細胞において起こった後に、抗原曝露が行われる。

20

【 0 0 5 8 】

抗原刺激の後に、B細胞に発現されたIg遺伝子は体細胞変異または超変異を受け(Maizels (2005) Ann. Rev. Genet. 39: 23-46を参照)、これがさらにIg可変性に寄与する。抗原と遭遇後の活性化に続いて、成熟B細胞は、点突然変異を免疫グロブリン遺伝子の可変領域中に導入することができ(アフィニティ成熟とも呼ばれる);これが特異化したリンパ様構造(胚中心)を生じる。いくつかの突然変異はIgが抗原に対してより高いアフィニティを有する原因となりうる。抗原と強く結合する抗体が選択されて増殖される、何故なら、それらは抗原と弱く結合する抗体より高頻度で刺激されるからである。

30

【 0 0 5 9 】

以上記載したIg多様性を作製する機構だけでなく、発現された免疫グロブリンをコードする配列から全体にまたは部分的に誘導されたヌクレオチドの遺伝的に多様なコレクションを利用することができる。例えば、それに応答して再配列が起こる*in vitro*刺激により、前記配列を細胞株から作製することができる。あるいは、ヌクレオチド合成、無作為化突然変異誘発、および米国特許第5,565,332号に開示された方法などの他の方法を用いて、例えば、再配列されてないVセグメントをDおよびJセグメントと組み合わせることにより、配列の一部または全てを得ることができる。ほぼ $1.6 \times 10^7$ 通りの異なる抗体を、推定される数の生殖系列遺伝子セグメント(重鎖および軽鎖可変領域のV、D、およびJセグメントなどの)、セグメントの無作為組換え、および重鎖および軽鎖可変領域の無作為対合(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)に基づいて産生することができる(Fundamental Immunology (3rd ed), ed. Paul, Raven Press, New York, N. Y., 1993; Immunobiology: the immune system in health and disease, 4th ed., Janeway et al., Elsevier Science/Garland Publishing, York, N. Y., 1999)。抗体多様性(体細胞超変異など)に寄与するその他のプロセスを考慮すれば、ほぼ $10^{10}$ 通りの異なるIgを作製することができる(Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1995; Immunology, 3rd ed., Kuby, J., W.H. Freeman and Co., New York, NY., 1997)。

40

【 0 0 6 0 】

ポリペプチド

本発明は組換え重鎖可変領域ポリペプチドの組成物、ならびに該重鎖可変領域ポリペプ

50

チドをコードする核酸を提供する。本発明はまた、組換え軽鎖可変領域ポリペプチド、ならびに該軽鎖可変領域ポリペプチドをコードする核酸の組成物も提供する。免疫グロブリンを作製するために、組換え重鎖可変領域ポリペプチドを軽鎖可変領域ポリペプチドとカップリングしてもよい。本発明の方法に有用である核酸組成物ならびに核酸配列、すなわち、少なくとも部分的に個々の軽鎖または重鎖可変領域ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸組成物ならびに核酸配列は、天然、合成またはそれらの組合せであってもよい。これらはmRNA、DNAまたはcDNAであってもよい。本発明のいくつかの実施形態においては、核酸が抗体をコードする。さらなる実施形態においては、核酸が1本鎖抗体、二価抗体、Fabフラグメント、または1本鎖Fvをコードする。

【0061】

一実施形態においては、組換え重鎖可変領域を作製するための独立コンセンサスフレームワーク(ICF)をコードするアミノ酸配列が提供される(表1を参照)。他の実施形態においては、組換え重鎖可変領域ポリペプチドを作製するためのICFに対応するアミノ酸配列をコードする核酸が提供される(表2)。他の実施形態においては、組換え軽鎖可変領域を作製するための独立コンセンサスフレームワークをコードするアミノ酸配列が提供される(表3を参照)。なおさらなる実施形態においては、組換え軽鎖可変領域ポリペプチドを作製するためのICFに対応するアミノ酸配列をコードする核酸が提供される(表4)。ICF(例えば、ICF1、ICF2、ICF3、またはICF4)はコンセンサス配列である配列をコードするアミノ酸または核酸を含むKabatフレームワーク(KF)領域(すなわち、KF1、KF2、KF3、またはKF4)であって、例えば、(1)生殖系列VもしくはJ遺伝子、(2)再配列されたVDJ遺伝子、(3)再配列されたVJ遺伝子、または(4)公知のIgのアミノ酸配列(および/または、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列)から得た前記KF領域であってもよい。

【0062】

表1 可変重鎖( $V_H$ ) ICFに対するアミノ酸配列の例：

10

20

【表 1】

## 重鎖 IFC1:

識別番号	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
GL1_8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	1
GL2	QVQLVESGGGVVQFGRSLRLSCAAS	2
GL3	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVS	3
GL4	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFS	4
GL5	QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCTVS	5
GL6	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	6
GL7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	7
GL1a	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	186
GL2a	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFS	187
GL4a	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	188
GL6a	QVQLQSGPGLVKPSQTLTLTCAIS	189
GL7a	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKAS	181
GL2b	QVQLVQSGGGVVQFGRSLRLSCAAS	199

10

20

## 重鎖 IFC2:

		SEQ ID NO:
GL1_7_8	WVRQAPGKGLEWVS	8
GL2_3	WVRQAPGKGLEWVG	9
GL4	WVRQAPGQGLEWVG	10
GL5	WVRQAPGKGLEWVG	11
GL 6	WIRQPPGKGLEWIG	12
GL2a	WIRQPPGKALEWLG	190
GL5a	WVRQMPGKGLEWVG	191
GL6a	WIRQSPSRGLEWLG	192

30

【 0 0 6 3 】

## 重鎖 IFC3:

		SEQ ID NO:
GL1	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	13
GL2	RFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKR	14
GL3	RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR	15
GL4	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	16
GL5	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATVYYCAR	17
GL6	RFVFSLDTSVSTAYLQMSSLKAEDTAVYYCAR	18
GL7	RVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	19
GL8	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	20
GL1a	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD	180
GL1b	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	193
GL1c	RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	194
GL2a	RFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK	182
GL3a	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKD	195
GL3b	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	196
GL5a	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATVYYCARI	183
GL6a	RFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR	197
GL6b	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR	198
GL7a	HVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	184
GL8a	RVTMTRDTSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	185

10

20

30

## 重鎖 IFC4:

		SEQ ID NO:
GL1	VTVSSASTKGPS	21
	VTVSASTKGPS	206
	WGQGTVTVSASTKGPS	207

40

【 0 0 6 4 】

表2 可変重鎖 ( $V_H$ ) ICFに対する核酸配列の例

## 【表 2】

## 重鎖 IFC1:

		SEQ ID NO:
GL1	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCT	22
GL2	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG AGACTCTCCTGTGCAGCCTCT	23
GL3	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTG TCCCTCACCTGCGCTGTCTCT	24
GL4	CAGGTACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGCGCTGGTGAACCCACACAGACCCTC ACACTGACCTGCACCTTCTCT	25
GL5	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTG TCCCTCACCTGCACTGTCTCT	26
GL6	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTG AAGATCTCCTGTAAGGGTCTCT	27
GL7	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCGGTG AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT	28

10

20

## 重鎖 IFC2:

		SEQ ID NO:
GL1_7_8	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA	29
GL2_3	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTAGAGTGGGTGGCA	30
GL4	TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC	31
GL5	TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA	32
GL6	TGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGA	33

30

【 0 0 6 5 】

## 重鎖 IFC3:

		SEQ ID NO:
GL1	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA	34
GL2	CGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAAACCTCCCTGTATCTGCAAATGAAC AGTCTGAGAACTGAGGACACCGCCTTGTATTACTGTGCAAGA	35
GL3	AGGTTACCATCTCCAGAGATGATTCAAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACTAGA	36
GL4	CGAGTTACCATATCAGTAGACACGCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC TCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	37
GL5	AGGCTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACC AACATGGACCCTGTGGACACAGCCACGTATTACTGTGCACGG	38
GL6	CGATTGTCTTCTCCCTCGACACGCTCTGTGACGACGGCCTATCTTCAGATGTCT AGCCTAAAGGCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGCGA	39
GL7	CGCGTCACCATCTCAGCTGACAAGTCCATCAGCACTGCCTACCTGCAGTGGAGC AGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGA	40
GL8	AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA	41

10

20

## 重鎖 IFC4:

		SEQ ID NO:
GL1	GTCACCGTCTCCTCCGCCCTCCACCAAGGGCCCATCG	42

30

【 0 0 6 6 】

表3 可変軽鎖 (V またはV ) ICFのアミノ酸配列の例

【表 3】

ICF1 カップ	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
VK1_2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	43
VK3	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC	44
VK4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	45
VK5	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	46
VK6	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	47
VK7	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	48
VK8	DIVMTQSPPLSLPVTPEGEPASISC	49
VK1_2a	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITC	200
VK4a or VK5a	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC	201
VK7a	DIQMTQSPDFLAVSLGERATINC	202
VKa	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITC	203
	DIVMTQTPLSLPVTPEGEPASISC	261
	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	262
	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC	263
	ETTTLTQSPAFAFMSATPGDKVNISC	264
	AIRMTQSPFSLASVGDRTITC	265
	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITC	266
	NIQMTQSPSAMSASVGDRTITC	267
	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISC	268
	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC	269
	DVVMTQSPAFLSVTPGKVTITC	270
	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTITC	271
	AIRMTQSPSFSASTGDRVTITC	272
ICF1 ラムダ	アミノ酸配列	
VL1	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTITC	50
VL2	QSVLTQPPSASGTPGQRTITC	51
VL3	QSALTQPASVSGSPGQSITITC	52
VL4	QSALTQPRSVSGSPGQSVTITC	53
VL5	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC	54
VL6	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC	55
VL7	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC	56
VL8	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC	57

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

ICF2 カップ	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
VK1_2_3	WYQQKPGKAPKLLIY	58
VK4_5_6	WYQQKPGQAPRLLIY	59
VK7	WYQQKPGQPPKLLIY	60
VK8	WYLQKPGQSPQLLIY	61
VK4_5_6a	WYQQKPCQAPRLLIY	204
	WFQQKPGKAPKSLIY	273
	WYQQKPAKAPKLF IY	274
	WYLQKPGQPPQLLIY	275
	WYQQKPGKAPELLIY	276
	WYQQKPGKVPKLLIY	277
	WYQQKPEKAPKSLIY	278
	WFQQRPGQSPRRLIY	279
	WYQQKPDQSPKLLIK	280
	WFQQKPGKVPKHLLIY	281
	WYQQKPGKAPKRLIY	282
	WLQQRPGQPPRLLIY	283
	WYQQKPGEAALFIQ	284

10

20

ICF2 ラムダ	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
VL1_2	WYQQLPGTAPKLLIY	62
VL3_4	WYQQHPGKAPKLM IY	63
VL5_6	WYQQKPGQAPV LVIY	64
VL7	WYQQKPGQSPV LVIY	65
VL8	WHQQQPEKGP RYLMY	66

30

【 0 0 6 8 】



ICF3 カップ	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	67
VK2	GVPSRFSGSGSGTDFFTTISLQPEDIATYYC	68
VK3	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQDDFATYYC	69
VK4	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	70
VK5	GIPARFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYC	71
VK6	GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC	72
VK7	GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDEVAVYYC	73
VK8	GVPDRFSGSGSGTDFLKISRVEAEDVGVYYC	74
	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQSEDFATYYC	253
	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC	254
	GIPARFSGSGPGTDFLTISLQPEDFAVYYC	255
	GVPSRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYC	256
	GIPARFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYC	257
	GVPSRFSGSGSGTDFFTTISLQAEEDAATYYC	258
	GIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFC	259
	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYC	260

10

20

【 0 0 6 9 】

表4 可変軽鎖ICFに対する核酸配列の例

【表4】

ICF1 カッパ	核酸配列	SEQ ID NO:
VK1_2	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG ACAGAGTCACCATCACTTGC	85
VK3	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAG ACAGAGTCACCATCACTTGC	86
VK4	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGC	87
VK5	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGC	88
VK6	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG AAAGAGCCACCCTCTCCTGC	89
VK7	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGGC AGAGGGCCACCATCAACTGC	90
VK8	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAG AGCCGGCCTCCATCTCCTGC	91

10

20

ICF1 ラムダ	核酸配列	SEQ ID NO:
VL1	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCCGCCCCAGGACAGA AGGTCACCATCTCCTGC	92
VL2	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGA GGGTCACCATCTCTTGT	93
VL3	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGT CGATCACCATCTCCTGC	94
VL4	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGICCGGGTCTCCTGGACAGT CAGTCACCATCTCCTGC	95
VL5	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTGAGTGGCCCCAGGAAAGA CGGCCAGGATTACCTGT	96
VL6	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGA CAGTCAGGATCACATGC	97
VL7	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGA CAGCCAGCATCACCTGC	98

30

40

【0070】

ICF2 カップ	核酸配列	SEQ ID NO:
VK1_2_3	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTAT	100
VK4_5_6	TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT	101
VK7	TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTAC	102
VK8	TGGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT	103

ICF2 ラムダ	核酸配列	
VL1_2	TGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATCTAT	104
VL3_4	TGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATTTAT	105
VL5_6	TGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCATCTAT	106
VL7	TGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTAT	107

10

ICF3 カップ	核酸配列	SEQ ID NO:
VK1	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGT	109
VK2	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTACTTT TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGT	110
VK3	GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGC	111
VK4	GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGT	112
VK5	GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGT	113
VK6	GGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTC TCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAGTGTATTACTGT	114
VK7	GGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGT	115
VK8	GGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACAC TGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGT	116

20

30

【 0 0 7 1 】

ICF3 ラムダ	核酸配列	SEQ ID NO:
VL1	GGGATTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCC TGGGCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGC	117
VL2	GGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCC TGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGT	118
VL3	GGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCC TGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGC	119
VL4	GGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCC TGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGC	120
VL5	GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACGGCCACCC TGACCATCAGCAGGGTCTGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGT	121
VL6	GGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCTCT TGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGT	122
VL7	GGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACAGCCACTC TGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGT	123

10

20

ICF4 カップ	核酸配列	SEQ ID NO:
VK1	TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA	125

ICF4 ラムダ	核酸配列	SEQ ID NO:
VL1	TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	126

30

## 【 0 0 7 2 】

表1~4に掲げた配列に加えて、本発明で使用できる他のICFを図24、32、33、34、38、39に、および実施例3および4に開示したアセンブルされたHuFR配列に提供する（着色されたまたは下線を引いてない配列）。

## 【 0 0 7 3 】

例えば、それぞれのICFは、独立して選択されたコンセンサス配列を含み、ここで独立した選択は、少なくとも可変鎖Kabatフレームワーク領域のある部分をコードする複数の生殖系列核酸配列から得たICF生殖系列核酸配列のプールをアラインし、次いで配列類似性に従って配列のクラスターを形成することに関わりうる。例えば、各フレームワーククラスターからの配列をその際に用いて重鎖可変領域に対するコンセンサス配列を確立する。非限定の例として、全ての生殖系列ヒトV<sub>H</sub>エキソンの配列を集めて、それぞれのエキソン配列を、Kabatが記載したフレームワークサブ領域、FR1、2、3および4中に分割してもよい（上記参照）。

40

## 【 0 0 7 4 】

次いで、全フレームワーク（フレームワークサブ領域1~4を含む）の配列よりむしろ、FRサブ領域配列の1セット（例えば、Kabat FR1配列のプール）をアラインして配列類似性によりクラスターを形成する。次に、各FRサブ領域クラスター（例えば、FR1、FR2、FR3、またはFR4）からの配列を用いて、全フレームワーク領域とは独立に誘導された、各配列位置に存在する最も高頻度のアミノ酸を含むコンセンサス配列（例えばICF1、ICF2、IC

50

F3、およびICF4)を作製することができる(表1および2を参照)。このコンセンサス配列作製法をV<sub>L</sub>エキソンについても行い、各フレームワークサブ領域内のコンセンサス配列を同定することができる(表3~4;実施例1~2も参照)。例えば、重鎖可変領域をアSEMBルするために使われるICF配列は、合計336通りの重鎖可変領域組合せをもたらす(すなわち、7個のICF1配列 x 6個のICF2配列 x 8個のICF3配列 x 1個のICF4配列)。ICF配列を用いて軽鎖可変領域(例えば軽鎖)をアSEMBルする他の例では、合計224通りの軽鎖可変領域組合せが可能である(すなわち、7個のICF1配列 x 4個のICF2配列 x 8個のICF3配列 x 1個のICF4配列)。重鎖および軽鎖可変領域組合せの両方がお互いに関係している場合、合計75,264通りの重鎖-軽鎖複合体(例えば、ヒト様免疫グロブリン分子より多い)を作製することができる。

10

**【0075】**

一実施形態において、重鎖可変領域ICF1核酸配列は配列番号22、23、24、25、26、27、または28のいずれかを含む。他の実施形態において、重鎖可変領域ICF2核酸配列は配列番号29、30、31、32、または33を含む。さらなる実施形態において、重鎖可変領域ICF3核酸配列は配列番号34、35、36、37、38、39、40、または41を含む。本発明のさらに他の実施形態において、重鎖可変領域ICF4核酸配列は配列番号42である。

**【0076】**

他の例では、各フレームワーククラスターからの配列を用いて、軽鎖可変領域のコンセンサス配列を確立することもできる。一実施形態において、軽鎖可変領域ICF1核酸配列は配列番号85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、または98を含む。他の実施形態において、軽鎖可変領域ICF2核酸配列は配列番号100、101、102、103、104、105、106、または107を含む。さらなる実施形態において、軽鎖可変領域ICF3核酸配列は配列番号109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、または123を含む。本発明のさらに他の実施形態において、軽鎖可変領域ICF4核酸配列は配列番号125または126である。

20

**【0077】**

各フレームワーククラスターからのアミノ酸配列を用いて、重鎖可変領域のコンセンサス配列を確立することもできる。一実施形態において、重鎖可変領域ICF1アミノ酸配列は配列番号1~7、186、187、188、189、181、199のいずれかを含む。他の実施形態において、重鎖可変領域ICF2アミノ酸配列は配列番号8~12または190~192のいずれかを含む。さらなる実施形態において、重鎖可変領域ICF3アミノ酸配列は配列番号13~20、180、182~185、または193~198を含む。本発明のさらに他の実施形態において、重鎖可変領域ICF4アミノ酸配列は配列番号21、206、または207を含む。

30

**【0078】**

さらに、各フレームワーククラスターからのアミノ酸配列を用いて、軽鎖可変領域のコンセンサス配列を確立することもできる。一実施形態において、軽鎖可変領域ICF1アミノ酸配列は配列番号43~57または200~204のいずれかを含む。他の実施形態において、軽鎖可変領域ICF2アミノ酸配列は配列番号58、59、60、61、62、63、64、65、66、または204を含む。さらなる実施形態において、軽鎖可変領域ICF3アミノ酸配列は配列番号67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、または82を含む。本発明のさらに他の実施形態において、軽鎖可変領域ICF4アミノ酸配列は配列番号83または84である。

40

**【0079】**

翻訳されると、ICF1、ICF2、ICF3またはICF4コンセンサス配列は、各残基位置で最も高頻度のアミノ酸配列を示す。ICF配列はICFドメインを決定するために使用した本来の生殖系列配列と同一であってもよい。一実施形態において、重鎖可変領域を含むICF配列は生殖系列Kabatフレームワーク領域(KFR)と少なくとも80%同一である。他の実施形態において、ICF配列は生殖系列KFRと少なくとも85%、90%、93%、95%、99%、または100%同一である。

**【0080】**

本発明の軽鎖可変領域ポリペプチドのICF配列はまた、ICFドメインを決定するために使

50

用した本来の生殖系列配列と同一であってもよい。他の実施形態において、軽鎖可変領域を含むICF配列は生殖系列KFRと少なくとも70%同一である。他の実施形態において、ICF配列は生殖系列KFRと少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、93%、95%、99%、または100%同一である。

【0081】

翻訳されると、ICF1、ICF2、ICF3、またはICF4コンセンサス配列は、各残基位置で最も高頻度のアミノ酸配列を示す。一実施形態において、重鎖可変領域を含むICF配列は成熟抗体KFRと少なくとも80%、85%、90%、93%、95%、99%、または100%同一である。

【0082】

本発明の軽鎖可変領域ポリペプチドのICF配列はまた、ICFドメインを決定するために使用した本来の成熟抗体配列と同一であってもよい。一実施形態において、軽鎖可変領域を含むICF配列は成熟抗体KFRと少なくとも50%同一である。他の実施形態においては、軽鎖可変領域を含むICF配列は成熟抗体KFRと少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、93%、95%、99%、または100%同一である。

【0083】

可変フレームワーク領域アミノ酸残基は、前記標準Kabat番号システムと対応しうる。Kabat番号システムは、本発明のICFアミノ酸配列と対応しうる。例えば、重鎖可変領域のICF1は、Kabatフレームワーク(KF)1のほぼ25残基を含みうる。一実施形態において、重鎖可変領域のICFは、KF1の少なくとも20、25、または少なくとも29連続残基を含む。

【0084】

一実施形態において、重鎖可変領域のICF2は、KF2のほぼ14残基を含みうる。一実施形態において、重鎖可変領域のICF2は、KF2の少なくとも10、12、または14連続残基を含む。

【0085】

重鎖可変領域のICF3は、KF3のほぼ32残基を含みうる。一実施形態において、重鎖可変領域のICF3は、KF3の少なくとも25、30、または32連続残基を含む。

【0086】

重鎖可変領域のICF4は、KF4のほぼ12残基を含みうる。一実施形態において、重鎖可変領域のICF4は、KF4の少なくとも8、10、12連続残基を含む。

【0087】

Kabat番号システムはまた、本発明の軽鎖可変領域ポリペプチドのICFアミノ酸配列にも対応しうる。例えば、軽鎖ICF1(例えば、V またはV )可変領域のICF1はKabatフレームワーク(KF)1のほぼ22残基を含みうる。一実施形態において、軽鎖可変領域のICF1はKF1の少なくとも15、20、または23連続残基を含む。

【0088】

軽鎖可変領域のICF2はKF2のほぼ15残基を含んでもよい。一実施形態において、軽鎖可変領域のICF2はKF2の少なくとも10連続残基を含む。他の実施形態において、ICF2はKF2の少なくとも12連続残基を含む。さらなる実施形態において、ICF2はKF2の少なくとも14連続残基を含む。

【0089】

軽鎖可変領域のICF3は、KF3のほぼ32残基を含みうる。一実施形態において、軽鎖可変領域のICF3はKF3の少なくとも25、30、または32連続残基を含む。

【0090】

軽鎖可変領域のICF4は、KF4のほぼ10残基を含みうる。一実施形態において、軽鎖可変領域のICF4はKF4の少なくとも8、10、13連続残基を含む。

【0091】

ICF核酸コンセンサス配列は、ヌクレオチドが変化してもなお同じアミノ酸配列をコードしうる、核酸コンセンサス配列の任意のゆらぎ(wobble)部位変化を含みうる。遺伝コードの縮重の故に、多数の機能的に同一の核酸がいずれかの所与のポリペプチドをコードする。例えば、コドンCGU、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGは全てアミノ酸アルギニンを

10

20

30

40

50

コードする。従って、コードによりアルギニンが規定された全ての位置で、そのコドン、コードされたポリペプチドを変えることなく、記載されたコドンに対応する任意のコドンに変更できる。

【0092】

ある特定の実施形態において、重鎖可変領域ICF1をコードする核酸配列は、配列番号22、23、24、25、26、27、または28と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。他の実施形態においては、重鎖可変領域ICF2をコードする核酸配列は、配列番号29、30、31、32、または33と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態において、重鎖可変領域ICF3をコードする核酸配列は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、または41と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。なおさらなる実施形態において、重鎖可変領域ICF4をコードする核酸配列は、配列番号42と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。

10

【0093】

他の実施形態において、軽鎖可変領域ICF1をコードする核酸配列は、配列番号85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、または98と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。ある特定の実施形態において、軽鎖可変領域ICF2をコードする核酸配列は、配列番号100、101、102、103、104、105、106、または107と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態において、軽鎖可変領域ICF3をコードする核酸配列は、配列番号109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、または123と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。なお他の実施形態において、軽鎖可変領域ICF4をコードする核酸配列は、配列番号125または126と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。

20

【0094】

保存アミノ酸変化は、類似した側鎖変化を有するアミノ酸残基の互換可能性を意味する。例えば、塩基性側鎖を有するアミノ酸のグループはリシン、アルギニン、およびヒスチジンであり；脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸のグループはセリンおよびトレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸のグループはアスパラギンおよびグルタミンであり；脂肪族側鎖を有するアミノ酸のグループはグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸のグループはチロシン、フェニルアラニン、およびトリプトファンであり；そして硫黄含有側鎖を有するアミノ酸のグループはシステインおよびメチオニンである。

30

【0095】

ある特定の実施形態において、重鎖可変領域ICF1をコードするアミノ酸配列は配列番号1、2、3、4、5、6、または7と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。ある特定の実施形態において、重鎖可変領域ICF2をコードするアミノ酸配列は配列番号8、9、10、11、または12と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。ある特定の実施形態において、重鎖可変領域ICF3をコードするアミノ酸配列は配列番号13、14、15、16、17、18、19、または20と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。ある特定の実施形態において、重鎖可変領域ICF4をコードするアミノ酸配列は配列番号21と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。

40

【0096】

他の実施形態において、軽鎖可変領域ICF1をコードするアミノ酸配列は配列番号43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、または57と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。ある特定の実施形態において、軽鎖可変領域ICF2をコードするアミノ酸配列は配列番号58、59、60、61、62、63、64、65、または66と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%

50

同一である。いくつかの実施形態において、軽鎖可変領域ICF3をコードするアミノ酸配列は配列番号67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、または82と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。さらに他の実施形態において、軽鎖可変領域ICF4をコードするアミノ酸配列は配列番号83または84と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。

#### 【0097】

ヒトに対するICF核酸またはアミノ酸コンセンサス配列（例えば、ICF1、ICF2、ICF3、またはICF4に対応するもの）を、ヒト生殖系列配列または成熟（すなわち、再配列された）抗体配列に基づいて決定することができる。イヌ、ネコ、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、家禽、ヤギ、サケ、およびハイブリドーマ細胞株などの、非限定の例に対するICF核酸またはアミノ酸コンセンサス配列も、適当な生殖系列配列を利用して決定することができる。

10

#### 【0098】

本発明は、上記の重鎖および軽鎖可変領域から作製された抗体組成物を提供する。本発明によれば、公知の抗体からの任意のCDR（例えば、表5～6に示したものを）を表1～4のICFのようなICFと組み合わせることができる。それだけでなく、それらをさらに定常ドメイン（CD）（例えば、表7～8に示したものを）と組合わせて、全長重鎖可変領域ポリペプチドまたは全長軽鎖可変領域ポリペプチドを作製することができる。これらのポリペプチドを次に組合わせて、Igを作製することができて、ここでIgは次の非限定の抗体例：1本鎖抗体、二価抗体（ジスルフィド連結された抗体など）、Fabフラグメント、および1本鎖Fvに対する機能ユニットとして作用しうる。

20

#### 【0099】

免疫グロブリンフラグメントは、タンパク質分解性の消化により作製することができて、免疫グロブリンの構造/機能の関係を解明するのに非常に有用であることが証明されている。Igフラグメントは、抗原-結合部位を形成するために、重鎖および軽鎖可変領域の組合わせを含みうる。抗体フラグメントは、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、Fd、およびFd'フラグメントを含む。

#### 【0100】

例えば、Fabフラグメントは、パパインによる消化により作製することができて、この場合、酵素は免疫グロブリン分子をヒンジ域において重鎖-重鎖間ジスルフィド結合の前で切断する。その結果、軽鎖と重鎖のV<sub>H</sub>とC<sub>H1</sub>ドメインおよびさらに抗体の抗原結合部位を含む2つの同一なフラグメントが形成される。本来の分子は二価であったが、各フラグメントは一価である。例えば、Fcフラグメントを、パパインでの消化により作製することもできる。酵素はそれぞれC<sub>H2</sub>とC<sub>H3</sub>ドメインを含む2つの残りの重鎖を有するフラグメントを産生することができる。

30

#### 【0101】

免疫グロブリンをペプシンで処理すると、重鎖-重鎖間ジスルフィド結合の後で重鎖が切断され、両方の抗原結合部位を含むフラグメントが得られる。ペプシン消化により作製されるこの二価フラグメントはF(ab')<sub>2</sub>と呼ばれる。分子のFc域はペプシンにより小さいペプチドに消化される。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントはその抗原と結合できるが、一般に抗体のエフェクター機能に介在しない。

40

#### 【0102】

##### 組成物

本発明の各化合物（例えば、本明細書に記載の化合物）は、許容される担体または賦形剤と組み合わせると、組成物（例えば、医薬組成物）として利用することができる。これらの本発明の組成物（例えば、医薬組成物）はin vitroまたはin vivo分析用に、または、被験体を治療するための、被験体（例えば、ヒト）へのin vivoまたはex vivo投与用に有用でありうる。

#### 【0103】

50



従って、本発明の医薬組成物は、活性成分だけでなく、製薬上許容される賦形剤、担体、バッファー、安定剤または当業者に周知の他の物質を含みうる。一態様において、これらの物質は無毒であり、活性成分の効力を妨害しない。担体または他の物質の正確な性質は製剤または投与経路に依存しうる。

【0104】

本発明のタンパク質、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメント（例えば、本明細書に記載の方法により同定された）を含む本発明の医薬品製剤は、例えば、所望の程度の純度を有するタンパク質を任意の生理学的に許容される賦形剤または安定剤（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 最新版、または第16版、Osol, A. Ed. (1980)を参照）と例えば、凍結乾燥した製剤または水溶液の剤形で混合することにより、貯蔵用に調製することができる。代替の実施形態において、許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用する用量および濃度でレシピエント（例えば、ヒト患者）にとって無毒なものであり、それらには、リン酸、クエン酸および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンズアルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（ほぼ10残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む他の糖類；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および/またはTWEEN(登録商標)、PLURONICS(登録商標)またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン界面活性剤が含まれうる。

10

20

【0105】

代替の実施形態において、許容される担体は投与した個体（例えば、ヒト患者）に対して生理学的に許容され、かつ投与による/における化合物の治療特性を保持する。許容される担体とその製剤は、一般に、例えば、Remington' pharmaceutical Sciencesの最新刊（第18版、A. Gennaro編、Mack Publishing Co., Easton, PA 1990も参照されたい）に記載されている。一態様において、例示の担体は生理食塩水である。

30

【0106】

本発明を実施するために使用する「製薬上許容される担体」は、製薬上許容される物質、組成物またはビヒクル、例えば、器官、または身体の一部の投与部位から他の器官、身体の一部への対象化合物の運搬または輸送に関わる、またはex vivoもしくはin vitroアッセイシステムに関わる、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒またはカプセル化材料を含んでもよい。代替の実施形態において、各担体は製剤の他成分と共存してかつ投与する個体に対して無害であるという意味で許容される。代替の実施形態において、許容される担体は対象化合物の比活性を変えることはない。

40

【0107】

本発明の医薬組成物または医薬品製剤は、被験者で医薬用に使用するのに好適な組成物を含む。本発明の医薬組成物および製剤は、ある量の本発明の化合物と製薬上または生理学的に許容される担体を含みうる。

【0108】

本発明の組成物（例えば、医薬組成物または医薬品製剤）は特定の投与経路（すなわち、全身または局所）に適合しうるように製剤化することができる。従って、本発明の組成物は様々な経路による投与に好適な担体、希釈剤、または賦形剤を含みうる。

【0109】

他の実施形態において、組成物はさらに、所要であれば、組成物中の化合物の安全性を改善しおよび/または組成物の放出速度を制御するための、許容される添加剤を含んでも

50

よい。許容される添加剤は対象化合物の比活性を変えない。例示の許容される添加剤としては、限定されるものでないが、糖、例えばマンニトール、ソルビトール、グルコース、キシリトール、トレハロース、ソルボース、スクロース、ガラクトース、デキストラン、ブドウ糖、フルクトース、ラクトースおよびそれらの混合物が挙げられる。許容される添加剤を、許容される担体および/または賦形剤、例えばブドウ糖と組み合わせることができる。あるいは、例示の許容される添加剤としては、限定されるものでないが、ペプチドの安定性を増加しかつ溶液のゲル化を低下させる界面活性剤、例えばポリソルベート20またはポリソルベート80が挙げられる。界面活性剤を組成物に、溶液の0.01%~5%の量だけ加えることができる。かかる許容される添加剤を加えると、貯蔵時に組成物の安定性と半減期を増加する。

10

#### 【0110】

本発明の医薬組成物は例えば、注入により投与することができる。代替の実施形態において、注入のための組成物としては、水溶液（水溶性の場合）または懸濁液および無菌の注入可能な溶液もしくは懸濁液を用事調製するための無菌粉末が挙げられる。静脈内投与用の代替の実施形態において、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、CREMOPHOREL(登録商標)(BASF, Parsippany, NJ.)またはリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)が挙げられる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散培地であってもよい。流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には所要の粒子径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。

20

#### 【0111】

抗細菌薬および抗真菌薬としては、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸およびチメロサルが挙げられる。等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、および塩化ナトリウムを組成物中に含ませることができる。得られる溶液をその用途に応じて包装するか、または凍結乾燥し；凍結乾燥した調製物をその後、投与前に無菌溶液と組み合わせる。

#### 【0112】

静脈内に注入、または患部に注入するために、活性成分は、発熱物質を含まずかつ好適なpH、等張性および安定性を有する、非経口用に許容される水溶液の剤形であってもよい。本発明の組成物は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸リンゲル注射液のように、等張性ビヒクルを使用する好適な溶液も含みうる(当業者は巧く調製することができる)。保存剤、安定剤、バッファー、酸化防止剤および/または他の添加剤も必要により含む。無菌注入溶液は、適当な溶媒中の所要量の活性成分を、前記の1つのまたは組み合わせた成分に組み込むことにより、必要であれば、次いで濾過滅菌することにより調製することができる。一態様において、分散液は、活性成分を基礎分散培地および先に記載した所要の他成分を含有する無菌ビヒクル中に組み込むことにより調製する。無菌注入溶液調製用の無菌粉末の場合、代替の調製方法は真空乾燥および凍結乾燥であり、この場合、活性成分と予め無菌濾過した溶液からの任意のさらなる所望成分を含む粉末が得られる。

30

40

#### 【0113】

組成物は通常、例えば、単位用量の注入などにより、静脈内に投与することができる。注入するために、活性成分は、発熱物質を実質的に含まずかつ好適なpH、等張性および安定性を有する、非経口用に許容される水溶液の剤形でありうる。例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸リンゲル注射液などの等張ビヒクルを用いて、好適な溶液を調製することができる。保存剤、安定剤、バッファー、酸化防止剤および/または他の添加剤を、必要により、含んでもよい。さらに組成物をエーロゾル化して投与してもよい。(Lahn et al., Aerosolized Anti-T-cell-Receptor Antibodies Are Effective against Airway Inflammation and Hyperreactivity, Int. Arch. Allergy Immune, 134: 49-55 (2004))。

50

## 【0114】

一実施形態は、本明細書に記載の組成物の、本明細書に記載の症状、疾患または障害を治療する医薬品を作るための使用を意図する。医薬品を、治療を必要とする患者/被験体の身体的特徴に基づいて製剤してもよく、また、症状、疾患または障害の段階に基づいて単一製剤または複数製剤に製剤してもよい。医薬品を、病院および診療所へ配布するために適当な標識による好適な包装を施してもよく、この場合、標識は本明細書に記載の疾患を有する被験体の治療の適応症である。

## 【0115】

## 治療

一態様において、本発明のポリペプチドはB細胞前駆体および成熟B細胞の膜貫通表面抗原であるCD20と特異的に結合することができて、これは結合後に内部化されることも細胞表面から剥がれることもない。CD20はまた、広範囲の疾患に関わるB細胞の大部分に発現される。本発明の抗体または抗原結合フラグメントを利用して、腫瘍化障害、例えば、CD20発現腫瘍細胞の存在を特徴とする障害、例えば、B細胞リンパ腫、例えば、NHLを患う被験体を治療することができる。

10

## 【0116】

代替の態様において、本発明の組成物および本発明の方法は疾患または症状を「抑制」、「改善」、「処置」および/または「治療」するために利用され、これらの用語は互換可能な意味で使用することができ、例えば、症候群の静止、生存の延長、症候群の部分的または全面的改善、ならびに症状、疾患または障害の部分的または全面的根絶を意味しうる。本発明の抗体または抗原結合フラグメントを用いてB細胞介在性疾患を治療することができる。一態様において、本発明の「治療」は免疫反応の抑制または抑止を含みうる。本発明の抗体または抗原結合フラグメントを用いてB細胞介在性免疫反応を抑制または抑止することができる。本発明の抗体または抗原結合フラグメントを、癌性細胞、増殖、腫瘍の静止、部分的または全体的排除を含む癌の治療に用いることができる。代替の態様において、治療または部分的排除は、例えば、細胞、増殖または腫瘍サイズおよび/または体積の倍数低減、例えば、ほぼ2倍、ほぼ3倍、ほぼ4倍、ほぼ5倍、ほぼ10倍、ほぼ20倍、ほぼ50倍、またはそれらの間の任意の倍数低減を含む。代替の態様において、治療または部分的排除は、細胞、増殖または腫瘍サイズおよび/または体積のほぼ1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% またはそれらの間の任意のパーセント低減を含みうる。

20

30

## 【0117】

本発明の組成物または方法を用いて治療および/または防止しうる腫瘍化疾患の例としては、B細胞リンパ腫、例えば、NHL（前駆体B細胞リンパ芽球白血病/リンパ腫および成熟B細胞新生物を含む）、例えばB細胞慢性リンパ性白血病（CLL）/小リンパ性リンパ腫（SLL）、B細胞前リンパ性白血病、リンパ形質細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）、濾胞性リンパ腫（FL）（低度、中度および高度のFLを含む）、皮膚濾胞中心リンパ腫（cutaneous follicle center lymphoma）、辺縁帯B細胞リンパ腫（MALT型、結節型および脾型）、有毛細胞白血病、びまん性大B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞性骨髄腫、移植後リンパ球増殖障害、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、および未分化の大細胞リンパ腫（ALCL）が挙げられる。

40

## 【0118】

本発明の組成物または方法を用いて治療および/または防止しうるB細胞非ホジキンリンパ腫のさらなる例は、リンパ腫様肉芽腫症、原発性体腔内浸出液リンパ腫、血管内大B細胞リンパ腫、縦隔大B細胞リンパ腫、重鎖病（ガンマ、ミュー、およびアルファ病を含む）、免疫抑制剤による治療により誘導されるリンパ腫、例えばシクロスポリン誘導性リンパ腫、およびメトトレキセート誘導性リンパ腫である。

## 【0119】

CD20発現B細胞に関わる免疫障害であって、本発明の組成物または方法を用いて治療および/または予防しうる免疫障害の例としては、自己免疫性障害、例えば乾癬、乾癬性関

50

節炎、皮膚炎、全身強皮症および硬化症、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、潰瘍性大腸炎、呼吸困難症候、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、糸球体腎炎、湿疹、喘息、アテローム性動脈硬化症、白血球接着不全、多発性硬化症、レイノー症候群、シェーグレン症候群、若年発症糖尿病、ライター病、ベーチェット病、免疫複合腎炎、IgA腎障害、IgM多発神経障害、免疫介在性血小板減少症、例えば急性特発性血小板減少性紫斑病および慢性特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、重症筋無力症、狼蒼腎炎、全身性紅斑性狼瘡、慢性関節リウマチ（RA）、アトピー性皮膚炎、天疱瘡、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、ヴェーグナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性感染性単核球症、HIV、およびヘルペスウイルス関連疾患が挙げられる。さらなる例は、重症急性呼吸困難症候および脈絡網膜炎である。

10

【0120】

代わりの態様において、本発明の組成物または方法を用いて治療および/または防止しうる他の疾患および障害としては、B細胞のウイルス、例えばエプスタイン・バーウイルス（EBV）による感染により引き起こされるかまたは媒介される疾患および障害が挙げられる。

【0121】

表5 掲げた抗体の可変重鎖（V<sub>H</sub>）と可変軽鎖（V<sub>L</sub> またはV<sub>H</sub>）のCDRフラグメントに対する例示の核酸配列

【表5】

20

VH CDR 核酸配列		SEQ ID NO:
<b>CD20 IgG</b>		
1	GGCTACACATTTACCCAGTTACAATATGCAC	127
2	GCTATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGC	128
3	TCGCACTACGGTAGTAACCTACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTG	129
<b>CD3 IgG</b>		
1	GGCTACACCTTTACTAGGIACACGATGCAC	133
2	TACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGC	134
3	IATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTAC	135
<b>LC CDR 核酸配列</b>		
<b>CD20 IgG</b>		
1	AGGGCCAGCTCAAGTTTAAGTTTCATGCAC	139
2	GCCACATCCAACCTGGCTTCT	140
3	CATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCAG	141
<b>CD3 IgG</b>		
1	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAAC	145
2	GACACATCCAACCTGGCTTCT	146
3	CAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACAG	147

30

40

【0122】

表6 掲げた抗体の可変重鎖（V<sub>H</sub>）と可変軽鎖（V<sub>L</sub> またはV<sub>H</sub>）のCDRフラグメントに対する例示のアミノ酸配列

【表 6】

		SEQ
		ID
		NO:
<b>VH CDR アミノ酸配列</b>		
<b>CD20 IgG</b>		
1	GYTFTSYNMH	151
2	AIYPGNGDTSYNQKFKG	152
3	SHYGSNYVDYFDYWGQGL	153
<b>CD3 IgG</b>		
1	GYTFTRYTMH	157
2	YINPSRGTNYNPKFKD	158
3	YYDDHYCLDY	159
<b>LC CDR アミノ酸配列</b>		
<b>CD20 IgG</b>		
1	RASSLSFMH	163
2	ATSNLAS	164
3	HQWSSNPLT	165
<b>CD3 IgG</b>		
1	SASSSVSYMN	169
2	DTSKLAS	170
3	QQWSSNFFT	171

10

20

【 0 1 2 3 】

表7 Ig重鎖と 軽鎖の例示の定常ドメイン (CD) のアミノ酸配列

【表7】

HC CD アミノ酸配列		SEQ ID NO:	
	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	175	10
anti- CD20	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK	208	
κ CD アミノ酸配列			
	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTY	176	20
anti- CD20	IVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSEFVTKSFNRGEC	209	

【0124】

表8 Ig重鎖と 軽鎖の例示の定常ドメイン (CD) の核酸配列

【表 8】

HC CD 核酸配列	SEQ ID NO:
<pre> GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTGACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGTAAATGA </pre>	<p>178</p> <p>10</p> <p>20</p>
κ CD 核酸配列	
<pre> CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC </pre>	<p>179</p> <p>30</p>

【 0 1 2 5 】

表5~8に掲げた配列だけでなく、他のCDR（下線部）と定常領域（二重下線部または黄色強調部）を図24、32、33、34、36、38、39、42において、および実施例3~6に開示した本来のおよびアセンブルしたHuFR配列において提供した。

【 0 1 2 6 】

例示の抗体

代わりの実施形態において、本発明の組成物、例えば、本発明のキメラおよび/または組換え抗体は、B細胞の表面上に発現されてB細胞マーカーの役割を果たす非グリコシル化リンタンパク質であるCD20と特異的に結合する。CD20は膜貫通カルシウムコンダクタンスのレギュレーターとして作用し、またB細胞活性化と増殖にある役割を果たすと言われる。本発明の一態様においては、よりヒト様の可変領域を含有しかつ真核細胞（例えば、B細胞）の表面タンパク質を指向する抗体を作製することができる。一実施形態においては、抗CD20抗体のCDRを含有する本発明の組換え重鎖可変領域ポリペプチドと組換え軽鎖可変領域ポリペプチドを用いて、特徴がよりヒトらしい可変領域をもつ抗体を形成する。例えば、その抗体はCD20抗原と結合する。一実施形態において、その抗体の軽鎖可変領域は、配列番号43、44、45、46、47、38、または49のアミノ酸配列を含むICF1；配列番号163のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号58、59、60、または61のアミノ酸配列を含むICF2；

10

20

30

40

50

配列番号164のアミノ酸配列を含むCDR2；配列番号67～71、73、または74のアミノ酸配列を含むICF3；配列番号165のアミノ酸配列を含むCDR3；配列番号83のアミノ酸配列を含むICF4を含む。他の実施形態において、その抗体の重鎖可変領域は、配列番号6または7のアミノ酸配列を含むICF1；配列番号151のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号9、10、または11のアミノ酸配列を含むICF2；配列番号152のアミノ酸配列を含むCDR2；配列番号13、17、19、または20のアミノ酸配列を含むICF3；配列番号153のアミノ酸配列を含むCDR3；配列番号21のアミノ酸配列を含むICF4を含む。

#### 【0127】

CD3はT細胞受容体複合体の構成要素である。CD3はT細胞に特異的な表面マーカーであり、従ってT細胞を特異的に同定するために使用することができる。本発明によって、真核細胞（例えば、T細胞）の表面タンパク質を指向する、よりヒト様の可変領域を含有する抗体を作製することができる。一実施形態において、抗CD3抗体のCDRを含有する本発明の組換え重鎖可変領域ポリペプチドと組換え軽鎖可変領域ポリペプチドを使用して、特徴がよりヒトらしい可変領域をもつ抗体を形成する。例えば、その抗体はCD3抗原と結合する。一実施形態において、その抗体の軽鎖可変領域は、配列番号43～46、または49のアミノ酸配列を含むICF1；配列番号169のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号58、59、または60のアミノ酸配列を含むICF2；配列番号170のアミノ酸配列を含むCDR2；配列番号68～69、72、73、または74のアミノ酸配列を含むICF3；配列番号171のアミノ酸配列を含むCDR3；および配列番号83のアミノ酸配列を含むICF4を含む。さらなる実施形態において、その抗体の重鎖可変領域は、配列番号3、7、または181のアミノ酸配列を含むICF1；配列番号157のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号9または11のアミノ酸配列を含むICF2；配列番号158のアミノ酸配列を含むCDR2；配列番号15、16、または17のアミノ酸配列を含むICF3；配列番号159のアミノ酸配列を含むCDR3；配列番号21のアミノ酸配列を含むICF4を含む。

#### 【0128】

##### 核酸

一実施形態において、独立コンセンサ重鎖可変領域ドメインICF1、2、および3をコードする本発明の核酸配列が、公知の免疫グロブリン重鎖可変領域（抗CD20、抗CD3などの）に加えて提供される。他の実施形態において、独立コンセンサ軽鎖可変領域ドメインICF1、2、および3をコードする本発明の核酸配列が、公知の免疫グロブリン軽鎖可変領域（抗CD20、抗CD3などの）に加えて提供される。さらなる実施形態において、独立コンセンサ重鎖および軽鎖可変領域ドメインICF4をコードする核酸配列がさらに提供される。例えば、本発明の重鎖可変領域ICF1、2、3、および4ドメインおよび軽鎖可変領域ICF1、2、3、および4ドメインは、表2および4に掲げた配列番号を有する。公知の免疫グロブリン重鎖可変領域のCDR1、2、および3に対応する核酸配列は表5に見出される。

#### 【0129】

以上から提供される重鎖または軽鎖可変領域ICFドメインおよびCDRをコードする核酸を5'から3'の方向へ融合して、単一核酸分子の異種集団を作製する核酸を形成する。一実施形態においては、重鎖可変領域ICFドメインとCDRをコードする核酸を5'から3'の方向へ次の順に融合する：ICF1をコードする核酸；CDR1をコードする核酸；ICF2をコードする核酸；CDR2をコードする核酸；ICF3をコードする核酸；CDR3をコードする核酸。他の実施形態においては、軽鎖可変領域ICFドメインおよびCDRをコードする核酸を5'から3'の方向へ次の順に融合する：ICF1をコードする核酸；CDR1をコードする核酸；ICF2をコードする核酸；CDR2をコードする核酸；ICF3をコードする核酸；CDR3をコードする核酸。さらなる実施形態においては、重鎖および軽鎖可変領域ドメインICF4をコードする核酸を5'から3'の方向へ重鎖または軽鎖CDR3のC末端に融合する。例えば、本発明の重鎖可変領域ICF1、2、3、および4ドメインおよび軽鎖可変領域ICF1、2、3、および4ドメインは表2および4に掲げた配列番号を有する。公知の免疫グロブリン重鎖可変領域のCDR1、2、および3に対応する核酸配列は表5に見出される。

#### 【0130】

HuFRにより得たIg鎖はさらに、米国特許第6,171,820号、第6,537,776号、第6,562,594



号、第6,605,449号、および第6,764,835号に記載の遺伝子部位飽和突然変異誘発（GSSM(登録商標)）または合成ライゲーション再アセンブリー（SLRまたはGeneReassembly(登録商標)）の進化方法を用いて、所望の特性に改変することができる。

#### 【0131】

##### ベクター

重鎖または軽鎖可変領域分子が作製されると、次いでこれをプラスミド中にクローニングし、かつ細胞中に形質転換して、重鎖または軽鎖可変領域ポリペプチドを発現させることができる。一実施形態においては、重鎖または軽鎖可変領域ポリペプチド遺伝子を担持するプラスミドを大腸菌内で増幅し、哺乳動物の細胞中にトランスフェクトして全長免疫グロブリンを産生する。

#### 【0132】

培養に好適な細胞は、導入されたプラスミドなどの発現ベクター（構築物）を保持することができる。発現ベクター構築物は、トランスフェクション、リポフェクション、形質転換、注入、エレクトロポレーション、または感染により導入することができる。発現ベクターは、培養過程で発現し、かつ生産するタンパク質をコードするコード配列、またはその部分を含有することができる。かかる発現ベクターは、挿入されたコード配列を転写し、かつ翻訳する所要の構成要素を含むことができる。産生されるタンパク質およびポリペプチド、ならびに適当な転写および翻訳制御エレメントをコードする配列を含有する発現ベクターは、当技術分野で周知の、かつ当業者が手慣れた方法を用いて作製することができる。これらの方法としては *in vitro* 組換えDNA技法、合成の技法、および *in vivo* 遺伝子組換えが挙げられ、これらの技法は、J. Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. and in F. M. Ausubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y. に記載されている。利用する方法およびツールのタイプのさらに詳細な説明を以下に記載する。

#### 【0133】

標準分子生物学プロトコルにより得られるクローンを哺乳動物細胞などの好適な宿主細胞中にトランスフェクトして、所望の産物を発現させることができる。トランスフェクション技法は、利用する宿主細胞にとって適当な当技術分野で確立された標準技法を用いて実施する。例えば、哺乳動物の細胞トランスフェクションは、リポフェクション、プロトプラスト融合、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、CaPO<sub>4</sub>共沈降、エレクトロポレーション、直接マイクロインジェクション、ならびに当技術分野で公知の他の方法（搔爬、直接取り込み、浸透圧またはスクロースショック、リゾチーム融合または赤血球融合、赤血球介在技法などの間接マイクロインジェクション、および/または宿主細胞に電流をかける方法を含みうる）を用いて実施してもよい。

#### 【0134】

##### 発現

目的のタンパク質（例えば、重鎖または軽鎖可変領域ポリペプチド、Igなどの糖タンパク質）をコードするDNAの、多細胞生物由来の真核生物（例えば、起源が哺乳動物）宿主細胞における発現を、本発明の関係で利用することができる（*Tissue Cultures*, (1973) Academic Press, Cruz and Patterson, Eds.）。多細胞生物由来の宿主細胞はイントロンをスプライシングできるので、ゲノムDNAフラグメントを発現するのに直接利用することができる。目的のタンパク質を保持し、発現し、かつ分泌することができる有用な宿主細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、例えばCHO-K1（ATCC CCL-61）、DG44（Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet*, 12:555-556; Kolkekar et al., 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909; およびWO 01/92337 A2）、ジヒドロ葉酸レダクターゼネガティブCHO細胞（CHO/dhfr<sup>-</sup>、Urlaub and Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 77:4216）、およびdp12.CHO細胞（米国特許第5,721,121号）；SV40により形質転換したサル腎CV1細胞（COS細胞、COS-7、ATCC CRL-1651）；ヒト胎児腎細胞（例えば、293細胞、または懸濁液培養で増殖のためにサブクローニングした293細胞、Graham et al.,

10

20

30

40

50

1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59) ; 幼児ハムスター腎細胞 (BHK、ATCC CCL-10) ; サル腎細胞 (CV1、ATCC CCL-70) ; アフリカグリーンモンキー腎細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587 ; VERO、ATCC CCL-81) ; マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251) ; ヒト頸部癌細胞 (HELA、ATCC CCL-2) ; イヌ腎細胞 (MDCK、ATCC CCL-34) ; ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL-75) ; ヒト肝細胞腫細胞 (HEP-G2、HB 8065) ; マウス乳癌細胞 (MMT 060562、ATCC CCL-51) ; パッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL-1442) ; TRI細胞 (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68) ; MCR 5細胞 ; FS4細胞が挙げられる。

#### 【 0 1 3 5 】

哺乳動物細胞などの真核細胞用の発現ベクターは、当技術分野でよく確立された哺乳動物細胞と共存しうるプロモーターおよび制御配列を含みうる。いくつかの調節エレメントは、例えば、様々な発現ベクター中に見出されるCMVプロモーターまたは鳥類肉腫ウイルス (ASV) プロモーターであってもよい。他の通常使用される初期および後期プロモーターとしては、サルウイルス40 (SV40) (Fiers, et al., (1973) *Nature* 273:113)、またはウシパピローマ、ポリオーマ、およびアデノウイルス2ウイルス由来のプロモーターのような他のウイルスのプロモーターが挙げられる。当技術分野で公知のなかではとりわけ、調節可能なプロモーター、hMTII (Karin, et al., 1982, *Nature* 299:797-802) を使用することもできる。培養昆虫細胞 (例えば、SF9細胞) における組換えタンパク質発現に利用しうるいくつかのパキウウイルスベクターとしては、pVLシリーズ (Lucklow, V. A., and Summers, M. D., 1989, *Virology* 170:31-39) とpAcシリーズ (Smith et al., 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) が挙げられる。当業者はエンハンサー領域 (非DNAコーディング領域においてプロモーター領域の上流または下流に見出される配列) も発現を改善するために重要であることを理解している。例えば、もしプラスミドDNAを導入するために原核生物宿主を利用するのであれば、必要な場合、ウイルス源から得た複製起点を使用してもよい。

#### 【 0 1 3 6 】

##### 宿主細胞

代替の実施形態において、目的のタンパク質 (例えば、本発明のポリペプチド、例えば、Igなどの糖タンパク質を含む、本発明の重鎖または軽鎖可変領域ポリペプチド) を発現する宿主として、哺乳動物宿主細胞だけでなく、他の真核生物を利用することもできる。代替の実施形態において、出芽酵母サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の研究室菌株、ならびに分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) などの他の酵母菌株を利用することもできる。目的のタンパク質 (例えば、本発明のポリペプチド) をコードするDNAを保持する酵母ベクターは2 $\mu$ 複製起点 (Broach et al., (1983) *Meth. Enz.* 101:307)、または酵母に適合しうる他の複製起点 (例えば、Stinchcomb et al., 1979, *Nature* 282:39 ; Tschempe et al., 1980, *Gene* 10:157 ; およびClarke et al., 1983, *Meth. Enz.* 101:300) を利用することができる。酵母ベクター内に含有される調節エレメントは解糖酵素の合成用プロモーターであってもよい (Hess et al., 1968, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149 ; Holland et al., 1978, *Biochemistry* 17:4900)。当業者は、増殖条件により調節可能な遺伝子の転写を調節できる他のプロモーターを利用することもできる。哺乳動物発現系と同様に、コード配列の3'末端の酵母発現ベクター中のターミネーター配列が望ましく、酵母由来の遺伝子のオープンリーディングフレーム後の3'非翻訳領域内に見出される。本発明の組換えタンパク質、例えば本発明の重鎖または軽鎖可変領域ポリペプチド、Igなどの糖タンパク質はまた、昆虫細胞 (例えば、パキウウイルスベクターを用いて) で発現させることもできる。

#### 【 0 1 3 7 】

培養する宿主細胞については、様々な培養パラメーターを用いることができる。哺乳動物細胞に対する適当な培養条件は当技術分野で周知であるか (Cleveland et al., (1983) *J. Immunol. Methods*, 56: 221-234)、または当業者が決定できる (例えば、*Animal Cell Culture: A Practical Approach* 2nd Ed., (1992) Rickwood, D. and Hames, B. D.,

eds. (Oxford University Press: New York,)を参照) のであって、選択される特定の宿主細胞によって変化する。市販の培地を利用してよく、それらの培地には、例えば、最小必須培地 (MEM、Sigma、St. Louis、Mo.) ; ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Sigma) ; ハムF10培地 (Sigma) ; ハイクロン細胞培養培地 (HyClone、Logan、Utah) ; RPMI-1640培地 (Sigma) ; および、特定の細胞型向けに処方された化学規定 (CD) 培地、例えば、CD-CHO培地 (Invitrogen、Carlsbad、Calif.) が挙げられる。これらの培地はいずれも、必要であれば、必要なまたは所望の適当な濃度または量の任意の構成要素を含む、従来規定された補充構成要素または成分を補充することができる。

#### 【0138】

糖タンパク質、免疫グロブリンを含む目的のタンパク質 (例えば、本発明のポリペプチド) は、所望のタンパク質産物を発現する細胞を様々な細胞培養条件下で増殖することにより生産することができる。当業者は、タンパク質生産のための細胞培養および培養方法は、3つの一般的な形式: 連続培養、回分培養、および供給回分培養を含みうることを理解している。一態様である連続培養プロセスにおいては、新しい培地補充 (例えば、供給培地) を培養期間中、細胞に補充する一方、古い培地を取り出す。連続培養中に生産される産物も、例えば、毎日または連続的に収穫することができる。細胞が生存しかつ環境および培養条件を維持する限り、連続培養プロセスを所望する間、細胞は培養中に残存しうる。

#### 【0139】

目的のタンパク質 (例えば、本発明のポリペプチド) を生産する培養細胞は、特定の哺乳動物宿主細胞および特定の意図する生産計画に最も好適である任意のスキームまたは手順に従って増殖させることができる。細胞培養の増殖期の哺乳動物宿主細胞の集団の拡大または増殖を、かかる拡大と増殖を最大化する期間に、増強するように細胞培養条件を開発してもよい。また細胞培養の生産期の間、ある期間、タンパク質生産を増強するように細胞培養条件を開発してもよい。培養哺乳動物宿主細胞で使用しうる温度、pH、溶存酸素 ( $DO_2$ ) などの培養条件は当業者が理解している。CHO細胞などの培養哺乳動物宿主細胞に対する適当な温度範囲は30~40 であり、一実施形態においてはほぼ37 である。pHは一般に酸または塩基を用いてほぼ6.5~7.5のレベルに調節される。適当な $DO_2$ は空気飽和の5~90%である。これらの培養条件を用いて所望の目的のタンパク質を生産する哺乳動物細胞の培養を実施する。

#### 【0140】

##### 抗体を作製する方法

本発明はまた、ICFを含む重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体であることを特徴とする、抗原に特異的かつ所望の免疫原性をもつ抗体を作製する方法を提供する。このコレクションを作製する方法は、ICFを含む可変領域であることを特徴とする重鎖または軽鎖可変領域ポリペプチドを生産する細胞に発現される重鎖と軽鎖の核酸のコンビナトリアルライブラリー (上記から) を提供するステップ、および抗原と結合しかつ低い免疫原性をもつ抗体をスクリーニングするステップを含む。一実施形態において、軽鎖および重鎖可変領域核酸のコンビナトリアルライブラリーを両方も当技術分野で確立された方法により細胞中にトランスフェクトすることができ、従って、両方のコレクションを細胞により発現させることができる。これにより、軽鎖と重鎖を細胞内で組換えて抗体を作製することができ、これらの抗体を、当技術分野で公知の方法を用いて、結合アフィニティおよび/または免疫原性の低下についてスクリーニングすることができる。

#### 【0141】

他の実施形態においては、重鎖のコンビナトリアルライブラリーが細胞の第1集団であってもよくかつ軽鎖のコンビナトリアルライブラリーが細胞の第2集団であってもよい。分離した発現とスクリーニングに好適な方法は、米国予備特許出願第60/849,597号 (2006年10月4日出願) に記載されており、その全ての内容が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0142】

### コンビナトリアルライブラリー

本発明は、ICFを含む重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸のコンビナトリアルライブラリーを作製する方法を提供する。本コレクションを作製する方法は、ICFを含む重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸を提供するステップ、重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸を5'から3'の方向に接続するステップ、および細胞で核酸を発現するステップを含むものである。

#### 【0143】

一実施形態において、前記方法は重鎖可変領域の核酸（またはそれらがコードするアミノ酸配列）のコンビナトリアルライブラリーを提供する。表Gはコンビナトリアルライブラリーで使用するICF1、2、3および4のセットの例を示す。

#### 【0144】

表G コンビナトリアル重鎖ライブラリー作製の例示のICFセット

ICF 1	ICF2	ICF3	ICF4
GL1_8	GL1_7_8	GL_1	GL_1
GL_2	GL2_3	GL_2	
GL_3	GL_4	GL_3	
GL_4	GL_5	GL_4	
GL_5	GL_6	GL_5	
GL_6		GL_6	
GL_7		GL_7	
		GL_8	

#### 【0145】

表Gの4セットのICFを用いて、合計280通り（7 ICF1 x 5 ICF2 x 8 ICF3 x 1 ICF4）の重鎖組み合わせが得られる。

#### 【0146】

対応する軽鎖ライブラリーについては、表HのICFのセットが使用するICFの例である。

#### 【0147】

表H コンビナトリアル軽鎖ライブラリー作製の例示のICFセット

10

20

30

V <sub>K</sub> ICF 1	V <sub>K</sub> ICF2	V <sub>K</sub> ICF3	V <sub>K</sub> ICF4
VK1_2	VK1_2_3	VK1	VK1
VK3	VK4_5_6	VK2	
VK4	VK7	VK3	
VK5	VK8	VK4	
VK6		VK5	
VK7		VK6	
VK8		VK7	
		VK8	
V <sub>L</sub> ICF 1	V <sub>L</sub> ICF2	V <sub>L</sub> ICF3	V <sub>L</sub> ICF4
VL1	VL1_2	VL1	VL1
VL2	VL3_4	VL2	
VL3	VL5_6	VL3	
VL4	VL7	VL4	
VL5	VL8	VL5	
VL6		VL6	

10

20

【 0 1 4 8 】

VL7		VL7	
VL8		VL8	

【 0 1 4 9 】

従って、224通り (7 × 4 × 8 × 1) の 鎖または320通り (8 × 5 × 8 × 1) の 鎖のコンビナトリアルライブラリーをこれらのセットから得ることができる。

【 0 1 5 0 】

本発明のコンビナトリアルライブラリーは他のICFのセットからアセンブルしてもよい。例えば、減少したライブラリーを調製することができ、例えば、同じ呼称番号：VK1\_2 + VK1\_2\_3 + VK1 + VK1、またはVK6 + VK4\_5\_6 + VK6 + VK1を有するICF1、ICF2、ICF3、およびICF4を組み合わせることにより、減少した8通りの 鎖を表すセットを得ることができる。その他のライブラリーを、ICFを表1~4に与えた他のICFと置き換えることにより調製することができる。例えば、ICF1のあるセットを重鎖ライブラリーとして選択する場合、GL2を (a) 省略するか、(b) 表1にまたは実施例に掲げたGL2a、GL2bもしくは他のICF1により置き換えるか、または (c) 生殖系列または成熟抗体の対応する配列などのGL2、GL2a、GL2b、もしくは他のICF1に類似した1以上の配列により置き換えてもよい。

30

【 0 1 5 1 】

代わりの例示の実施形態

40

他の実施形態において、HuFRプロセスは、1以上のプレースホルダー核酸に関わる2ステップ再アセンブリープロセスでありうる。プレースホルダーは軽鎖ICFの減少したセットを含んでもよい。プレースホルダーはまた、プロセシングされた公知の抗体または生殖系列可変領域核酸配列同一性に基づいて、成熟抗体の配列のプレースホルダーと比較して決定することができる (例えば、成熟抗体の核酸配列と最も類似した軽鎖可変領域生殖系列配列)。同定されると、そのプレースホルダー核酸配列を細胞にトランスフェクトし、そして発現させた後、次いで、本発明の重鎖可変領域分子とカップリングしうる一時的な単一軽鎖分子として利用することができる。

【 0 1 5 2 】

抗原との結合などの、所望の特性を有する重鎖可変領域ポリペプチドが最良の重鎖であ

50

る。一実施形態においては、選択したポリペプチドをコードする核酸配列を、細胞で発現された軽鎖可変領域核酸のコンビナトリアルライブラリーと組み合わせることができる。他の実施形態において、以上記載したように、抗体クローンをスクリーニングすることができる。例えば、抗体クローンを、高い結合アフィニティ、例えば、アポトーシスを誘導するかまたは細胞死に介在する能力について、スクリーニングすることができる。

【0153】

軽鎖遺伝子を合成して、HCスクリーニング用のプレースホルダー軽鎖として役立てる。同じファミリー（例えば、同じ起源の生殖系列配列由来）に属するFR1、FR2、FR3、およびFR4からの軽鎖フレームワークの代表的配列を得て、プレースホルダー軽鎖遺伝子として利用した。スクリーニング用に作製できる8つの潜在的 または ライブラリーを代表する フレームワーク領域の8つのファミリーと フレームワーク領域の8つのファミリーを選択した。

10

【0154】

8つのファミリーのそれぞれに対する重鎖とプレースホルダー軽鎖が作製されると、産物のそれぞれを結合してライブラリーにすることができる（例えば、ファミリー1の軽鎖と共に作製した245重鎖；ファミリー2の軽鎖と共に作製した245重鎖；など、全部で8つのライブラリーができるまで）。8つのライブラリー（各ライブラリーは1つの生殖系列ファミリーを表す）のそれぞれからの合計1960通りの抗体を、結合アッセイ（例えばELISA）を用いてスクリーニングすることができる。こうして、全部で8つのライブラリーをスクリーニングする。合計15,680通りのHC候補を試験することができる。それから、プレースホルダー軽鎖を取り外し、軽鎖可変領域核酸のコンビナトリアルライブラリーで置き換えて、トップ10の結合HCをさらに評価し、これはHuFRプロセスの第2期で決定される。

20

【0155】

ライブラリー合成とクローニングの後に、抗体遺伝子を担持するプラスミドを大腸菌で増幅し、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトし、全長Igを生産することができる。得られる抗体上清を次いでアポトーシスアッセイでスクリーニングすることができる。例えば、CD3抗体の場合、一次スクリーニングから326ヒットを選択し、52ヒットを確認し、そしてトップ10の重鎖ヒットを選択した（実施例4を参照）。

【0156】

第2ラウンドにおいて、アポトーシスアッセイにより同定したトップ10の再アセンブルした重鎖遺伝子を次いでHuFRコンビナトリアル軽鎖ライブラリーと組み合わせることができる。このライブラリーをスクリーニングして、対照抗体と比較して同一のまたは改善された特性をもつ変異体を同定することができる。例えば、CD3抗体の場合、一次スクリーニングから268ヒットがあり、37ヒットを確認し、トップ10を選択した。9つを首尾よく再トランスフェクトし、確認アッセイでアッセイした（実施例4を参照）。

30

【0157】

本発明はさらに次の例を参照して説明するが、本発明はこの例に限定されるものでないことを理解されたい。

【実施例】

【0158】

40

（実施例1）

軽鎖ライブラリー用のフレームワーク再アセンブリーフラグメント

本発明は、キメラ抗原結合ポリペプチドを構築するために利用できる軽鎖および重鎖フレームワーク領域「フラグメント」、またはワーキングピースのライブラリーを提供する。次の例は、キメラ抗原結合ポリペプチドを構築するために利用できる軽鎖フレームワーク領域「フラグメント」、またはワーキングピースの例示のライブラリーならびにそれらを作製するための例示の方法を記載する。

【0159】

一態様において、フレームワークフラグメントはヒトフレームワーク領域（FR）、例えばサブ領域FR1、FR2、およびFR3の配列多様性を表すように設計される。この例において

50

は、フラグメントライブラリーをヒト生殖系列免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) に基づいて構築した。

【0160】

再アセンブリライブラリー用の軽鎖 ( $V_L$ ) フレームワーク領域フラグメントの設計

鎖フレームワーク領域用の配列を同定するために、抗体配列のKabatデータベースを調べて、どのヒト生殖系列遺伝子が成熟した機能性抗体で使用されているかを確認した。配列比較ソフトウェアを用いて、各成熟 $V_L$ に対する最も類似した生殖系列遺伝子を同定した。こうして、遺伝子を、それらから生じ得た成熟抗体のパーセントにより比較することができる。機能性全長配列 (図2~3) に基づいて、トップ全長生殖系列配列を選択して個々のFR域を得た。

10

【0161】

ヒトFRを代表する「コンセンサス」配列を得るために、全ヒト $V_L$  エキシソンの配列を編集 (compile) してエキソン配列をFR中に分割した。以下のステップを、FR配列の各セットに対して実施した。あるセットのFR配列をアラインし、配列類似性によりクラスターを形成した。それぞれの主FRクラスターからの配列を用いて、各配列位置に存在する最も高頻度のアミノ酸から構成されるコンセンサス配列を作製した。得られる配列は、17通りのコンセンサスFR<sub>1</sub> (ICF1とも呼ぶ)、16通りのコンセンサスFR<sub>2</sub> (ICF2とも呼ぶ)、および15通りのコンセンサスFR<sub>3</sub> (ICF3とも呼ぶ) であった。各コンセンサス領域 (例えばICF1、ICF2、ICF3) は、生殖系列ライブラリーFRフラグメントと少なくとも52%同一であり、そして成熟FRフラグメントと少なくとも65%同一であった。FRコンセンサス配列 (例えば、ICF1、ICF2、ICF3) をDNA配列に変換した。

20

【0162】

これらのICFのサブセットは、所望の範囲とスクリーニング能力に従って、選択することができる。サブセットフラグメントを、最初にICF  $V_L$  ライブラリー (その時点で使用中の) からのユニークなフラグメントを含むことにより選択し、次いで、一次的に成熟抗体によるそれらの相対的使用度に、そして二次的に現行ライブラリーに含まれない任意の配列スペースの占める範囲に基づくコンセンサスフラグメントを用いてこのリストを補充する。

【0163】

(実施例2)

重鎖ライブラリー用のフレームワーク再アセンブリフラグメント

本発明は軽鎖と重鎖両方のICF用に対して別のライブラリーを提供し; これらのライブラリーは本発明の例示に方法を用いて作製される。次の例は、キメラ抗原結合ポリペプチドを構築するために利用できる重鎖フレームワーク領域「フラグメント」、またはワーキングピースの例示のライブラリーならびにそれらを作製するための例示の方法を記載する。

30

【0164】

重鎖ICF用の別のライブラリーを、自然の免疫学的成熟プロセスを通して作製されたヒト生殖系列免疫グロブリン重鎖可変ドメイン ( $V_H$ )、およびヒト $V_H$  に基づいて構築した。任意の $V_H$  を相補性決定領域 (CDR) とFR中に区分することができる。それぞれのFRについて、いくつかのフラグメントが自然の $V_H$  FR間で見られる多様性を表すように設計した。

40

【0165】

全てのヒト $V_H$  エキシソンの配列を編集 (compile) してエキソン配列をFR中に分割した。以下のステップを、FR配列の各セットに対して実施した。あるセットのFR配列をアラインし、配列類似性によりクラスターを形成した。それぞれの主FRクラスターからの配列を用いて、各配列位置に存在する最も高頻度のアミノ酸から構成されるコンセンサス配列 (例えば、ICF1、ICF2、ICF3) を作製した。各FRファミリーアミノ酸コンセンサス配列 (例えば、ICF1、ICF2、ICF3) を偏らないやり方 (unbiased manner) でコドンに逆翻訳した。これらの予備ヌクレオチドモデルをヒト $V_H$  エキシソンとアラインして「天然の」コドン利用を確認した。一次ヌクレオチドモデルとアラインしたエクソン領域を用いて二次ヌクレオ

50

チドモデルを作製した。二次ヌクレオチドモデルを翻訳して、本来のコンセンサス一次構造（例えば、ICF1、ICF2、ICF3）と比較した。コンセンサス配列（例えば、ICF1、ICF2、ICF3）から変異を生じた二次モデルのコドンを、コンセンサス配列で見られる残基をコードするヒトコドンと置き換えた。FR<sub>3</sub>は12通りの代表的フラグメント配列を有した；1つの実験ライブラリーにおいて、8通りのフラグメントを用いた。これらは、12通りのセットと8通りのセットの間の配列多様性の差異を最小化するために選択した。

【0166】

（実施例3）

#### 抗CD20抗体

本発明は、ポリペプチドCD20（例えば、一実施形態においてはヒトCD20）と特異的に結合するキメラポリペプチドおよびキメラ二価抗体を提供する。

10

【0167】

ヒトCD20と特異的に結合し、参照抗体と類似した生物学的特性を有するマウス抗体を同定した。そのマウスハイブリドーマを培養し、マウス抗体のヒトCD20+B細胞株（Daudi）との結合を、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）分析により確認した。

【0168】

さらなる特性化およびアッセイ開発に先立って、選択した親マウス抗体をキメラ抗CD20抗体に変換した。選択した抗体と参照抗体（マウス-ヒトキメラ）を対比する比較生物学的研究を実施するために、キメラ抗体を必要とした。さらに、キメラ抗体を調製して、改変に用いるスクリーニングアッセイ用の適当な対照として役立てた。親キメラの調製にあたっては、免疫グロブリン重鎖（HC）と軽鎖（LC）遺伝子からの可変領域をコードする配列を単離し、ヒトIgG1定常ドメインを含有する哺乳動物の発現ベクター中にクローニングした。得られるキメラ抗CD20抗体をDVSA-CD20と呼んだ。

20

【0169】

#### アッセイ開発

細胞に基づくELISAを、DVSA-CD20と同等以上のCD20結合特性をもつHuFR変異体を同定するための簡単で迅速な一次スクリーニング用として確立した。本アッセイは、懸濁液中のCD20+ B細胞株を用いて、ならびにヒトCD20タンパク質を発現する安定した粘着性HEK-293細胞によって開発した。

【0170】

CDC（補体依存性細胞傷害）アッセイ 蛍光に基づく、96ウエルプレートアッセイを開発して、抗CD20変異体のCD20+リンパ腫細胞と結合する能力を評価した。補体活性化は細胞生存率の測定により評価した。このアッセイにおいて、参照抗体およびDVSA-CD20をポジティブ対照として利用した。ネガティブ対照としては、無処理細胞、補体だけで処理した細胞、無関係なヒトIgGおよび補体で処理した細胞、およびベクター対照上清および補体で処理した細胞が挙げられる。

30

【0171】

ADCC（抗体依存性、細胞介在性細胞傷害アッセイ） 抗CD20抗体のADCCを誘導する能力をアッセイした。抗CD20抗体変異体を、CD20細胞ELISAで、DVSA-CD20と類似のまたは改善された結合について、およびCDCアッセイで、DVSA-CD20と比較して類似のまたは改善された活性を有するかを試験した。抗CD20変異体がこのエフェクター機能を保持することを確認するために、96ウエルADCCアッセイを確立した。細胞死はLDH放出を用いて測定した。アッセイ用のポジティブ対照には対照抗体とDVSA-CD20抗体が含まれた。

40

【0172】

アポトーシスアッセイ 原形質膜成分の消失を測定するFACSに基づくアッセイを開発して、抗CD20変異体のアポトーシスを誘導する能力を評価した。本アッセイについては、ヒトCD20ポジティブB細胞リンパ腫細胞を抗CD20で処理し、アネキシンVとヨウ化プロピジウムで染色し、その後FACS分析を行った。

【0173】

細胞周期アッセイ DVSA-CD20の全マウス、親抗体はin vitroで架橋抗体の存在のもと

50



で細胞増殖を誘導することが報じられている。参照抗体はこの望ましくない活性を示さなかった。抗CD20変異体がヒトB細胞の細胞増殖を誘導しなかったことを確実にするために、抗CD3細胞周期アッセイを本スクリーニングに適合させた。マウスCD20 (muCD20) は、文献に報じられるように、架橋抗体の存在のもとでインキュベートすると、穏やかなレベルの細胞増殖を誘導する。

【0174】

#### HuFRライブラリーの構築

ヒトフレームワーク再アセンブリーを2ラウンド実施した。第1ラウンドでは、重鎖ライブラリーを調製した。次表は、図1に模式的に記載したマウスCDRとのCD20重鎖アセンブリーのために用いたICF (ICF配列は表1と表2を参照)を示す。

【0175】

重鎖ID	ICF1	ICF2	ICF3	ICF4
BD20332	GL7	GL2_3	GL7	GL1
BD20333	GL7	GL2_3	GL8	GL1
BD20335	GL7	GL5	GL1	GL1
BD20336	GL7	GL2_3	GL1	GL1
BD20337	GL7	GL4	GL7	GL1
BD20338	GL6	GL5	GL7	GL1
BD20339	GL7	GL5	GL8	GL1
BD20341	GL7	GL4	GL8	GL1

重鎖可変領域に対する完全なヌクレオチドとアミノ酸配列を次に与える：

#### 重鎖可変領域のヌクレオチド配列：

>BD20332 (配列番号99)

```
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTC
GGTGAAGGTCTCCIGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATA
TGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTAGAGTGGGTGGGTGCT
ATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAG
AGTCACCATCTCAGCTGACAAGTCCATCAGCACTGCC TACCTGCAGTGGA
GCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGCAC
TACGGTAGTA ACTACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT
GGTCACCGTCTCCTCC
```

>BD20333 (配列番号108)

```
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTC
```

```
GGTGAAGGTCTCCIGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATA
TGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGGTGCT
ATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAG
AGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGA
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCGCAC
TACGGTAGTA ACTACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT
GGTCACCGTCTCCTCC
```

>BD20335 (配列番号124)

```
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTC
GGTGAAGGTCTCCIGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATA
TGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTAGAGTGGGTGGGTGCT
ATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAG
ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCACTGTATCTGCAAATGA
ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATCGCAC
TACGGTAGTA ACTACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT
GGTCACCGTCTCCTCC
```

10

20

30

40

50

## &gt;BD20336 (配列番号130)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTC  
 GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATA  
 TGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGTGCT  
 ATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAG  
 ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATCCTGATCTGCAAATGA  
 ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATCGCAC  
 TACGGTAGTAAC TACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT  
 GGTACCCGCTCTCTCC

## &gt;BD20337 (配列番号131)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTC  
 GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATA  
 TGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATGGGTGCT  
 ATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAG  
 AGTCACCATCTCAGCTGACAAGTCCATCAGCACTGCCTACCTGCAGTGGGA  
 GCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGCAC  
 TACGGTAGTAAC TACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT  
 GGTACCCGCTCTCTCC

10

## &gt;BD20338 (配列番号132)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTC  
 TCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATA  
 TGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAAAGGGGCTGGAGTGGATGGGTGCT  
 ATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAG  
 AGTCACCATCTCAGCTGACAAGTCCATCAGCACTGCCTACCTGCAGTGGGA  
 GCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGCAC  
 TACGGTAGTAAC TACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT  
 GGTACCCGCTCTCTCC

20

## &gt;BD20339 (配列番号136)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTC  
 GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATA  
 TGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAAAGGGGCTGGAGTGGATGGGTGCT  
 ATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAG  
 AGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGA  
 GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCGCAC  
 TACGGTAGTAAC TACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT  
 GGTACCCGCTCTCTCC

30

## &gt;BD20341 (配列番号137)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTC  
 GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATA  
 TGCAC TGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAAAGGGGCTGGAGTGGATGGGTGCT  
 ATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAG  
 AGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGA  
 GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATCGCAC  
 TACGGTAGTAAC TACGTAGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT  
 GGTACCCGCTCTCTCC

40

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

## &gt;BD20332 (配列番号138)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA  
 IYFGNGDTSYNQKFKGRVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYVCARSH  
 YGSNYVDYFDYWGQGLVTVSS

## &gt;BD20333 (配列番号142)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA  
 IYFGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDITAVYYCARSH  
 YGSNYVDYFDYWGQGLVTVSS

## &gt;BD20335 (配列番号143)

50

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWMGA  
IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSH  
YGSNYVDYFDYWGQGLVTVSS

>BD20336 ( 配列番号144 )

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA  
IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSH  
YGSNYVDYFDYWGQGLVTVSS

>BD20337 ( 配列番号148 )

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGA  
IYPGNGDTSYNQKFKGRVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMY YCARSH  
YGSNYVDYFDYWGQGLVTVSS

10

>BD20338 ( 配列番号149 )

EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWMGA  
IYPGNGDTSYNQKFKGRVTISRADKSI STAYLQWSSLKASDTAMY YCARSH  
YGSNYVDYFDYWGQGLVTVSS

>BD20339 ( 配列番号150 )

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWMGA  
IYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSH  
YGSNYVDYFDYWGQGLVTVSS

>BD20341 ( 配列番号154 )

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGA  
IYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSH  
YGSNYVDYFDYWGQGLVTVSS

20

重鎖と結合したシグナル配列および定常領域は次の通りである :

>HCシグナル ( 配列番号155 )

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCAGTGT

>HCシグナル ( 配列番号156 )

MEFGLSWLFLVAILKGVQC

>HC定常領域 ( 配列番号160 )

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG  
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGCGCCCTGACCAGCGGCGTG  
CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA<sup>1</sup>CCGTGCCCTCCAGCAGC  
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC  
AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTC  
TCCCCC<sup>2</sup>AAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC  
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG  
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG  
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAG  
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGC  
CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA<sup>3</sup>ACTACAAG  
ACCACGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG  
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC  
CTGTCTCCGGGTAAATGA

30

40

>HC定常領域 ( 配列番号161 )

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLV<sup>4</sup>KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<sup>5</sup>EPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI<sup>6</sup>SKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<sup>7</sup>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNV<sup>8</sup>FC<sup>9</sup>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

次いで、重鎖ライブラリーを8通りのプレースホルダー軽鎖と結合した。各軽鎖はヒト  
フレームワークとマウスCDRの固定したセットから成った。抗体遺伝子を担持するプラス  
ミドを大腸菌で増幅し、哺乳動物細胞中にトランスフェクトし、全長IgGを含有する上清

50

を生産し、そして細胞ELISAでスクリーニングを行った。細胞ELISAにより同定した最良の再アセンブルした重鎖遺伝子を次いで次の再アセンブルした軽鎖ライブラリーと組合わせた：

軽鎖ID	ICF1	ICF2	ICF3	ICF4
BD22084	VK8	VK7	VK5	VK1
BD22107	VK8	VK8	VK5	VK1
BD22086	VK8	VK4_5_6	VK7	VK1
BD22103	VK8	VK1_2_3	VK7	VK1
BD22088	VK8	VK7	VK2	VK1
BD22108	VK8	VK4_5_6	VK2	VK1
BD22094	VK8	VK4_5_6	VK3	VK1
BD22085	VK7	VK4_5_6	VK1	VK1
BD22109	VK7	VK7	VK5	VK1
BD22090	VK8	VK8	VK8	VK1
BD22092	VK1_2	VK8	VK7	VK1
BD22100	VK3	VK4_5_6	VK2	VK1
BD22105	VK6	VK8	VK7	VK1
BD22111	VK7	VK1_2_3	VK3	VK1
BD22104	VK4	VK8	VK1	VK1
BD22087	VK6	VK1_2_3	VK3	VK1
BD22096	VK5	VK1_2_3	VK3	VK1
BD22091	VK5	VK7	VK4	VK1
BD22089	VK5	VK7	VK2	VK1
BD22095	VK4	VK7	VK2	VK1
BD22106	VK6	VK4_5_6	VK2	VK1
BD22097	VK6	VK7	VK1	VK1
BD22101	VK5	VK7	VK1	VK1
BD22102	VK4	VK7	VK1	VK1

10

20

30

40

軽鎖可変領域に対する完全なヌクレオチドとアミノ酸配列を次に与える：

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列：

>BD22084 (配列番号162)

```
GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAGTTTCATGCACT
GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTATGCCACA
TCCAACCTGGCTTCTGGGATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG
TTTATTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT
ACCAAGGTGGAAATCAAAA
```

>BD22107 (配列番号166)

```
GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAGTTTCATGCACT
GGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATGCCACA
TCCAACCTGGCTTCTGGGATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG
TTTATTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT
ACCAAGGTGGAAATCAAAA
```

>BD22086 (配列番号167)

GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA  
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGG  
GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAG  
TTTATTACTGTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22103 ( 配列番号168 )

GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA  
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGG  
GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAG  
TTTATTACTGTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

10

>BD22088 ( 配列番号172 )

GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA  
  
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGG  
GACAGATTTTACTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAA  
CATATTACTGTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

20

>BD22108 ( 配列番号173 )

GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA  
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGG  
GACAGATTTTACTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAA  
CATATTACTGTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22094 ( 配列番号174 )

GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA  
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGG  
GACAGAAATCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAA  
CTTATTACTGTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

30

>BD22085 ( 配列番号177 )

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGA  
GAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG  
GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA  
CTTACTACTGTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

40

>BD22109 ( 配列番号205 )

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGA  
GAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG  
GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA  
TTTATTACTGTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22090 ( 配列番号210 )

50

GATATTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA  
 GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
 GGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATGCCACA  
 TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGG  
 CACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGG  
 TTTATTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
 ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22092 ( 配列番号211 )

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA  
 CAGAGTCACCATCACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
 GGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATGCCACA  
 TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGG  
 GACAGATTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAG  
 TTTATTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
 ACCAAGGTGGAAATCAAA

10

>BD22100 ( 配列番号212 )

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA  
 CAGAGTCACCATCACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
 GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
 TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGG  
 GACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAA  
 CATATTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
 ACCAAGGTGGAAATCAAA

20

>BD22105 ( 配列番号213 )

GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
 AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
 GGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATGCCACA  
 TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGG  
 GACAGATTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAG  
 TTTATTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
 ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22111 ( 配列番号214 )

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGA  
 GAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
 GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCCACA  
 TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGG  
 GACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAA  
 CTTATTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
 ACCAAGGTGGAAATCAAA

30

>BD22104 ( 配列番号215 )

GAAATAGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGA  
 AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
 GGTATCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATGCCACA  
 TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG  
 GACAGATTTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA  
 CTTACTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
 ACCAAGGTGGAAATCAAA

40

>BD22087 ( 配列番号216 )

GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
 AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
 GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCCACA  
 TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGG  
 GACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAA  
 CTTATTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGCCAAGGT  
 ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22096 ( 配列番号217 )

GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGG  
GACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAA  
CTTATTACTGTATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22091 ( 配列番号218 )

GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG  
GACAGAGTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA  
TTTATTACTGTATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

10

>BD22089 ( 配列番号219 )

GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGG  
GACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAA  
CATATTACTGTATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

20

>BD22095 ( 配列番号220 )

GAAATAGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGA  
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGG  
GACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAA  
CATATTACTGTATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22106 ( 配列番号221 )

GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGG  
GACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAA  
CATATTACTGTATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

30

>BD22097 ( 配列番号222 )

GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG  
GACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA  
CTTACTACTGTATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

40

>BD22101 ( 配列番号223 )

GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA  
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTTCATGCACT  
GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTATGCCACA  
TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG  
GACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA  
CTTACTACTGTATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTCCGGCCAAGGT  
ACCAAGGTGGAAATCAAA

>BD22102 ( 配列番号224 )

50

GAAATAGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGA  
 AAGAGCCACCCTCTCTGCAGGGCCAGCTCAAGTTTAAGTTTCATGCACT  
 GGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTATGCCACA  
 TCCAACCTGGCTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG  
 GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA  
 CTTACTACTGTTCATCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTGCGCCAAGGT  
 ACCAAGGTGGAATCAAAA

軽鎖可変領域のアミノ酸配列：

>BD22084 (配列番号225)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRASSSLSFMHWYQQKPGQPPELLIYAT  
 SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

10

>BD22107 (配列番号226)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRASSSLSFMHWYLQKPGQSPQLLIYAT  
 SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

>BD22086 (配列番号227)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRASSSLSFMHWYQQKPGQAPRLLIYAT  
 SNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

>BD22103 (配列番号228)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRASSSLSFMHWYQQKPGKAPKLLIYAT  
 SNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

20

>BD22088 (配列番号229)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRASSSLSFMHWYQQKPGQPPELLIYAT  
 SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIATYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

>BD22108 (配列番号230)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRASSSLSFMHWYQQKPGQAPRLLIYAT  
 SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIATYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

30

>BD22094 (配列番号231)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRASSSLSFMHWYQQKPGQAPRLLIYAT  
 SNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

>BD22085 (配列番号232)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASSSLSFMHWYQQKPGQAPRLLIYAT  
 SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

>BD22109 (配列番号233)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASSSLSFMHWYQQKPGQPPELLIYAT  
 SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

40

>BD22090 (配列番号234)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRASSSLSFMHWYLQKPGQSPQLLIYAT  
 SNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCHQWSSNPLTFGQG  
 TKVEIK

>BD22092 (配列番号235)



DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSLSFMHWYLQKPGQSPQLLIYAT  
SNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22100 ( 配列番号236 )

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASSLSFMHWYQKPGQAPRLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTFITISSLQPEDIATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22105 ( 配列番号237 )

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSLSFMHWYLQKPGQSPQLLIYAT  
SNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

10

>BD22111 ( 配列番号238 )

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASSLSFMHWYQKPGKAPKLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22104 ( 配列番号239 )

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASSLSFMHWYLQKPGQSPQLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

20

>BD22087 ( 配列番号240 )

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSLSFMHWYQKPGKAPKLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22096 ( 配列番号241 )

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSLSFMHWYQKPGKAPKLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22091 ( 配列番号242 )

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSLSFMHWYQKPGQPPKLLIYAT  
SNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

30

>BD22089 ( 配列番号243 )

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSLSFMHWYQKPGQPPKLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTFITISSLQPEDIATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22095 ( 配列番号244 )

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASSLSFMHWYQKPGQPPKLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTFITISSLQPEDIATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

40

>BD22106 ( 配列番号245 )

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSLSFMHWYQKPGQAPRLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTFITISSLQPEDIATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22097 ( 配列番号246 )

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSLSFMHWYQKPGQPPKLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22101 ( 配列番号247 )

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSLSFMHWYQQKPGQPPKLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

>BD22102 (配列番号248)

EIVMTQSPATLSVSEGERATLSCRASSLSFMHWYQQKPGQPPKLLIYAT  
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQWSSNPLTFGQG  
TKVEIK

軽鎖と結合したシグナル配列および定常領域は次の通りである：

>LCシグナル (配列番号249)

ATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCAAATGT

10

>LCシグナル (配列番号250)

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGAKC

>LC定常 (配列番号251)

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT  
GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT  
AACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG  
AGCTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

>LC定常 (配列番号252)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLS  
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

これらをプラスミドIg鎖発現ベクターを経由してHEK-293懸濁液細胞にトランスフェクトし、得られる細胞培養上清をスクリーニングした。

【0176】

HuFRライブラリースクリーニング結果 最終HuFRライブラリーに対する一次ハイスクリーンブットスクリーニングデータを図26に示し、これは抗CD20 ELISAアッセイからのデータのグラフを図解し、粘着性CD20+ HEK-293細胞を用いる抗CD20細胞ELISAにおける、抗CD20 HuFRクローンの比活性を示す。DVSA-CD20の比活性を1.0に設定した。1.0以上の活性をもつクローンをCDCアッセイで試験した。シグナル：ノイズは、定量的ELISAで4.2 (CV 8.8%)、抗CD20細胞ELISAで3.6 (CV 5.7%)であった。HuFRクローンの比活性は、抗体発現レベル (定量的IgG ELISAにより測定して) による抗CD20細胞ELISA結合活性を規準化することにより決定した。DVSA-CD20の比活性を1.0に設定し、最高の比活性により整列した。最高の推定ヒット (>80) を選んでさらに分析した。細胞ELISAから同定したトップ推定ヒットのプロファイルをCDCアッセイで作った。CD20細胞のELISAとCDCアッセイにおけるトップヒットの比較は、細胞のELISAヒットの多くが、図5に示したように、DVSA-CD20と類似した細胞傷害性活性を保持することを示した。図5は、抗CD20 ELISAのトップ抗CD20 HuFRクローンの比活性 (紫色、左の棒グラフ) をCDCアッセイのトップクローン活性 (水色、右の棒グラフ) と比較する棒グラフである。DVSA-CD20ポジティブ対照 (cDVSA) とネガティブ対照 (無関係なヒトIgG) の活性を示した。

30

【0177】

細胞ELISAとCDCアッセイの結果に基づいて、トップHuFR変異体を選択し、二次アッセイのパネルで確認しかつさらに分析を行った。これらの変異体において結合したHuFR重鎖と軽鎖は次の通りである：

40

LCとHC組合わせ	軽鎖	重鎖
1	BD22084	BD20332
2	BD22085	BD20335
3	BD22086	BD20335
4	BD22088	BD20337
5	BD22087	BD20335
6	BD22089	BD20335
7	BD22090	BD20337
8	BD22095	BD20337
9	BD22091	BD20337
10	BD22108	BD20337
11	BD22092	BD20338
12	BD22094	BD20337
13	BD22096	BD20337
14	BD22092	BD20337
15	BD22102	BD20337
16	BD22097	BD20335
17	BD22104	BD20337
18	BD22085	BD20339
19	BD22107	BD20339
20	BD22100	BD20335
21	BD22103	BD20337
22	BD22105	BD20337
23*	BD22108	BD20337
24	BD22101	BD20335
25	BD22106	BD20333
26	BD22108	BD20338
27	BD22109	BD20341
28	BD22111	BD20336
29*	BD22104	BD20337

10

20

30

40

\* 注記：LCとHC組合わせ番号23は、番号10（BD22108とBD20337）と同じ軽鎖と重鎖の組合わせである。番号29は、番号17（BD22104とBD20337）と同じ重鎖／軽鎖組合わせを有する。それでも、23と29は下記結果で一貫した表現を維持している。

【 0 1 7 8 】

トップ変異体をHEK-293懸濁液細胞中にトランスフェクトし、得られる（未精製）細胞培養上清を二次アッセイのパネルで試験した：アポトーシスアッセイは図6を；細胞周期アッセイは図7を；CDCアッセイは図8を；そしてADCCアッセイは図9をそれぞれ参照されたい。

50

## 【0179】

図6はアポトーシスアッセイの棒グラフであり、トップHuFRヒットのいくつかは参照抗体およびDVSA-CD20と同等以上の活性を有することを示す。ポジティブ対照はスタウロsporin、参照抗体、およびDVSA-CD20であった。ネガティブ対照は無処理細胞（無染色培地）、無処理細胞で架橋抗体単独（GAH単独培地）、および無関係なヒトIgGで処理した細胞（ヒト）であった。図7は細胞周期アッセイ結果であり、HuFR抗CD20ヒットがin vitroでヒトPBMCの細胞増殖を誘発しないことを示す。DVSA-CD3はポジティブ対照であった（レーン1）。ネガティブ対照には、架橋抗体を伴う無処理細胞および無関係なヒトIgGで処理した細胞が含まれる。図8はCDCアッセイの棒グラフである。いくつかの抗CD20 HuFRがCDCを、参照抗体およびDVSA-CD20（レーン3および4）と同等以上に誘発した。本アッセイに対するネガティブ対照（100%可変率）は無処理細胞および無関係なヒトIgGで処理した細胞（レーン1および2）であった。

10

## 【0180】

図9はADCCアッセイの棒グラフであり、下記実施例4で詳しく考察する。トップ抗CD20 HuFRヒットのサブセットによる予備的ADCCデータは、これらのヒットのいくつかは濃度1 $\mu$ g/mlで参照抗体およびDVSA-CD20と類似した活性を有することを示唆する。本アッセイに対するネガティブ対照は、無関係なヒトIgG（ヒト）抗CD3とインキュベートしたCD20+標的細胞であった。

## 【0181】

アッセイデータの総括を表Aに示す。変異体を、細胞ELISAにおける最良結合活性から出発して順に1~29に格付けした。++の性能は参照抗体と同等であった。トップ12変異体の全てに星印を付した。

20

## 【0182】

表A 細胞に基づく二次アッセイにおける抗CD20変異体の総括

変異体	CDC	アポトーシス	細胞周期	ADCC
1	-	-	++	+
2	+	+	+	++
3	+	+	++	++
4*	+	+	++	+++
5	-	++	++	+++
6*	+	++	++	++
7	+	+	++	++
8*	+	+++	++	++
9*	++	++	++	++
10*	++	+	++	++
11	++	+	-	+
12	-	+	++	+++
13	-	-	++	+++
14*	+	+++	++	++++
15*	+	+	++	+++
16	-	+	++	+++
17*	++	+	++	++
18*	+++	++	+	+++
19*	++	+	+	+++
20	-	+	++	+++
21	++	+	+++	+
22*	++	+++	++	+
23	++	+	++	+
24	++	+	++	+
25	-	++	++	+++
26	-	+	+++	+
27	+	++	++	+
28*	++	+++	++	++
29	++	+	+	+

10

20

30

## (実施例4)

## 抗CD3抗体

本発明は、ポリペプチドCD3と特異的に結合するキメラポリペプチドおよびキメラ二価抗体、例えば、一実施形態においては、ヒトCD3を提供する。一態様においては、本発明のポリペプチド、例えば、本発明のキメラポリペプチドまたはキメラ二価抗体を用いて、免疫反応を抑制または抑止して、例えば、腎移植患者の急性同種移植片拒絶および心臓および肝臓移植患者のステロイド耐性急性同種移植片拒絶を治療（改善）し、自己免疫性疾患である重篤な移植片対宿主病を治療（改善）し、乾癬および潰瘍性大腸炎を治療（改善）し、および、最近診断された1型糖尿病患者を含む糖尿病患者の、例えばインスリン生産を維持もしくは改善することにより、1型糖尿病を改善する。

40

## 【0183】

代替の実施形態において、本発明の抗CD3抗体は、腎移植患者の急性同種移植片拒絶および心臓および肝臓移植患者のステロイド耐性急性同種移植片拒絶を治療するのに有用である。代替の実施形態において、これらの本発明の抗体はまた、乾癬および潰瘍性大腸炎、および重篤な移植片対宿主病を含む自己免疫性疾患を治療するのにもまた、最近診

50

断されたI型糖尿病患者のインスリン生産を維持もしくは改善するのにも有用である。改変された抗CD3を、乾癬および潰瘍性大腸炎研究についてフェーズ2研究で評価中である。

【0184】

参照マウス抗CD3抗体を、本発明のキメラ、抗CD3抗体に変換した。単一のアミノ酸変化 (T299V) を抗体のFc域中に挿入し、参照抗体に関係する望ましくないサイトカイン副作用を低下させた (このT299V突然変異を有するFc域を「Fcヌル」と呼ぶ)。Fcヌルをさらなる対照として利用した。

【0185】

キメラ抗体をまた、改変に用いるスクリーニングアッセイを確立するための適当な対照として役立てるためにも調製した。親キメラを調製して、可変領域をコードする参照配列を、ヒトIgG1定常ドメインを含有する哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。

10

【0186】

図9はADCCアッセイの棒グラフであり、実施例4で、以下に詳しく考察する。トップ抗CD20 HuFRヒットのサブセットについての予備的ADCCデータは、これらのヒットのいくつかは1 µg/mlの濃度で参照抗体およびDVSA-CD20と類似した活性を有することを示唆する。本アッセイに対するネガティブ対照は、無関係なヒトIgG (ヒト) 抗CD3とインキュベートしたCD20+標的細胞であった。

【0187】

得られるキメラ、抗CD3抗体をDVSA-CD3と呼び、図10および図11に示した。図10はDVSA-CD3の軽鎖 (上段) および重鎖 (下段) の核酸配列を示す。黄色強調部の文字はCDRを示す。図11はDVSA-CD3重鎖 (Fcヌル) (上段) およびDVSA-CD3重鎖 (中段) アミノ酸配列、ならびにDVSA-CD3軽鎖 (下段) を示す。黄色強調部の文字は定常領域を示す。

20

【0188】

#### アポトーシスアッセイ

細胞培地 (RPMI-1640 (ATCC Cat. 30-2001) / 10% FBS (Invitrogen Cat. 10082-147) / 0.05mM 2-メルカプトエタノール (Sigma M-7522)) で培養したJurkat T細胞 (ATCC Cat. TIB-152) を、最後のサブ培養の2日後にほぼ  $2.5 \times 10^4$  細胞密度でまいた。次いで細胞を室温にて5分間200gで遠心分離した。使用した細胞培地を次いで吸引し、細胞を静かに新しい培地に再懸濁した。細胞を計数した後に、細胞数を新しい細胞培地を用いて  $4.0 \times 10^5$  細胞/mlに調節した。次いで細胞を96ウエルプレートにまいた (ほぼ50 µl/ウエル)。細胞培地中に調製した抗体溶液 (100ng/ml、50ng/ml、25ng/mlまたは12.5ng/ml IgG) を、細胞に加え、そして24時間、37 °C、5%CO<sub>2</sub>にてインキュベートした。試験する抗体 (20ng/ml) はスクリーニングプロセスで同定した抗体であった。無関係なヒトIgG1 (EMD Biosciences Cat. 400120)、DVSA-CD3、DVSA-CD3 (Fcヌル) を対照抗体として役立てた。

30

【0189】

APO-ONEアポトーシスアッセイ (登録商標) (Promega Cat. G7791) を用いた。アッセイ読取値は、96ウエルフォーマット中の蛍光標識したテトラペプチド基質の切断に基づいた (APO-ONE (登録商標) HOMOGENEOUS CASPASE-3/7 Assay, Promega Cat. G7790, G7791)。100 µl/ウエルのAPO-ONE (登録商標) 試薬/基質 (100:1希釈) を各ウエルに加え、室温、暗所にて24時間インキュベートした。確立したin vitroアポトーシスアッセイは、ヒトCD3+T細胞における、抗CD3抗体処理後のカスパーゼ活性の誘導を測定する。次いでプレートを、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、励起波長の485nmおよび発光波長の530nmにて読み取る。

40

【0190】

#### HuFR抗CDSライブラリーの構築

HuFRを、実施例3にて実施した。第1ラウンドにおいて、抗体上清 (ブレースホルダー鎖と関係した重鎖HuFRライブラリー) を、T-細胞シグナル伝達および引き続いてアポトーシスを誘発する抗体変異体の能力を測定するハイスループットアッセイでスクリーニングした。1つの実験ランにおいて、一次スクリーニングから326ヒットを選択し、52ヒットを確認し、そしてトップ10重鎖ヒットを選択した。表CとDはトップ重鎖と軽鎖配列 (表1~4

50

を参照)を示す

第2ラウンドにおいて、アポトーシスアッセイにより同定したトップ10の再アSEMBルした重鎖遺伝子を次いでHuFR軽鎖ライブラリーと組合わせた。このライブラリーをスクリーニングして対照DVSA-CD3 (Fcヌル)と比較して同等もしくは改善された特性をもつ変異体を同定した。1つの実験において、一次スクリーニングから268ヒットを選択し、37ヒットを確認し、そしてトップ10重鎖ヒットを選択した。9通りの候補クローンを首尾よく再トランスフェクトし、確認アッセイでアッセイした(表B)。トップ重鎖と軽鎖に現れるICFを表CおよびDに示した。

【0191】

表B トップ抗CD3 HuFR抗体中の重鎖と軽鎖

HuFR抗体	重鎖ID	軽鎖ID
1	BD20610	BD21130
2	BD20613	BD21131
3	BD20611	BD21132
4	BD20611	BD21133
5	BD20611	BD21134
6	BD20611	BD21135
7	BD20611	BD21136
8	BD20611	BD21137
9	BD20613	BD21138

表C 抗CD3に対するトップ重鎖で用いたICF

重鎖ID	ICF1	ICF2	ICF3	ICF4
BD20610	GL_7a	GL_5	GL_4	GL1
BD20611	GL_7a	GL_5	GL_5	GL1
BD20613	GL_3	GL2_3	GL_3	GL1

表D 抗CD3に対するトップ 軽鎖で用いたICF

軽鎖ID	ICF1	ICF2	ICF3	ICF4
BD21130	VK1_2	VK7	VK8	VK1
BD21131	VK3	VK4_5_6	VK8	VK1
BD21132	VK5	VK1_2_3	VK3	VK1
BD21133	VK8	VK7	VK3	VK1
BD21134	VK4	VK7	VK3	VK1
BD21135	VK4	VK4_5_6	VK7	VK1
BD21136	VK3	VK1_2_3	VK6	VK1
BD21137	VK3	VK7	VK2	VK1
BD21138	VK3	VK1_2_3	VK8	VK1

図12は、トップ9の抗CD3ヒットにおける重鎖と軽鎖のアラインメントを与える。

【0192】

#### HuFRライブラリースクリーニング結果

トップ9のCD3抗体変異体重鎖および軽鎖候補をHEK-293懸濁液細胞中にトランスフェクトし、得られる細胞培養上清を、アポトーシス活性および熱安定性について試験した。ヒトフレームワーク再アSEMBリー反応を介して得た全部で9通りの変異体は、DVSA-CD3 (Fcヌル)と比較してin vitroで同等以上のアポトーシス活性を示した(表E)。ネガティブ

対照は無処理細胞（培地）および無関係なヒトIgG（huIgG）であった。

【0193】

表E HuFR抗体のApo-Oneアポトーシスアッセイ

	12.5 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	12.5 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml
培地	380	380	384			
huIgG	250	259	234			
Fc null	494	729	1191	1.0	1.0	1.0
変異体1	797	1217	1753	1.6	1.7	1.5
変異体2	854	1435	2156	1.7	2.0	1.8
変異体3	649	854	1132	1.3	1.2	1.0
変異体4	1390	2348	3303	2.8	3.2	2.8
変異体5	1163	1663	2165	2.4	2.3	1.8
変異体6	1277	2224	3498	2.6	3.1	2.9
変異体7	2268	3477	4744	4.6	4.8	4.0
変異体8	969	1632	2559	2.0	2.2	2.1
変異体9	885	1383	2041	1.8	1.9	1.7

10

#### 熱安定性

9通りのHuFR変異体を熱安定性アッセイについてもアッセイし、抗体の構造的整合性がいずれかのアミノ酸変化により損なわれていないことを保証した。ヒトフレームワーク再アセンブリー反応を介して得た前記9通りの変異体は、DVSA-CD3（Fcヌル）抗体より高い融点を有する。

20

【0194】

表F 9種の変異体の熱安定性はHuFRの影響を受けていなかった

本発明は、以下に変異体1～変異体9として記載した、抗原と結合することができて熱安定性のある結合活性を有するキメラポリペプチドを提供する。

【0195】

抗体	T <sub>m</sub> (°C)
DVSA-CD3 (Fc-null)	59.6
変異体1	66.5
変異体2	70.5
変異体3	64.7
変異体4	65.6
変異体5	67.7
変異体6	65.2
変異体7	65.5
変異体8	70.7
変異体9	63.5

30

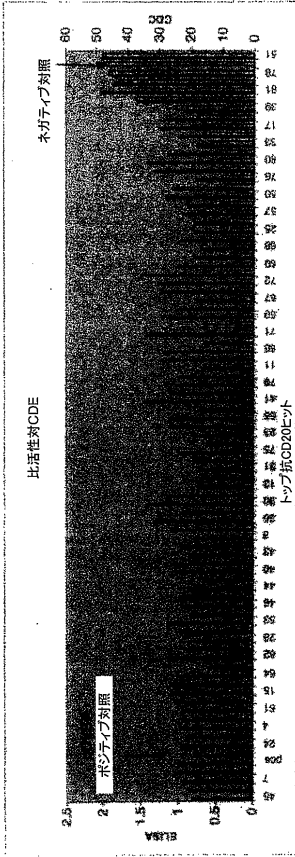
40

本出願において言及した全ての特許、特許出願、および刊行物の開示は全て本明細書に参照により組み入れられる。

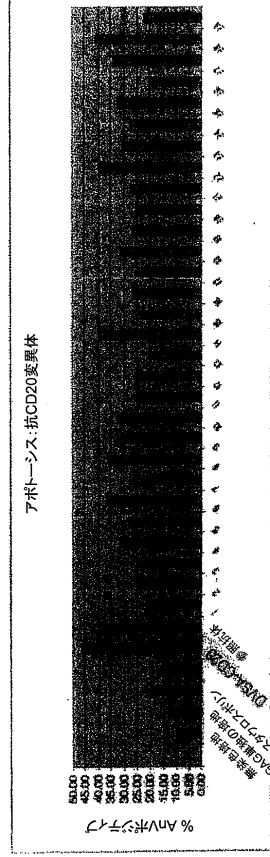




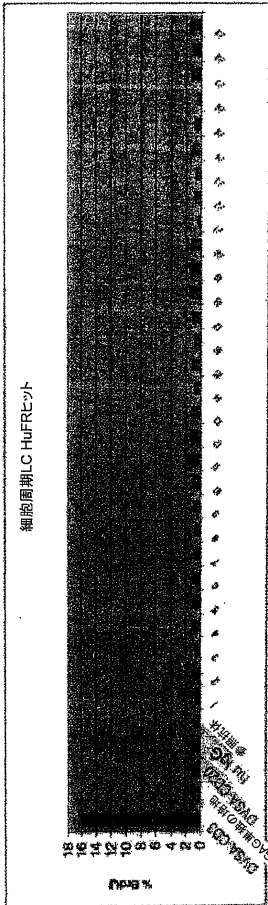
【 図 5 】



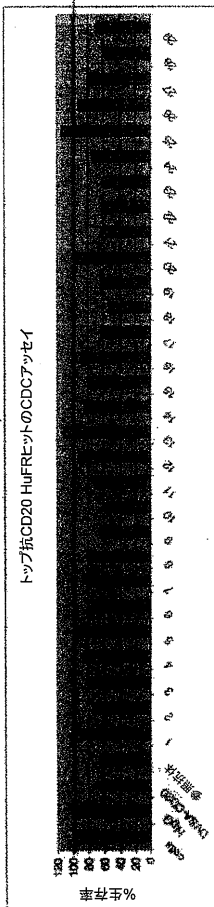
【 図 6 】



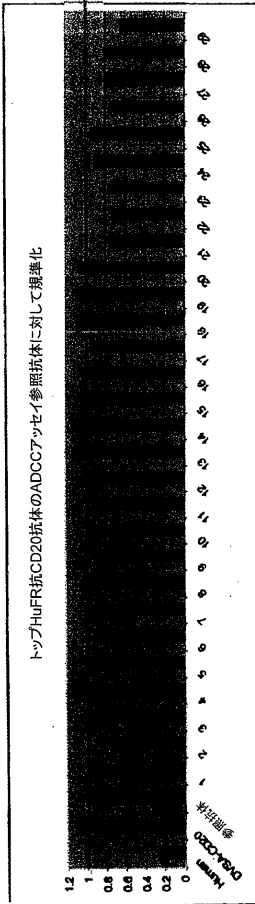
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】

**重鎖構築物** (SEQ ID NO : 356)

```

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTCTGTGGCTATTTTAAAGSTGTCCAGTGTGAGTCCAGCTGCRG
AGFTDGGGCTGAACTGGCAAGACTGGGGCTCACTGAGAGATGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTAC
TGGTTCACGATGCACTGGGTAAACAGAGGGCTGAGAGGGTCTGGAATGATTTGATACATTAATCTTACG
GTTGTTACTACTATTTACATTCAGAGTTCAAGGCAAGGCAACATTGACTACAGACAATCTCCAGCAGAC
CCTACATGCACTGAGGAGCTGGACTCTGGGACTCTGCACTTATTTCTGCAAGATATTTATGATGATCA
TTACTGCTTACTGACTAGGCGCAAGGCAACCTCTCAGCTCTCTCAGCTCTCCAGCCTCCAGCAGGCTTGG
TTCCCTGGGACCTCTCTCAGGAGCCTCTGGGCGCAGCAGGCTGGCTGCTGCTGCTCAAGGACTCTCT
TCCCGAACCGGCTGACGCTGTCTGAGGACTCAGGCGCTGACGAGGCTGACACCTTCCCGCTGCTCT
ACAGTCTCAGGACTCTACTCTCAGCAGCCTGGTACCGTGGCTCCAGCAGCTTGGGCAAGCAGCTTAC
ATCTGACAGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAGAGAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAA
CTCACACTGCCCAGCTGCCCAGCCTGACTCTGGGGGACCTCAGTCTTCTCTTCCCTTCCCGCAAAAC
CAGAGCAGCTCTGACTCTGGGACCTGGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG
GAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAG
ACAAACAGCAGCTACCGTGTGCTGAGGCTCTCAGCTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG
GTGCAAGGTCTCAACAAAGCCTCCAGCAGGCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTG
GAAACAGGTTGACACCTTCCCGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
TCAGAGCTTCTATCCAGCAGCTGCGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
CAGCAGGAGCCTCTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGT
CCCTGCTCCGGTAAATGA

```

**軽鎖構築物** (SEQ ID NO : 357)

```

ATGGACATGAGGTCCTCCCTCAGCTCTGGGCTCTGCTGCTCTGCTCCAGGTCGCAATGTCAAAATG
TCTCACCTGCTCCAGCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
AGTGTGAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
AAACTGCTTCTGGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GCATGGAGGCTGAGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GACAAAGTTGAAATFARACCGGCTGATGACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GAGCAGTGAATCTGAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AGTGTGAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CACCTACCTCAGCAGCCTGAGCTGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
GTACCCCTCAGGCTGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG

```

HuFr抗CD3に対する軽鎖(上段)と重鎖(下段)配列

【 図 11 】

**HC DVSA-CD3 (Fc Null)** (SEQ ID NO : 358)

```

MEFGLSNLFLVAALKGVQCVLQSQGAELARPGASVKMSCKASGYTFRTYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRG
YTNYNOKFKDKATLITDKSSSTAYMQLSLSLSEDSAVYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFLA
ESKSTSGGTALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNFKDKRUPESCKRPHCPDPAFLIGGSPVLEPDKPKATLMIKRTPEVTVVVDVSHEDPEVFNWY
DGVVFNKWKPREQNSVYVWYVTVLHDDIMNGKVKKVKSNKALPAPTKTISKAGQPRSPQVTLTPPS
RDELTKNOVSLTCLVKGVEYPSDIAVENESNGPENNYKTPPEVLDSGSPFLYSKLVDRKSRWQGNVFCSTVNH
EALHNHYTQKLSLSSEK

```

**HC DVSA-CD3** (SEQ ID NO : 359)

```

MEFGLSNLFLVAALKGVQCVLQSQGAELARPGASVKMSCKASGYTFRTYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRG
YTNYNOKFKDKATLITDKSSSTAYMQLSLSLSEDSAVYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFLA
ESKSTSGGTALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNFKDKRUPESCKRPHCPDPAFLIGGSPVLEPDKPKATLMIKRTPEVTVVVDVSHEDPEVFNWY
DGVVFNKWKPREQNSVYVWYVTVLHDDIMNGKVKKVKSNKALPAPTKTISKAGQPRSPQVTLTPPS
RDELTKNOVSLTCLVKGVEYPSDIAVENESNGPENNYKTPPEVLDSGSPFLYSKLVDRKSRWQGNVFCSTVNH
EALHNHYTQKLSLSSEK

```

**LC DVSA-CD3** (SEQ ID NO : 360)

```

MDMRVPAQLGGLLLWLPKAGKQIVLQSPAIMSASPGKVEYVITCSASSSVYMNWYQKSGTSPKRVIYDLSK
ASGVAHFRGSGSGTSLTISGMEADAATYVQQWSSNPFVFGSKLEINRADRTVAAPSVFIFPEDEPOLK
SGTASVVICLNNFYFRAKVKVKNVNLQNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSPADYKHKRYVACEVTHOGL
SSVYKSNVNGE

```

HuFr 抗体-CD3抗体に対する、軽鎖(上段)および重鎖

【 図 12 】

**トップ重鎖** (SEQ ID NOS : 361-363)

1	50
BD20610	QVQLVESGAEVKKPQASVKMSCKASGYTFRTYTMHWVKRPGQGLEWIMWY
BD20611	QVQLVESGAEVKKPQASVKMSCKASGYTFRTYTMHWVKRPGQGLEWIMWY
BD20613	QVQLVESGAEVKKPQASVKMSCKASGYTFRTYTMHWVKRPGQGLEWIMWY
51	100
BD20610	INPSRGYTNVYKPKDRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYCARYY
BD20611	INPSRGYTNVYKPKDRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYCARYY
BD20613	INPSRGYTNVYKPKDRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYCARYY
101	136
BD20610	DDHYCLDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
BD20611	DDHYCLDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
BD20613	DDHYCLDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK

**トップ(軽)々鎖** (SEQ ID NOS : 364-372)

1	55
BD21130	DIQMTQSPFSLASVGRVITCSASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
BD21131	DIQMTQSPFSLASVGRVITCSASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
BD21132	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
BD21133	DIQMTQSPFSLASVGRVITCSASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
BD21134	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
BD21135	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
BD21136	DIQMTQSPFSLASVGRVITCSASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
BD21137	DIQMTQSPFSLASVGRVITCSASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
BD21138	DIQMTQSPFSLASVGRVITCSASSSVYMNWYQKPGQPKLLIYDTSKLAS
56	106
BD21130	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK
BD21131	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK
BD21132	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK
BD21133	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK
BD21134	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK
BD21135	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK
BD21136	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK
BD21137	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK
BD21138	GVPDFRSGSGSTDFLLKISRVEADGVVYCCQWSSNPFVFGQTKVEIK

抗CD3抗体に対するHuFr HCおよびLC

【配列表】

2010513539000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/778568
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: C07K 16/18( 2006.01),16/28( 2006.01),16/30( 2006.01);A61K 39/395( 2006.01)  USPC: 424/133.1,134.1,138.1,144.1,153.1,155.1,156.1,174.1;530/387.3,388.22,388.73,388.8,388.85 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/133.1,134.1,138.1,144.1,153.1,155.1,156.1,174.1;530/387.3,388.22,388.73,388.8,388.85  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,L (not entitled to priority claim)	FAVRILLE, Press Releases, 9 August 2007, pages 1-6, <a href="http://ir.favrille.com/phoenix.zhtml?c=178404&amp;p=irol-newsArticle_Print&amp;ID=1038714&amp;hi">http://ir.favrille.com/phoenix.zhtml?c=178404&amp;p=irol-newsArticle_Print&amp;ID=1038714&amp;hi</a> , retrieved 12/20/07, see page 1, second paragraph and page 2.	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 20 December 2007 (20.12.2007)		Date of mailing of the international search report 28 JAN 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Ron Sonwadron, Ph.D. Telephone No. 571 272 1600

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US07/78568

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
WEST 2.1, MEDICINE/BIO TECH (DIALOG), search terms: cd20, verenium, diversa, icf?, indepently, consensused, framework,  
humaniz?, fr1, fr2, fr3, fr4, antibod?

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 9/08	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 31/22	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	A 6 1 P 31/18	
		A 6 1 P 31/22	
		C 1 2 N 15/00	C

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

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 フレイ, ゲルハルト

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州, サン ディエゴ, ピア シーマ ベージャ 1 3 7 6 8

(72)発明者 キンメル, ブルース, イー.

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サン ディエゴ, ジャカルテ コート 1 3 2 3 6

(72)発明者 アンダーソン, アブラハム

アメリカ合衆国 9 1 4 0 3 カリフォルニア州, シェルマン オークス, ウッドクリフ ロード 3 4 9 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA01 GA11 HA01

4C085 AA13 AA14 AA16 AA33 BB11 BB41 BB43 CC21 CC22 CC23

4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74