明　細　書

発明の名称 ： 抗Ｏｒａｉ１抗体

技術分野

[0001] 本発明は障害および疾患を治療するための、より強活性の抗Ｏｒａｉ１抗体取得に関する。

背景技術

[0002] カルシウム放出活性化カルシウム（ＣＲＡＣ）チャネルは、細胞内小胞体中のカルシウムストアの枯渇に反応して開かれるストア感受性チャネル（ＳＯＣ）のサブセットであり、特定の非興奮性細胞、特にＴ細胞や肥満細胞を包含する免疫系の細胞において、細胞外カルシウムの流入とそれに伴う細胞の活性化を担っている。ＣＲＡＣチャネル活性の阻害剤は当該技術分野で公知であり、それらの同定および治療可能性は、Ｆｅｓｋｅらによって記載されている（非特許文献１－２）。

[0003] Ｏｒａｉ１（ＣＲＡＣＭ１：カルシウム放出－活性化カルシウムモジュレーター１，　膜貫通蛋白１４２Ａ：ＴＭＥＭ１４２Ａ）は、３０１アミノ残基酸からなる４回膜貫通型の蛋白質で、ホモ４量体を形成することでＣＲＡＣチャネルの孔サブユニットを構成する成分として特定されている（特許文献１、非特許文献３－５）。ヒトＯｒａｉ１遺伝子は９０％以上の相同性を持つヒトＯｒａｉ２およびヒトＯｒａｉ３と共にＯｒａｉ遺伝子ファミリーを構成しており（非特許文献６）、一部の場合においてはＯｒａｉ２および／またはＯｒａｉ３蛋白とＯｒａｉ１を含有するヘテロ４量体や６量体が形成される可能性も報告されている（非特許文献７－８）。Ｏｒａｉ１は、細胞内小胞体中のカルシウムストア枯渇を感知する蛋白であるＳＴＩＭ－１（Ｓｔｒｏｍａｌ　ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ　１）またはＳＴＩＭ－２と共役するＮ末端およびＣ末端の細胞質内領域、４カ所の細胞膜貫通ドメイン、そして約２０アミノ酸残基からなる第１細胞外ループドメインと約４０アミノ酸残基からなる第２細胞外ループドメインで構成されて

いる（非特許文献９）。Ｏｒａｉ１のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列は公的データベース上に公開されており、例えばＮＭ＿０３２７９０、ＮＰ＿１１６１７９（ＮＣＢＩ）等のアクセッション番号により参照可能である。

[0004] ヒトＯｒａｉ１遺伝子の先天的な機能欠損により、ＣＲＡＣチャネル活性が失われ、免疫原に対する生体の反応が消失し、重度の免疫不全状態に陥ることが示されていることから、Ｏｒａｉ１の分子機能はＣＲＡＣチャネルの活性化に必須であると特定されている（非特許文献１０－１１）。従ってＯｒａｉ１分子を標的とした機能阻害抗体はＣＲＡＣチャネル活性の阻害剤となり得る。

[0005] ＣＲＡＣチャネル活性の阻害剤が免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、細胞や臓器の移植、血栓、癌などの患者を治療するために使用され得ることを示唆する情報から（非特許文献１２）、Ｏｒａｉ１の分子機能阻害を目指した抗Ｏｒａｉ１抗体の取得が試みられ、その効果が検討されている（非特許文献２－３、特許文献１３－１４）。これらは抗体単独でＴ細胞の活性化を抑制することを示しているが、その阻害活性強度はまだ十分ではなく、Ｏｒａｉ１を標的とする生物製剤として臨床適用する場合には、高い用量や頻回投与が必要となる、あるいは投与方法が限定されるなどの点において未充足医療ニーズが存在すると考えられる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第ＷＯ０７／０８１８０４号パンフレット

特許文献2：国際公開第ＷＯ１１／０６３２７７号パンフレット

特許文献3：国際公開第ＷＯ１３／０９１９０３号パンフレット

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｆｅｓｋｅ Ｓ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７，ｐ．６９０－７０２（２００７）

非特許文献2：Ｄｅｒｌｅｒ Ｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ３（７），ｐ．７８７－８００（２００８

)

非特許文献3：Ｐｒａｋｒｉｙａ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４４３，ｐ．２３０－２３３（２００６）

非特許文献4：Ｖｉｇ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３１２，ｐ．１２２０－１２２３（２００６）

非特許文献5：Ｐａｒｋ ＣＹ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １３６，ｐ．８７６－８９０（２００８）

非特許文献6：Ｍｅｒｃｅｒ ＪＣ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８１，ｐ．２４９７９－２４９９０（２００６）

非特許文献7：Ｇｗａｃｋ Ｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８２，ｐ．１６２３２－１６２４３（２００７）

非特許文献8：Ｈｏｕ Ｘ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３８，ｐ．１３０８－１３１３（２０１２）

非特許文献9：Ｖｉｇ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ． １６，ｐ．２０７３－２０７９（２００６）

非特許文献10：Ｆｅｓｋｅ Ｓ，Ｎａｔｕｒｅ ４４１，ｐ．１７９－１８５（２００６）

非特許文献11：ＭｃＣａｒｌ ＣＡ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ． １２４，ｐ．１３１１－１３１８（２００９）

非特許文献12：ＭｃＣａｒｌ ＣＡ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ． １８５，ｐ．５８４５-５８５８（２０１０）

非特許文献13：Ｌｉｎ Ｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．３４５，ｐ．２２５－２３８（２０１３）

非特許文献14：Ｃｏｘ ＪＨ，ｅｔ ａｌ．，ＰＬＯＳ ＯＮＥ ８（１２），ｅ８２９４４（２０１３）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、移植物の拒絶、免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、血栓、癌等の治療および／または予防剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、移植物の拒絶、免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、血栓、癌の治療および／または予防効果を有する物質を探索する目的で、ラット抗Ｏｒａｉ１抗体を取得した。得られたラット抗Ｏｒａｉ１抗体をヒト化し、さらに当該ヒト化抗体のＣＤＲ、フレームワークおよび可変領域を改変して本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

（１）配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０４、１０６、１０７または１０８のいずれか一つに示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１０９または１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３、９４または９５のいずれか一つに示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６、９７または９８のいずれか一つに示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（２）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤ

ＲＬ２は配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする（１）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（３）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９４に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９７に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする（１）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（４）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９５に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９８に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする（１）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（５）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする（１）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（６）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０８に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする（１）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（７）重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０４に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１０９に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする（１）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（８）配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むこ

とを特徴とする（１）または（２）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（９）配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（８）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１０）配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（８）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１１）配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１）または（３）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１２）配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（１１）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１３）配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号６０に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１）または（４）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１４）配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または

２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号６０に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（１３）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１５）配列番号６４に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１）または（５）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１６）配列番号６４に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（１５）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１７）配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１）または（６）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１８）配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（１７）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（１９）配列番号４３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする（１）または（７）に記載の抗体または該抗体の抗原結合

性断片。

（２０）配列番号４３に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３５番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする（１９）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（２１）Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’およびＦｖからなる群から選択される、（１）乃至（２０）のいずれか一つに記載の抗体の抗原結合性断片。

（２２）ｓｃＦｖであることを特徴とする、（１）乃至（８）、（１１）、（１３）、（１５）、（１７）または（１９）のいずれか一つに記載の抗体。

（２３）（１）乃至（２２）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

（２４）移植物の拒絶、免疫関連疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、癌の治療および／または予防剤、抗血小板または抗血栓活性剤、Ｏｒａｉ１発現細胞活性化抑制剤であることを特徴とする、（２３）に記載の医薬組成物。

（２５）移植物の拒絶が、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、皮膚等の臓器もしくは組織の移植に対する拒絶反応および宿主対移植片反応、そして造血細胞（骨髄、末梢血、臍帯血等）の移植によって起こる移植片対宿主病であることを特徴とする、（２４）に記載の医薬組成物。

（２６）免疫関連疾患が、結合組織や筋骨格系（関節リウマチ、強直性脊椎炎、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発筋炎、皮膚筋炎など）、血液系（再生不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病など）、消化器系（クローン病、潰瘍性大腸炎など）、神経系（多発性硬化症、重症筋無力症など）、視覚系（ブドウ膜炎など）、血管系（ベーチェット病、ヴェゲナー肉芽腫症など）、表皮系（乾癬、天疱瘡、白斑など）、内分泌系（１型糖尿病、自己免

疫甲状腺炎、バセドウ病、橋本病など）等であること、アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎、喘息、アナフィラキシー、アナフィラキシー様反応、食物アレルギー、鼻炎、中耳炎、薬物反応、昆虫刺傷反応、植物反応、ラテックスアレルギー、結膜炎、じんま疹等であること、炎症性疾患が炎症性腎疾患（糸球体腎炎、ネフローゼなど）、炎症性肺疾患（慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、間質性肺炎など）、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、回腸炎など）、炎症性肝疾患（自己免疫肝炎、ウイルス肝炎など）、炎症性心疾患（心筋炎、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症など）、炎症性皮膚疾患（接触性皮膚炎、湿疹など）、炎症性眼疾患（トラコーマ、眼内炎など）、炎症性中枢神経疾患（髄膜炎、脳脊髄炎、自己免疫脳炎など）、関節の炎症性疾患（例えば関節炎、骨関節炎など）、全身性炎症（敗血症、出血、過敏症、癌化学療法などに起因するショック症状など）等であることを特徴とする、（２４）に記載の医薬組成物。

（２７）癌の治療および／または予防が乳癌、肺癌、皮膚癌、白血病等であること、抗血小板または抗血栓活性が治療および／または予防に役立つ例が心筋梗塞、脳卒中、虚血性心疾患、血栓症等であること、Ｏｒａｉ１発現細胞活性化抑制が治療および／または予防に役立つ例がマスト細胞白血病、マスト細胞症、好塩基性白血病、子宮内膜症、小管集合性ミオパチー、ストールモルケン症、関節リウマチ、強直性脊椎炎、アトピー性皮膚炎等であることを特徴とする、（２４）記載の医薬組成物。

（２８）（１）乃至（２２）のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片をコードするポリヌクレオチド。

（２９）（２８）に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター。

（３０）（２８）に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む形質転換宿主細胞。

（３１）（２９）に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

（３２）（３０）または（３２）に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から

抗体を精製する工程を含む（１）乃至（２２）のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片の生産方法。

（３３）配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が８０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（３４）ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が１０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、（３３）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（３５）配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ）が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が１００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（３６）ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が２０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、（３５）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（３７）配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＦＮ－γ量を５０％阻害する濃度が８００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片。

（３８）ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＦＮ－γ量を５０％阻害する濃度が４０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、（３７）に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、ＣＲＡＣチャネルの活性阻害を作用機序とする、移植物の拒絶、免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、血栓、癌の治療剤および／または予防剤を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、Ｒ１１８およびＲ１９８が、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に濃度依存的に結合することを示した図である。

[図2]図２は、Ｒ１１８およびＲ１９８が、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示した図である。

[図3]図３は、ｃＲ１１８およびｃＲ１９８が、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に濃度依存的に結合することを示した図である。

[図4]図４は、ｃＲ１１８およびｃＲ１９８が、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示した図である。

[図5]図５は、ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体ｈＲ１９８＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＲ１９８＿Ｈ２／Ｌ２、ｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３、ｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４が、親抗体のｃＲ１１８、ｃＲ１９８と同様に、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に濃度依存的に結合することを示した図である。

[図6]図６は、ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体が、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示した図である。

[図7]図７は、リボソームディスプレイにより得られた変異導入ＦａｂクローンＬＣＤＲ６０、ＬＣＤＲ６７、ＬＣＤＲ８３、ＣＥ１５１、ＰＥ０５７、ＨＣＤＲ０４６、ＨＣＤＲ０４７、ＨＥＰ０８７、ＨＥＰ１２４およびＨＥＰ２３７が、親抗体ＦａｂであるｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４－Ｆａｂと比較して、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に強く結合することを示した図である。

[図8]図８は、アフィニティマチュレーション抗体ｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ２、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ３、ｈＲ１９８＿ＨＧ２／ＬＧ１およびｈＲ１９８＿ＨＧ３／ＬＧ１が、親抗体であるｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３およびｈＲ１９８＿Ｈ４

／Ｌ４と比較して、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に同等以上に結合することを示した図である。

[図9]図９は、アフィニティマチュレーション抗体が、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示した図である。

[図10]図１０は、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、１７Ｆ６抗体が、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に結合することを示した図である。

[図11]図１１は、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、および５Ｈ３．１抗体が、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に結合することを示した図である。

[図12]図１２は、抗Ｏｒａｉ１モノクローナル抗体が、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示した図である。

[図13]図１３は、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、および１７Ｆ６のＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２放出に対する半数阻害濃度（IC_{50}）および８０％阻害濃度（IC_{80}）を示した図である。

[図14]図１４は、Ｒ１１８軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および該可変領域のアミノ酸配列を示した図である。

[図15]図１５は、Ｒ１１８重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および該可変領域のアミノ酸配列を示した図である。

[図16]図１６は、Ｒ１９８軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および該可変領域のアミノ酸配列を示した図である。

[図17]図１７は、Ｒ１９８重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および該可変領域のアミノ酸配列を示した図である。

[図18]図１８は、ヒトキメラ化ｃＲ１１８軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図19]図１９は、ヒトキメラ化ｃＲ１９８軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図20]図２０は、ヒトキメラ化ｃＲ１１８重鎖をコードするヌクレオチド配列および重軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図21]図２１は、ヒトキメラ化ｃＲ１９８重鎖をコードするヌクレオチド配列および重軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図22]図２２は、ｈＲ１９８＿Ｌ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図23]図２３は、ｈＲ１９８＿Ｌ２タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図24]図２４は、ｈＲ１９８＿Ｌ３タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図25]図２５は、ｈＲ１９８＿Ｌ４タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図26]図２６は、ｈＲ１９８＿Ｈ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図27]図２７は、ｈＲ１９８＿Ｈ２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図28]図２８は、ｈＲ１９８＿Ｈ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図29]図２９は、ｈＲ１９８＿Ｈ４タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図30]図３０は、ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図31]図３１は、ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図32]図３２は、ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図33]図３３は、ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図34]図３４は、ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図35]図３５は、ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図36]図３６は、ｈＲ１９８＿Ｈ４－ＬＡＬＡタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図37]図３７は、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図38]図３８は、ｃＲ１１８、ｃＲ１９８、ｈＲ１９８＿Ｌ１乃至Ｌ４およびｈＲ１９８＿ＬＧ１乃至Ｌｇ３の各軽鎖、ならびにｃＲ１１８、ｃＲ１９８、ｈＲ１９８＿Ｈ１乃至Ｈ４、ｈＲ１９８＿ＨＧ１乃至ＨＧ３、ｈＲ１９８＿Ｈ４－ＬＡＬＡおよびｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡの各重鎖に含まれるＣＤＲ配列と対応する配列番号を示した図である。

[図39]図３９は、２Ｃ１．１抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図40]図４０は、２Ｃ１．１抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図41]図４１は、５Ｈ３．１抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図42]図４２、５Ｈ３．１抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図43]図４３は、１０Ｆ８抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図44]図４４は、１０Ｆ８抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図45]図４５は、１４Ｆ７４抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列および

該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図46]図４６は、１４Ｆ７４抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図47]図４７は、１７Ｆ６抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図48]図４８は、１７Ｆ６抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図49]図４９は、ｈＲ１９８＿ＨＯタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図50]図５０は、ｈＲ１９８＿Ｈ５タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を示した図である。

[図51]図５１は、抗Ｏｒａｉ１モノクローナル抗体が、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示した図である。

[図52]図５２は、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、および１７Ｆ６のヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２放出に対する半数阻害濃度（$ＩＣ_{50}$）および８０％阻害濃度（$ＩＣ_{80}$）を示した図である。

[図53]図５３は、抗Ｏｒａｉ１モノクローナル抗体が、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣからのＩＦＮγの放出を添加濃度依存的に抑制することを示した図である。

[図54]図５４は、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、および１７Ｆ６のヒトＰＢＭＣからのＩＦＮγ放出に対する半数阻害濃度（$ＩＣ_{50}$）および８０％阻害濃度（$ＩＣ_{80}$）を示した図である。

[図55]図５５は、重度複合免疫不全マウスにヒトＰＢＭＣを移入することで発症する移植片対宿主病に伴う体重減少をｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１が抑制することを示した図である。

[図56]図５６は、Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスに誘導した受動皮膚アナフィラキシー反応をｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１が抑制することを示した図である。

[図57]図５７は、Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスに誘導した遅延型過敏反応を、抗原投与後６時間（Ａ）２４時間（Ｂ）４８時間（Ｃ）の各時点でｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１が抑制していることを示した図である。

[図58]図５８は、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、および２Ｃ１．１抗体の９０ｍｇ／ｍＬ、１２０ｍｇ／ｍＬ、１５０ｍｇ／ｍＬの各濃度で測定した粘度を示した図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本明細書中において、「遺伝子」という語には、ＤＮＡのみならずｍＲＮＡ、ｃＤＮＡおよびｃＲＮＡも含まれるものとする。

[0014] 本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、ＤＮＡ、ＲＮＡ、プローブ、オリゴヌクレオチド、およびプライマーも含まれている。

[0015]

本明細中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。

[0016] 本明細書中において、「ＲＮＡ画分」とは、ＲＮＡを含んでいる画分をいう。

[0017] 本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

[0018] 本明細書中において、「Ｏｒａｉ１」は、Ｏｒａｉ１蛋白質と同じ意味で用いている。

[0019]

本明細書中における「抗体の抗原結合性断片」とは、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味しており、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｓ

ｃＦｖ、ｄｉａｂｏｄｙ、線状抗体、および抗体断片より形成された多特異性抗体等を含む。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の抗原結合性断片に含まれる。但し、抗原との結合能を有している限りこれらの分子に限定されない。また、これらの抗原結合性断片には、抗体蛋白質の全長分子を適当な酵素で処理したもののみならず、遺伝子工学的に改変された抗体遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された蛋白質も含まれる。

[0020] 抗体分子の重鎖および軽鎖にはそれぞれ３箇所の相補性決定領域（ＣＤＲ：Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ）があることが知られている。相補性決定領域は、超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎ）とも呼ばれ、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖および軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ３ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３と表記し、軽鎖の相補性決定領域を軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

[0021] 本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）中、６８℃でハイブリダイズすること、または、ＤＮＡを固定したフィルターを用いて０．７－１．０ＭのＮａＣｌ存在下６８℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１－２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度ＳＳＣとは１５０ ｍＭ ＮａＣｌ、１５ ｍＭ クエン酸ナトリウムからなる）を用い、６８℃で洗浄することにより同定することができる条件またはそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

[0022] 本発明において、「宿主対移植片反応」とは、臓器移植後に観察される被移植者の免疫亢進状態およびこれによる移植臓器の傷害をいう。

[0023] 本発明において、「移植片対宿主病」とは、造血細胞移植後の移植細胞による被移植者への免疫的攻撃によって発症する症状をいう。

[0024] １．Ｏｒａｉ１

本発明で用いるＯｒａｉ１は、ヒト、ヒト以外の哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）あるいはニワトリのＴ細胞あるいは肥満細胞から直接精製して使用するか、あるいは上記の細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、Ｏｒａｉ１をｉｎ ｖｉｔｒｏにて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、Ｏｒａｉ１ ｃＤＮＡを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質およびエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、または真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってＯｒａｉ１を発現させることにより、該蛋白質を得ることが出来る。

[0025] ヒトＯｒａｉ１のｃＤＮＡのヌクレオチド配列は、ＧｅｎＢａｎｋにアクセッション番号：ＮＭ＿０３２７９０で登録されている。マウスＯｒａｉ１のｃＤＮＡのヌクレオチド配列は、ＧｅｎＢａｎｋにアクセッション番号：ＮＭ＿１７５４２３で登録されている。ヒトＯｒａｉ１をコードするヌクレオチド配列は配列表の配列番号１に記載されており、ヒトＯｒａｉ１のアミノ酸配列は配列表の配列番号２に記載されている。なお、Ｏｒａｉ１は、Ｃａｌｃｉｕｍ Ｒｅｌｅａｓｅ－Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃａｌｃｉｕｍ Ｍｏｄｕｌａｔｏｒ １（ＣＲＡＣＭ１）またはＴｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ １４２Ａ（ＴＭＥＭ１４２Ａ）と呼ばれることがあり、これらは全て同じ分子を示している。

[0026] Ｏｒａｉ１のｃＤＮＡは例えば、Ｏｒａｉ１のｍＲＮＡを発現している臓器のｃＤＮＡライブラリーを鋳型として、Ｏｒａｉ１のｃＤＮＡを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「ＰＣＲ」という

）（Ｓａｉｋｉ，Ｒ．　Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，（１９８８）２３９，４８７－４９）を行なう、いわゆるＰＣＲ法により取得することができる。

[0027] なお、ヒトまたはマウスのＯｒａｉ１をコードするヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、Ｏｒａｉ１と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもＯｒａｉ１のｃＤＮＡに含まれる。さらに、ヒトもしくはマウスＯｒａｉ１遺伝子座から転写されるスプライシングバリアントまたはこれにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ、Ｏｒａｉ１と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドもＯｒａｉ１のｃＤＮＡに含まれる。

[0028] また、ヒトまたはマウスのＯｒａｉ１のアミノ酸配列、またはこれらの配列からシグナル配列が除かれたアミノ酸配列において、１個、２もしくは３個または４もしくは５個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたアミノ酸配列からなり、Ｏｒａｉ１と同等の生物活性を有する蛋白質もＯｒａｉ１に含まれる。さらに、ヒトまたはマウスＯｒａｉ１遺伝子座から転写されるスプライシングバリアントにコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において、１個、２もしくは３個または４もしくは５個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、Ｏｒａｉ１と同等の生物活性を有する蛋白質もＯｒａｉ１に含まれる。

[0029] ２．抗Ｏｒａｉ１抗体の製造

本発明のＯｒａｉ１に対する抗体は、常法を用いて、Ｏｒａｉ１またはＯｒａｉ１のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原となるＯｒａｉ１の生物種はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来するＯｒａｉ１を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種Ｏｒａｉ１に結合する抗体とヒトＯｒａｉ１との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる

。なお、抗原となるＯｒａｉ１はＯｒａｉ１遺伝子を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、Ｏｒａｉ１遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したＯｒａｉ１を精製すればよい。

[0030] 本発明のＯｒａｉ１に対する抗体は、ＤＮＡ免疫法を使用して得ることもできる。ＤＮＡ免疫法とは、抗原発現プラスミドをマウスやラットなどの動物個体に遺伝子導入し、抗原を個体内で発現させることによって、抗原に対する免疫を誘導する手法である。遺伝子導入の手法には、直接プラスミドを筋肉に注射する方法や、プラスミドとリポソームやポリエチレンイミンなどの複合体を静脈注射する方法、ウイルスベクターを用いる手法、プラスミドを付着させた金粒子をＧｅｎｅ Ｇｕｎにより射ち込む手法、急速に大量のプラスミド溶液を静脈注射するＨｙｄｒｏｄｙｎａｍｉｃ法などが存在する。発現プラスミドの筋注による遺伝子導入法に関して、発現量を向上させる手法として、プラスミドを筋注後、同部位にエレクトロポレーションを加えるｉｎ ｖｉｖｏ ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎという技術が知られている（Ａｉｈａｒａ Ｈ, Ｍｉｙａｚａｋｉ Ｊ. Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ. １９９８ Ｓｅｐ；１６（９）：８６７－７０またはＭｉｒ ＬＭ, Ｂｕｒｅａｕ ＭＦ, Ｇｅｈｌ Ｊ, Ｒａｎｇａｒａ Ｒ, Ｒｏｕｙ Ｄ, Ｃａｉｌｌａｕｄ ＪＭ, Ｄｅｌａｅｒｅ Ｐ, Ｂｒａｎｅｌｌｅｃ Ｄ, Ｓｃｈｗａｒｔｚ Ｂ, Ｓｃｈｅｒｍａｎ Ｄ. Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ. １９９９ Ａｐｒ １３；９６（８）：４２６２－７.）。本手法はプラスミドの筋注前にヒアルロニダーゼで筋肉を処理することにより、さらに発現量が向上する（ＭｃＭａｈｏｎ ＪＭ１, Ｓｉｇｎｏｒｉ Ｅ, Ｗｅｌｌｓ ＫＥ, Ｆａｚｉｏ ＶＭ, Ｗｅｌｌｓ ＤＪ. Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ. ２００１ Ａｕｇ；８（１６）：１２６４－７０）。

[0031] また、公知の方法（例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ, Ｎａｔｕｒｅ （１９７５）２５６, ｐ. ４９５－４９７、Ｋｅｎｎｅｔ,

Ｒ．ｅｄ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｐ．３６５－３６７，Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９８０））に従って、Ｏｒａｉ１に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによりハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。このような方法の具体的な例は、国際公開第ＷＯ０９／４８０７２号パンフレット（２００９年４月１６日公開）および第ＷＯ１０／１１７０１１号（２０１０年１０月１４日公開）パンフレットに記載されている。

[0032] このようにして樹立されたラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体の実例としては、Ｒ１１８抗体およびＲ１９８抗体を挙げることができる。Ｒ１１８抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号１１に、Ｒ１１８抗体の重鎖可変領域の配列は配列表の配列番号１３にそれぞれ示されている。また、Ｒ１９８抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号１５に、Ｒ１９８抗体の重鎖可変領域の配列は配列表の配列番号１７にそれぞれ示されている。

[0033] 本発明の抗体には、上記のＯｒａｉ１に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Ｃｈｉｍｅｒｉｃ）抗体、ヒト化（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体、ヒト抗体なども含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0034] キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウスまたはラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８１，６８５１－６８５５，（１９８４）参照）。

[0035] ラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体Ｒ１１８由来のキメラ抗体は、配列番号２３の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号２７の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体を挙げることができる。このようなＲ１１８由来の

キメラ抗体の一例としては、配列番号２３の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号２７の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体を挙げることができる。本明細書においては、前記の抗体を「ｃＲ１１８」あるいは「ｃＲ１１８抗体」と呼称する。

[0036] また、ラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体Ｒ１９８由来のキメラ抗体は、配列番号２５の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖、および配列番号２９の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体を挙げることができる。このようなＲ１９８由来のキメラ抗体の一例としては、配列番号２５の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号２９の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体を挙げることができる。本明細書においては、前記の抗体を「ｃＲ１９８」あるいは「ｃＲ１９８抗体」と呼称する。

[0037] 上記のＯｒａｉ１に対するキメラ抗体の配列を、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変して、遺伝子組換え型抗体であるヒト化（Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ）抗体を作製することができる。本発明の抗体には、前記ヒト化抗体のＣＤＲを改変した抗体が含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0038]

ヒト化抗体としては、相補性決定領域（ＣＤＲ；ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ ｒｅｇｉｏｎ）のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体（Ｎａｔｕｒｅ（１９８６）３２１，ｐ．５２２－５２５参照）、ＣＤＲの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体（国際公開第ＷＯ９０／０７８６１号パンフレット）を挙げることができる。

[0039] ｃＲ１１８およびｃＲ１９８抗体由来のヒト化抗体は、ｃＲ１１８またはｃＲ１９８に由来する６種全てのＣＤＲ配列を保持し、Ｔ細胞の活性化を抑制する活性を有している。なお、前記のヒト化抗体の軽鎖可変領域は、配列

番号９２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＲＡＳＱＳＩＧＮＳＬＳ）または配列番号１１６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＲＡＳＱＳＩＳＮＳＬＳ）のいずれか一つ、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＳＴＳＴＬＥＳ）、および配列番号９９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＬＱＦＡＴＦＰＤＴ）または配列番号１００に示されるＣＤＲＬ３（ＬＱＦＡＴＹＰＤＴ）のいずれか一つを保有している。また、ヒト化抗体の重鎖可変領域は、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＡＹＹＩＳ）または配列番号１０３に示されるＣＤＲＨ１（ＳＹＹＩＳ）のいずれか一つ、配列番号１０４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＹＩＤＭＧＮＧＲＴＮＹＮＡＲＦＫＧ）または配列番号１０５に示されるＣＤＲＨ２（ＹＶＤＭＧＮＧＲＴＮＹＮＥＫＦＫＧ）のいずれか一つ、および配列番号１０９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＤＳＮＷＧＶＤＹ）を保有している。なお、上記のＣＤＲのアミノ酸配列は、図３８にも記載されている。

[0040] 好適なＣＤＲの組み合わせを有する抗体としては、配列番号９２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、配列番号１００に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、配列番号１０３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１０５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、および配列番号１０９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む抗体、ならびに配列番号９２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、配列番号９９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１０４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、および配列番号１０９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む抗体を挙げることができる。

[0041] 上記のヒト化抗体の好適な事例としては、配列番号３１の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号３９の

２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体、配列番号３３の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号４１の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体、配列番号３５の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号４３の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体、ならびに配列番号３７の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号４５の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0042] さらに好適な事例としては、配列番号３１の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号３９の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、配列番号３３の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号４１の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、配列番号３５の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号４３の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、ならびに配列番号３７の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号４５の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0043] 本発明の抗体は、上記のヒト化抗体にさらに変異を導入して、Ｏｒａｉ１に対する結合能を更新させたものであっても良い。このような手法はアフィニティマチュレーションと呼ばれるが、具体的な方法としてリボゾームディスプレイ法を挙げることができる。リボゾームディスプレイ法は、蛋白質とその遺伝子情報であるｍＲＮＡがリボソームを介して結合した三者複合体を用い、標的分子と結合する蛋白質の遺伝子配列を単離する方法である（Ｓｔａｆｆｏｒｄ ＲＬ． ｅｔ． ａｌ． Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ． Ｄｅｓ． Ｓｅｌ． ２０１４（４）：９７－１０９．）。

[0044] 上記の方法によって、遺伝子改変を加えた抗体の軽鎖可変領域は、配列番

号９３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＲＡＳＱＳＩＧＧＳＬＳ）、配列番号９４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＨＡＳＱＮＩＧＧＳＬＳ）または配列番号９５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１（ＨＡＳＲＮＩＧＧＳＬＳ）のいずれか一つ、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＳＴＳＴＬＥＳ）、配列番号９７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＬＴＳＴＬＤＷ）または配列番号９８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２（ＬＴＳＳＬＤＷ）のいずれか一つ、および配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３（ＬＱＦＡＩＦＰＤＳ）を保有している。また、遺伝子改変を加えた抗体の重鎖可変領域は、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１（ＡＹＹＩＳ）、配列番号１０４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＹＩＤＭＧＮＧＲＴＮＹＮＡＲＦＫＧ）、配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＹＩＤＭＧＮＧＲＴＤＹＮＡＲＦＫＧ）、配列番号１０７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２（ＹＩＤＭＧＮＧＲＴＤＹＮＧＲＦＫＧ）または配列番号１０８に示されるＣＤＲＨ２（ＹＩＤＭＧＮＧＲＴＤＹＮＭＲＦＫＧ）のいずれか一つ、および配列番号１０９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＤＳＮＷＧＶＤＹ）または配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３（ＤＳＮＷＧＡＤＹ）を保有している。なお、上記のＣＤＲのアミノ酸配列は、図３８にも記載されている。

[0045] 好適なＣＤＲの組み合わせを有する抗体としては、配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、および配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む抗体、配列番号９４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列から

なるＣＤＲＬ３、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、および配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む抗体、配列番号９５に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、および配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む抗体、配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１０７に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、および配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む抗体、配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１０８に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、および配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む抗体、ならびに配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ１、配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ２、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＬ３、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ１、配列番号１０４に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ２、配列番号１０９に示されるアミノ酸配列からなるＣＤＲＨ３を含む抗体を挙げることができる。

[0046] 上記のＣＤＲ抗体の好適な事例としては、配列番号５６の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号６２の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体、配列番号５８の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可

変領域を含む軽鎖および配列番号６２の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体、配列番号６０の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号６２の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体、配列番号５６の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号６４の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体、配列番号５６の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号６６の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体、ならびに配列番号５６の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域を含む軽鎖および配列番号４３の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域を含む重鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0047] 上記の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む好適な抗体としては、配列番号５６の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号６２の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、配列番号５８の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号６２の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、配列番号６０の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号６２の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、配列番号５６の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号６４の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、配列番号５６の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号６６の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、ならびに配列番号５６の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号４３の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、を挙げることができる。

[0048] 正常のヒトＯｒａｉ１発現細胞への細胞傷害を回避するために、抗体のエ

フェクター活性は低いことが望ましい。エフェクター活性は抗体のサブクラスによって異なることが知られている。ＩｇＧ４はＡＤＣＣ、ＣＤＣ活性が低く、ＩｇＧ２はＣＤＣ活性を有するが、ＡＤＣＣ活性は低い、などの特徴が見られる。この特徴より、ＩｇＧ１の定常領域をＩｇＧ２、４の定常領域に置換することによってＡＤＣＣ，、ＣＤＣ活性を低減させた抗体を作製することが可能である。また、ＩｇＧ１の定常領域の一部の配列をＩｇＧ２、４を参考にして置換することにより、ＡＤＣＣ、ＣＤＣ活性を低減させたＩｇＧ１抗体を作製することが可能である。一例として、Ｍａｒｊａｎ Ｈｅｚａｒｅｈ ｅｔ．ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，７５（２４）：１２１６１－１２１６８（２００１）によれば、ＩｇＧ１の２３４番目、２３５番目のロイシン残基（数字はＫａｂａｔらによるＥＵインデックス）をそれぞれアラニン残基に置換すると、ＡＤＣＣ、ＣＤＣ活性が低下することが示されている。

[0049] 上記の方法によって作製された抗Ｏｒａｉ１抗体の例として、配列番号６８または７０に記載の重鎖配列を挙げることができる。配列番号は７０または７２に記載の重鎖は、本明細書に記載の各軽鎖配列と組み合わせて、治療用抗体として使用することが可能である。組み合わせる軽鎖の具体例として、配列番号３１、３３、３５、３７、５６、５８または６０に記載の抗体を挙げることができる。好適な軽鎖と重鎖の組み合わせた抗体としては、配列番号５６の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号７０の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、配列番号５８の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号７０の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体、ならびに配列番号６０の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖および配列番号７０の２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0050] なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｈｒｏｍ

ａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，７０５：１２９－１３４（１９９５））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの２アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３６０：７５－８３（２００７））。しかし、これらの重鎖配列の欠失および修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用など）には影響を及ぼさない。従って、本発明には当該修飾を受けた抗体も含まれ、重鎖カルボキシル末端において１または２つのアミノ酸が欠失した欠失体、およびアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等を挙げることができる。但し、抗原結合能およびエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する２本の重鎖は、完全長および上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であっても良いし、いずれか二種を組み合わせたものであっても良い。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類および培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては２本の重鎖の双方でカルボキシル末端の１つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。すなわち配列表に記載の配列番号２７、２９、３９、４１、４３、４５、６２、６４、６６、６８、および７０に示される各重鎖配列の２０乃至４６５番目のアミノ酸残基からなる重鎖、または２０乃至４６４番目のアミノ酸残基からなる重鎖も本発明の抗体に使用することができる。

[0051] 以上の方法によって得られた抗体は、抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査カロリメトリー（ＤＳＣ）は、蛋白の相対的構造安定性の良い指標となる熱変性中点（Ｔｍ）を素早く、また正確に測定することができる方法である。ＤＳＣを用いてＴｍ値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較する

ことができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性とある程度の相関を示すことが知られており（Ｌｏｒｉ Ｂｕｒｔｏｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７）１２，ｐ．２６５－２７３）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、および水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

[0052] また、抗体の重鎖および軽鎖の全長配列を適切なリンカーを用いて連結し、一本鎖イムノグロブリン（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）を取得する方法も知られている（Ｌｅｅ，Ｈ－Ｓ，ｅｔ．ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９９９）３６，ｐ．６１－７１；Ｓｈｉｒｒｍａｎｎ，Ｔ．ｅｔ．ａｌ．，ｍＡｂｓ（２０１０），２，（１）ｐ．１－４）。このような一本鎖イムノグロブリンは二量体化することによって、本来は四量体である抗体と類似した構造と活性を保持することが可能である。また、本発明の抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、軽鎖配列を有さない抗体であっても良い。このような抗体は、単一ドメイン抗体（ｓｉｎｇｌｅ ｄｏｍａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ：ｓｄＡｂ）またはナノボディ（ｎａｎｏｂｏｄｙ）と呼ばれており、実際にラクダまたはラマで観察され、抗原結合能が保持されていることが報告されている（Ｍｕｙｌｄｅｍａｎｓ Ｓ．ｅｔ．ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．（１９９４）７（９），１１２９－３５，Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ Ｃ．ｅｔ．ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９３）３６３（６４２８）４４６－８）。上記の抗体は、本発明における抗体の抗原結合性断片の一種と解釈することも可能である。

[0053] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節することによって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節

技術としては、ＷＯ９９／５４３４２、ＷＯ００／６１７３９、ＷＯ０２／３１１４０等が知られているが、これらに限定されるものではない。

[0054] 抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、および軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真核微生物を用いることができる。動物細胞としては、（１）哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるＣＯＳ細胞（Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．Ｃｅｌｌ（１９８１）２３，ｐ．１７５－１８２、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５０）、マウス線維芽細胞ＮＩＨ３Ｔ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１６５８）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８０）７７，ｐ．４１２６－４２２０）を挙げることができる。また、原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することにより抗体が得られる。以上の培養法においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。

[0055] 本発明の抗体のアイソタイプとしての制限はなく、例えばＩｇＧ（ＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，ＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ（ＩｇＡ１，ＩｇＡ２）、ＩｇＤあるいはＩｇＥ等を挙げることができるが、好ましくはＩｇＧまたはＩｇＭ、さらに好ましくはＩｇＧ１またはＩｇＧ２を挙げることができる。

[0056] また本発明の抗体は、抗体の抗原結合部を有する抗体の抗原結合性断片またはその修飾物であってもよい。抗体をパパイン、ペプシン等の蛋白質分解酵素で処理するか、あるいは抗体遺伝子を遺伝子工学的手法によって改変し適当な培養細胞において発現させることによって、該抗体の断片を得ることができる。このような抗体断片のうちで、抗体全長分子の持つ機能の全てまたは一部を保持している断片を抗体の抗原結合性断片と呼ぶことができる。

[0057] 抗体の機能としては、一般的には抗原結合活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性および補体依存性細胞性細胞傷害活性を挙げることができる。本発明における抗体の抗原結合性断片が保持する機能は、Ｏｒａｉ１に対する結合活性であり、好ましくはＴ細胞の活性化を抑制する活性であり、より好ましくはＴ細胞によるＩＬ－２および／またはインターフェロンγの産生を抑制する活性である。

[0058] 例えば、抗体の断片としては、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、または重鎖および軽鎖のＦｖを適当なリンカーで連結させたシングルチェインＦｖ（ｓｃＦｖ）、ｄｉａｂｏｄｙ（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）、線状抗体、および抗体断片より形成された多特異性抗体などを挙げることができる。また、Ｆ（ａｂ’）２を還元条件下で処理した抗体の可変領域の一価の断片であるＦａｂ’も抗体の断片に含まれる。

[0059] さらに、本発明の抗体は少なくとも２種類の異なる抗原に対して特異性を有する多特異性抗体であってもよい。通常このような分子は２種類の抗原に結合するものであるが（即ち、二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ））、本発明における「多特異性抗体」は、それ以上（例えば、３種類）の抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。

[0060] 本発明の多特異性抗体は、全長からなる抗体、またはそのような抗体の断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）２二重特異性抗体）でもよい。二重特異性抗体は２種類の抗体の重鎖と軽鎖（ＨＬ対）を結合させて作製することもできるし

、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することによっても、作製することができる（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９８３）３０５，ｐ．５３７－５３９）。

[0061] 本発明の抗体は一本鎖抗体（ｓｃＦｖとも記載する）でもよい。一本鎖抗体は、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる（Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，１１３（ＲｏｓｅｎｂｅｒｇおよびＭｏｏｒｅ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ｐ．２６９－３１５（１９９４）、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５），２３，ｐ．１１２６－１１３６）。また、２つのｓｃＦｖをポリペプチドリンカーで結合させて作製されるＢｉｓｃＦｖ断片を二重特異性抗体として使用することもできる。

[0062] 一本鎖抗体を作製する方法は当技術分野において周知である（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号、米国特許第５，２６０，２０３号、米国特許第５，０９１，５１３号、米国特許第５，４５５，０３０号等を参照）。このｓｃＦｖにおいて、重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、コンジュゲートを作らないようなリンカー、好ましくはポリペプチドリンカーを介して連結される（Ｈｕｓｔｏｎ，Ｊ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．（１９８８），８５，ｐ．５８７９－５８８３）。ｓｃＦｖにおける重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、同一の抗体に由来してもよく、別々の抗体に由来してもよい。可変領域を連結するポリペプチドリンカーとしては、例えば１２～１９残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0063] ｓｃＦｖをコードするＤＮＡは、前記抗体の重鎖または重鎖可変領域をコードするＤＮＡ、および軽鎖または軽鎖可変領域をコードするＤＮＡのうち、それらの配列のうちの全部または所望のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてＰＣＲ法により

増幅し、次いで、さらにポリペプチドリンカー部分をコードするＤＮＡ、およびその両端が各々重鎖、軽鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

[0064] また、一旦ｓｃＦｖをコードするＤＮＡが作製されると、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってｓｃＦｖを得ることができる。これらの抗体断片は、前記と同様にして遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。

[0065] 本発明の抗体は、多量化して抗原に対する親和性を高めたものであってもよい。多量化する抗体としては、１種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体を多量化する方法としては、ＩｇＧ　ＣＨ３ドメインと２つのｓｃＦｖとの結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックスーターン‐ヘリックスモチーフの導入等を挙げることができる。

[0066] 本発明の抗体は、アミノ酸配列が異なる複数種類の抗Ｏｒａｉ１抗体の混合物である、ポリクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体の一例としては、ＣＤＲが異なる複数種類の抗体の混合物を挙げることができる。そのようなポリクローナル抗体としては、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、該培養物から精製された抗体を用いることが出来る（ＷＯ２００４／０６１１０４号参照）。

[0067] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。

[0068] 本発明の抗体は、更にこれらの抗体と他の薬剤がコンジュゲートを形成しているもの（Ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）でもよい。このような抗体の例としては、該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物と結合している物を挙げることができる（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００５）２３，ｐ．１１３７－１１４６）。

[0069] 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は

通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ，Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９６）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８８））が、これらに限定されるものではない。

[0070] クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。これらのクロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣ等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインＡカラム、プロテインＧカラムを挙げることができる。例えばプロテインＡカラムを用いたカラムとして、Ｈｙｐｅｒ Ｄ，ＰＯＲＯＳ，Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ Ｆ．Ｆ．（ファルマシア）等を挙げることができる。また、抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

[0071] ３．抗Ｏｒａｉ１抗体を含有する医薬

上述の「２．抗Ｏｒａｉ１抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗Ｏｒａｉ１抗体の中から、Ｏｒａｉ１の生物活性を中和する抗体を得ることができる。これらＯｒａｉ１の生物活性を中和する抗体は、生体内でのＯｒａｉ１の生物活性、即ち、Ｔ細胞やマスト細胞に代表されるＯｒａｉ１発現細胞のカルシウム放出依存性カルシウムチャネル（ＣＲＡＣチャネル）の

活性化を阻害できることから、医薬として、これらの細胞のＣＲＡＣチャネル活性化に起因する疾患に対する治療および／または予防剤として用いることができる。

[0072] ＣＲＡＣチャネル活性化に起因する疾患や状態には、移植物の拒絶、免疫関連疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、抗血小板もしくは抗血栓活性、または癌などが含まれる。

[0073] 移植物拒絶の治療および／または予防の例としては、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、皮膚等の臓器もしくは組織の移植に対する拒絶反応および宿主対移植片反応、そして造血細胞（骨髄、末梢血、臍帯血等）の移植によって起こる移植片対宿主病の治療および／または予防が挙げられる。

[0074] 免疫関連疾患の例としては、結合組織や筋骨格系（関節リウマチ、強直性脊椎炎、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発筋炎、皮膚筋炎など）、血液系（再生不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病など）、消化器系（クローン病、潰瘍性大腸炎など）、神経系（多発性硬化症、重症筋無力症など）、視覚系（ブドウ膜炎など）、血管系（ベーチェット病、ヴェゲナー肉芽腫症など）、表皮系（乾癬、天疱瘡、白斑など）、内分泌系（１型糖尿病、自己免疫甲状腺炎、バセドウ病、橋本病など）等が挙げられる。

[0075] アレルギー性疾患の例としては、アトピー性皮膚炎、喘息、アナフィラキシー、アナフィラキシー様反応、食物アレルギー、鼻炎、中耳炎、薬物反応、昆虫刺傷反応、植物反応、ラテックスアレルギー、結膜炎、じんま疹などが挙げられる。

[0076] 炎症性疾患の例としては、炎症性腎疾患（糸球体腎炎、ネフローゼなど）、炎症性肺疾患（慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、間質性肺炎など）、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、回腸炎など）、炎症性肝疾患（自己免疫肝炎、ウイルス肝炎など）、炎症性心疾患（心筋炎、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症など）、炎症性皮膚疾患（接触性皮膚炎、湿疹など）、炎症性眼疾患（トラコーマ、眼内炎など）、炎症性中枢神経疾患（髄膜炎、脳脊髄炎、自己免疫脳炎など）、関節の炎症性疾患（例えば関節炎、骨関節炎など）

、全身性炎症（敗血症、出血、過敏症、癌化学療法などに起因するショック症状など）等が挙げられる。

[0077] 抗血小板または抗血栓活性が治療および／または予防に役立つ例としては、心筋梗塞、脳卒中、虚血性心疾患、血栓症等が挙げられる。

[0078] 癌治療の例としては乳癌、肺癌、皮膚癌、白血病等が挙げられる。

[0079] さらにマスト細胞および好塩基球が関与する病態、マスト細胞白血病、マスト細胞症、好塩基性白血病、子宮内膜症等が、そしてＣＲＡＣチャネルの遺伝的機能亢進により発症する、または発症のリスクが高まる小管集合性ミオパチー、ストールモルケン症、関節リウマチ、強直性脊椎炎、アトピー性皮膚炎等が本抗体によって治療することができる疾患として挙げられる。

[0080] 上記の医薬としての抗Ｏｒａｉ１抗体の例として、Ｒ１１８抗体および／またはＲ１９８から作製されたヒト化抗体およびこれのＣＤＲ改変体を挙げることができる。

[0081] ｉｎ ｖｉｔｒｏでの抗Ｏｒａｉ１抗体によるＯｒａｉ１の生物活性の中和活性は、例えばＯｒａｉ１を発現しているＴ細胞の活性化抑制活性で測定することができる。例えば、ヒトＴ細胞由来細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞に種々の濃度で抗Ｏｒａｉ１抗体を添加することで、ＰＭＡおよびＡ２３１８７刺激によるＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２放出に対する抑制活性を測定することができる。また、ヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ）に種々の濃度で抗Ｏｒａｉ１抗体を添加することで、ＰＭＡおよびＡ２３１８７刺激によるＰＢＭＣからのＩＬ－２およびインターフェロンγ放出に対する抑制活性を測定することができる。

[0082] 移植片対宿主病発症の責任細胞がＴ細胞であることは、実験的にも証明された事実であり、広く認識されている。移植されたＴ細胞が被移植者を異物と認識すると、自身で生産するインターロイキン２（ＩＬ－２）による自己増殖や、活性化によるインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）などの炎症性サイトカイン類の放出によって、全身性の免疫炎症反応を生じさせ、移植片

対宿主病を発症する。従って、これらのサイトカイン類の産生を抑制することは、移植片対宿主病の予防や治療に繋がるとともに、その抑制活性を指標とすることで、Ｏｒａｉ１抗体の治療薬としての有用性を判断することが出来る。

[0083] 本発明における好適な抗体として、配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が８０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片を挙げることができる。前記の抗体においてさらに好適なものとして、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が１０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片を挙げることができる。また、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞が放出するＩＬ－２量を８０％阻害する濃度が６００００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片、ならびに８０％阻害する濃度が２００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片も本発明の抗体に含まれる。

[0084] 本発明における別の好適な抗体として、配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が１００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片を挙げることができる。前記の抗体においてさらに好適なものとして、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が２０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片をあげることができる。また、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＬ－２量を８０％阻害する濃度が１７０００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片、ならびに８０％阻害する濃度が４００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片も本発明の抗体に含まれる。

[0085] 本発明におけるさらに別の好適な抗体として、配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＦＮ－γ量を５０％阻害する濃度が８００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片を挙げることができる。前記の抗体においてさらに好適なものとして、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＦＮ－γ量を５０％阻害する濃度が４０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片を挙げることができる。また、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣが放出するＩＦＮ－γ量を８０％阻害する濃度が３０００００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片、ならびに８０％阻害する濃度が２０００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片も本発明の抗体に含まれる。

[0086] また実験動物を利用したｉｎ　ｖｉｖｏでの抗Ｏｒａｉ１抗体の移植片対宿主病に対する治療または予防効果は、例えばヒトＰＢＭＣ移入マウス移植片対宿主病モデルにおける体重減少の抑制を測定することで確認することができる。すなわち、重度免疫不全マウスであるＮＯＧマウスあるいはＮＳＧマウスに２．０ＧｙのＸ線を照射した翌日に、１ｍＬ中に１５百万個から５０百万個のヒトＰＢＭＣを含むＰＢＳ溶液を、尾静脈よりマウス１匹あたり２００μＬ移入する。ヒトＰＢＭＣを移入しなかったＸ線照射マウス群を非移植片対宿主病群、ヒトＰＢＭＣを移入し抗体の基材液のみを投与した群を移植片対宿主病群とし、ヒトＰＢＭＣ移入前や移入後に抗Ｏｒａｉ１抗体を尾静脈内投与もしくは腹腔内投与することで、移植片対宿主病群の体重減少に対する抑制効果を測定する。

[0087] さらに抗Ｏｒａｉ１抗体の各種疾患に対する治療または予防効果は、Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスを用いた以下のｉｎ　ｖｉｖｏ評価系によっても確認できる。

[0088]

皮膚炎に対する効果は、マウスの腹腔内や静脈内にタンパク抗原液を投与し、さらに２週間後に追加免疫を施した後、同タンパク抗原液を耳または背部に３日～２週間ごとに３～６回繰り返し塗布することで発症させた皮膚炎において、耳介の厚さ、背部の皮膚炎の肉眼的スコア、血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度、皮膚・末梢血・胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄から得た細胞の増殖活性・サイトカイン産生能・表面抗原を抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0089] 掻痒に対する効果は、ダニ抗原クリームを耳介または背部に３日～２週間ごとに３～６回繰り返し塗布する、あるいはハプテン類を耳介や腹部や背部に連日～週１回塗布する、あるいは掻痒誘発物質を耳介皮内や背部皮下やくも膜下腔内に投与するなどの方法で誘導した掻痒行動を、マウスの両足甲に装着したマグネットと掻痒行動測定装置による掻痒回数の測定や、皮膚・末梢血・脊髄組織の病理的特徴を検査することで定量化し、抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0090] 乾癬に対する効果は、Ｉｍｉｑｕｉｍｏｄを耳介両側または片面および剃毛済み背部に塗布する、Ｚｙｍｏｓａｎ懸濁液を腹腔内投与する、ＩＬ－２３などのサイトカインをマウス耳介片面へ皮内投与するなどの方法で誘導した乾癬性皮膚炎を、炎症部位の重量、厚み、その部位に浸潤した好中球のミエロペルオキシダーゼ活性、浸潤した細胞のフローサイトメトリー解析、遺伝子解析、サイトカイン濃度などの測定により定量化し、抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0091] 多発性硬化症に対する効果は、Ｍｙｅｌｉｎ ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎまたはその部分ペプチド抗原溶液を等量のフロイントの完全アジュバント水溶液と混合して乳化させ、マウスの脇腹または腹部皮内に投与し、その後百日咳毒素水溶液を尾静脈へ投与、さらに数日後に再度百日咳毒素液を尾静脈へ投与することで誘導した実験的脳脊髄炎を、実験開始１週間から２週間後より発症する尾から下肢、前肢へと拡大する麻痺症状の肉眼的観察でスコア化し、抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間

で比較することで評価する。

[0092] 関節炎に対する効果は、ウシＩＩ型コラーゲンとフロイントの完全アジュバントを混合し乳化したものをマウスの尾根部皮内に投与し、２～３週間後に同じ投与を行い、その後の関節腫脹のスコア化、血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度、皮膚・末梢血・胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄から得た細胞の増殖活性・サイトカイン産生能・表面抗原などを、抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0093] 大腸炎に対する効果は、トリニトロベンゼンスルホン酸を２４時間絶食下のマウス腸管内に投与する、１－１０％のデキストラン硫酸ナトリウム水溶液を給水瓶より４日から２週間自由飲水させる、Ｈｕｍａｎ Ｏｒａｉ１ノックインマウスのリンパ節と脾臓から採取し精製したＣＤ４＋ＣＤ２５－ＣＤ４５ＲＢｈｉ Ｔ－ｃｅｌｌｓを Ｒａｇ２－／－マウスの腹腔内に移入するなどの方法で大腸炎を誘導し、観察期間中の体重、試験終了後の剖検による腸管の肥厚度・ポリープの個数と大きさ・病理的特徴、血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度、腸管・末梢血・胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄から得た細胞の増殖活性・サイトカイン産生能・表面抗原などを、抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0094] 全身性エリテマトーデスに対する効果は、卵白アルブミンあるいは他の非刺激性の抗原を腹腔内あるいは皮下に５～１０日間隔で最大１５回投与することで全身性エリテマトーデス様症状を誘導し、観察期間中に経時的に採取した血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度、尿中の抗体価やバイオマーカー濃度、試験終了後に採取した脾臓・リンパ節などの臓器から細胞を調製して無処置のマウスに移入することで惹起させた症状などを、抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0095] 肝炎に対する効果は、Ｄ－ガラクトースアミンを単独またはリポポリサッカライドとの組み合わせでマウスの腹腔内に投与する、コンカナバリンＡを単独で尾静脈内に投与するなどの方法で肝炎を誘導し、起因物質投与の１時間～１週間後に採取した血液中のＧＯＴおよびＧＰＴ濃度や肝病変の組織病

理学的状態を抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0096] 骨髄細胞移植における生着率や移植片対宿主病予防に対する効果は、Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスの大腿骨や脛骨から採取した骨髄内の細胞を、単独もしくはＨｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスの脾臓より採取した脾細胞と組み合わせ、Ｘ線照射レシピエントマウスに移入、４から１６週間の体重変化や生存率、試験終了時の血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度、腸管・末梢血・胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄から得た細胞の表面抗原・増殖活性・サイトカイン産生能を抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0097] 移植臓器の生着率に対する効果は、ホストマウスの尾根部から採取した皮膚を、皮膚を切除して露出させたＨｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスの背部皮筋層に固定し、移植後４から１６週間の移植片の大きさと生着状態をスコア化し、抗Ｏｒａｉ１抗体群と非投与群間で比較することで評価する。

[0098] このようにして得られたＯｒａｉ１の生物活性を中和する抗体は、医薬として、特に移植物の拒絶、免疫関連疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、抗血小板もしくは抗血栓活性、または癌などを予防または治療するための抗体として有用である。

[0099] 抗Ｏｒａｉ１抗体は、一つの例としては、移植物の拒絶、免疫関連疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、抗血小板もしくは抗血栓活性、または癌の治療または予防に対しては該抗体単独で、あるいは少なくとも一つの他の治療剤と併用して投与することができる。抗Ｏｒａｉ１抗体と併用して投与できる他の治療剤としては、葉酸代謝拮抗剤、カルシニューリン阻害剤、副腎皮質ステロイド剤、抗胸腺細胞グロブリン剤、核酸代謝拮抗剤、核酸合成阻害剤、細胞表面抗原を標的とする生物製剤、またはサイトカインもしくはサイトカイン受容体を標的とする生物製剤等を挙げることができるがこれらに限定されない。

[0100] 上記の治療剤の具体例としては、葉酸代謝拮抗剤としてはＭｅｔｈｏｔｒ

ｅｘａｔｅ、カルシニューリン阻害剤としてはＣｙｃｌｏｓｐｏｒｉｎ、Ｔａｃｌｏｒｉｍｓ、副腎皮質ステロイド剤としてはＭｅｔｈｙｌｐｒｅｄｎｉｓｏｌｏｎｅ、核酸合成阻害剤としてはＣｙｃｌｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ、抗胸腺細胞グロブリン剤としてはＺｅｔｂｕｌｉｎ、Ｌｙｍｐｈｏｇｌｏｂｕｌｉｎｅ、Ｔｈｙｍｏｇｌｏｂｕｌｉｎ、核酸代謝拮抗剤としてはＭｙｃｏｐｈｅｎｏｌａｔｅ　ｍｏｆｅｔｉｌ、細胞表面抗原を標的とする生物製剤としてはＡｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ、Ｒｉｔｕｘｉｍａｂ、サイトカインあるいはサイトカイン受容体を標的とする生物製剤としてはＩｎｆｌｉｘｉｍａｂ、Ｅｔａｎｅｒｃｅｐｔ、Ｒｉｔｕｘｉｍａｂなどを挙げることができる。

[0101] 移植物の拒絶、免疫関連疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、抗血小板もしくは抗血栓活性、または癌の状態やどの程度の治療および／または予防を目指すかによって、２、３あるいはそれ以上の種類の他の治療剤を投与することもできるし、それらの他の治療剤は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することができる。他の治療剤と抗Ｏｒａｉ１抗体は同じ製剤の中に封入することによって同時に投与することもできる。また、抗Ｏｒａｉ１抗体と他の治療剤を別々の製剤に封入して同時に投与することもできる。さらに、他の治療剤と抗Ｏｒａｉ１抗体を相前後して別々に投与することもできる。すなわち、他の治療剤を投与した後に抗Ｏｒａｉ１抗体または該抗体の抗原結合性断片を有効成分として含有する治療剤を投与するか、あるいは抗Ｏｒａｉ１抗体または該抗体の抗原結合性断片を有効成分として含有する治療剤を投与した後に他の治療剤を投与しても良い。遺伝子治療において投与する場合には、蛋白質性の治療剤の遺伝子と抗Ｏｒａｉ１抗体の遺伝子は、別々のあるいは同じプロモーター領域の下流に挿入することができ、別々のあるいは、同じベクターに導入することができる。

[0102] 抗Ｏｒａｉ１抗体、あるいはそのフラグメントに対し治療剤を結合させることにより、Ｍ．Ｃ．Ｇａｒｎｅｔ「Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｄｒｕｇ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：　ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　ｐｒｏｇｒｅｓｓ」，

Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，（２００１）５３，１７１－２１６記載の標的型薬物複合体を製造することができる。この目的には、抗体分子のほか、Ｔ細胞の認識性を完全消失していない限り、いずれの抗体フラグメントも適用可能であるが、例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ等のフラグメントを例として挙げることができ、本発明においても同様に、抗体および該フラグメントを使用することができる。抗Ｏｒａｉ１抗体または該抗体のフラグメントと治療剤との結合様式は、Ｍ．Ｃ．Ｇａｒｎｅｔ「Ｔａｒｇｅｔｅｄ ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒｏｇｒｅｓｓ」，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ，（２００１）５３，１７１－２１６、Ｇ．Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ「Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ（１９９６）、Ｐｕｔｎａｍ ａｎｄ Ｊ．Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）１２２，５５－１２３等に記載される種々の形態があり得る。すなわち、抗Ｏｒａｉ１抗体と治療剤が化学的に直接あるいはオリゴペプチド等のスペーサーを介在して結合される様式や、適当な薬物担体を介在して結合される様式を挙げることができる。薬物担体の例としては、リポソームや水溶性高分子を挙げることができる。これら薬物担体が介在される様式としては、より具体的には、抗体と治療剤とがリポソームに包含され、該リポソームと抗体とが結合した様式、および、治療剤が水溶性高分子（分子量１０００乃至１０万程度の化合物）に化学的に直接あるいはオリゴペプチド等のスペーサーを介在させて結合され、該水溶性高分子に抗体が結合した様式、を例として挙げることができる。抗体（または該フラグメント）と治療剤、リポソームおよび水溶性高分子等の薬物担体との結合は、Ｇ．Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ「Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ（１９９６）、Ｐｕｔｎ

ａｍ ａｎｄ Ｊ．Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ （１９９５）１２２，５５－１２３に記載の方法等の当業者周知の方法により実施することができる。治療剤のリポソームへの包含は、Ｄ．Ｄ．Ｌａｓｉｃ「Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ：Ｆｒｏｍ Ｐｈｙｓｉｃｓ ｔｏ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｂ．Ｖ．，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ（１９９３）等に記載の方法等の当業者周知の方法により実施することができる。治療剤の水溶性高分子への結合は、Ｄ．Ｐｕｔｎａｍ ａｎｄ Ｊ Ｋｏｐｅｃｅｋ「Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｗｉｔｈ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ」Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９５）１２２，５５－１２３記載の方法等の当業者周知の方法により、実施することができる。抗体（または該フラグメント）と蛋白質性の治療剤（または該フラグメント）との複合体は、上記の方法のほか、遺伝子工学的に、当業者周知の方法により作製することができる。

[0103] 本発明は、治療および／または予防に有効な量の抗Ｏｒａｉ１抗体と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤および／または補助剤を含む医薬組成物も提供する。

[0104] 本発明は、治療および／または予防に有効な量の抗Ｏｒａｉ１抗体と治療および／または予防に有効な量の少なくとも一つの治療剤と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤および／または補助剤を含む医薬組成物も提供する。治療剤としては、先に述べた葉酸代謝拮抗剤、カルシニューリン阻害剤、副腎皮質ステロイド剤、抗胸腺細胞グロブリン剤、核酸代謝拮抗剤、核酸合成阻害剤、細胞表面抗原を標的とする生物製剤、またはサイトカインもしくはサイトカイン受容体を標的とする生物製剤等を挙げることができるがこれらに限定されない。

[0105] 本発明の医薬組成物において許容される製剤に用いる物質としては好まし

くは投与量や投与濃度において、医薬組成物を投与される者に対して非毒性のものが好ましい。

[0106] 本発明の医薬組成物は、ｐＨ、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。製剤用の物質として以下のものを挙げることができるが、これらに制限されない：グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリス－塩酸（Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、β－シクロデキストリンやヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノースまたはデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸または過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン・グリコールまたはポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０やポリソルベート８０等のポリソルベート、トリトン（ｔｒｉｔｏｎ）、トロメタミン（ｔｒｏｍｅｔｈａｍｉｎｅ）、レシチンまたはコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、賦形剤、および／または薬学上の補助剤。これらの製剤用の物質の添加量は、抗Ｏｒａｉ１抗体の重量に対して０．０１～１００倍、特に０．１～１０倍添加するのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定するこ

とができる。

[0107] 医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはｐＨ７．０－８．５のＴｒｉｓバッファー、ｐＨ４．０－５．５の酢酸バッファー、ｐＨ３．０－６．２のクエン酸バッファーを含むことができる。また、これらのバッファーにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。本発明の医薬組成物には抗Ｏｒａｉ１抗体を含む医薬組成物並びに、抗Ｏｒａｉ１抗体および少なくとも一つの治療剤を含む医薬組成物を挙げることができ、本発明の医薬組成物は選択された組成と必要な純度を持つ薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。抗Ｏｒａｉ１抗体を含む医薬組成物並びに、抗Ｏｒａｉ１抗体および少なくとも一つの骨代謝異常治療薬剤を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

[0108] 本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化管吸収用に調製することもできる。製剤の組成および濃度は投与方法によって決定することができるし、本発明の医薬組成物に含まれる、抗Ｏｒａｉ１抗体のＯｒａｉ１に対する親和性、即ち、Ｏｒａｉ１に対する解離定数（Ｋｄ値）に対し、親和性が高い（Ｋｄ値が低い）ほど、ヒトへの投与量を少なくしても薬効を発揮することができるので、この結果に基づいて本発明の医薬組成物の人に対する投与量を決定することもできる。投与量は、ヒト型抗Ｏｒａｉ１抗体をヒトに対して投与する際には、約０．１～１００ｍｇ／ｋｇを１～１８０日間に１回投与すればよい。

[0109] 本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などを挙げることができる。

[0110] 承認されている抗体製剤のほとんどは静脈内投与であるが、多くの医療現場では皮下投与がより好まれる。その場合には容量が１．０～１．５ｍＬに

制限されるため、投与量によっては高濃度の抗体溶液が要求される。しかし、高濃度化すると薬液の粘性が増加するために、常用される注射針の太さでは、その高い粘性のために注射できないという事態が生じうる。つまり、医薬組成物の形態としては、注射剤を選ぶ場合、粘度が低いという性質は優先されるべき重要な意味があり、粘度を指標に好適な抗体を選択することができる。

実施例

[0111] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）」（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．およびＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．著，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓより１９８９年に発刊）に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

[0112] ［実施例１］ラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体の作製

１）－１ 免疫

１）－１－１ ヒトＯｒａｉ１発現ベクター（ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１）の構築

ヒトＯｒａｉ１の遺伝子配列はｐＤＯＮＲ２２１（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）にクローニングされたＵｌｔｉｍａｔｅ ＯＲＦ ｃｌｏｎｅ（Ｃｌｏｎｅ Ｎｏ．ＩＯＨ４０８６９、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を購入して使用した。遺伝子配列を配列表の配列番号１に、またアミノ酸配列を配列表の配列番号２に示す。また、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）をＧａｔｅｗａｙ Ｖｅｃｔｏｒ Ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）によりＤｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒに改変したｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴを作製した。Ｇａｔｅｗａｙ ＬＲ Ｃｌｏｎａｓｅ Ｅｎｚｙｍｅ ｍｉｘ（Ｌｉｆｅ

Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いて，ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴとａｔｔ配列内を組み換え、ヒトＯｒａｉ１発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１を作製した。ヒトＯｒａｉ１発現ベクターの大量調製には、ＥｎｄｏＦｒｅｅ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｇｉｇａ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社）を用いた。

[0113] １）－１－２　ラット免疫

免疫にはＷＫＹ/Ｉｚｍラットの雌（日本エスエルシー社）を使用した。まずラット両足下腿部をＨｙａｌｕｒｏｎｉｄａｓｅ（ＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社）にて前処理後、同部位にｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１を筋注した。続けて、ＥＣＭ８３０（ＢＴＸ社）を使用し、２ニードル電極を用いて、同部位にインビボエレクトロポレーションを実施した。二週間に一度、同様のインビボエレクトロポレーションを繰り返した後、ラットのリンパ節を採取しハイブリドーマ作製に用いた。

[0114] １）－２　ハイブリドーマ作製

リンパ節細胞とマウスミエローマＳＰ２／０－ａｇ１４細胞とをＨｙｂｒｉｍｕｎｅ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｃｙｔｏ　Ｐｕｌｓｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いて電気細胞融合し、ＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｄ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）に希釈して培養した。出現したハイブリドーマコロニーを回収することでモノクローンハイブリドーマを作製した。回収された各ハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清を用いて抗ヒトＯｒａｉ１抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

[0115] １）－３　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ法による一次スクリーニング

１）－３－１　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ用抗原遺伝子発現細胞の調製

ＨＥＫ２９３細胞を１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中７．５ｘ１０^{5}細胞／ｍＬになるよう調製した。それに対し、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いた形質移入手順に従い、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１もし

くはコントロールとしてｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴを導入し、９６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｃｏｒｎｉｎｇ社）に５０μｌずつ分注し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％　CO_2の条件下で二晩培養した。得られた導入細胞を接着状態のまま、Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡに使用した。

[0116] １）－３－２　Ｃｅｌｌ－ＥＬＩＳＡ

実施例１）－１－１で調製した発現ベクター導入ＨＥＫ２９３細胞の培養上清を除去後、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１またはｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３細胞のそれぞれに対しハイブリドーマ培養上清を添加し、４℃で１時間静置した。ｗｅｌｌ中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１回洗浄後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ－Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｐｒｏｄｕｃｅｄ　ｉｎ　ｒａｂｂｉｔ（ＳＩＧＭＡ社）を加えて、４℃で１時間静置した。ｗｅｌｌ中の細胞を５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで６回洗浄した後、ＯＰＤ発色液（ＯＰＤ溶解液（０．０５　Ｍ　クエン酸３ナトリウム、０．１Ｍ　リン酸水素２ナトリウム・１２水　ｐＨ４．５）にｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩（和光純薬社）、H_2O_2をそれぞれ０．４ｍｇ／ｍＬ、０．６％（ｖ／ｖ）になるように溶解）を２５μＬ／ｗｅｌｌで添加した。時々攪拌しながら発色反応を行い、１Ｍ　ＨＣｌを２５μＬ／ｗｅｌｌを添加して発色反応を停止させた後、プレートリーダー（ＥＮＶＩＳＩＯＮ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社）で４９０ｎｍの吸光度を測定した。細胞膜表面上に発現するヒトＯｒａｉ１に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択するため、コントロールのｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３細胞と比較し、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１発現ベクター導入ＨＥＫ２９３細胞の方でより高い吸光度を示す培養上清を産生するハイブリドーマを抗ヒトＯｒａｉ１抗体産生陽性として選択した。

[0117] １）－４　フローサイトメトリーによる二次スクリーニング

１）－４－１　フローサイトメトリー解析用抗原遺伝子発現細胞の調製

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を５×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}になるよう２２５平方ｃｍフ

ラスコに播種し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％　CO_2の条件下で一晩培養した。翌日、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１とコントロールとしてｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴをそれぞれＨＥＫ２９３Ｔ細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００を用いて導入し、３７℃、５％　CO_2の条件下でさらに二晩培養した。翌日、発現ベクター導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞をＴｒｙｐＬＥ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）で処理し、１０％　ＦＢＳ含有ＤＭＥＭで細胞を洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに懸濁した。得られた細胞懸濁液をフローサイトメトリー解析に使用した。

[0118]　１）－４－２　フローサイトメトリー解析

実施例１）－３のＣｅｌｌ－ＥＬＩＳＡで陽性と判定されたハイブリドーマが産生する抗体のヒトＯｒａｉ１に対する結合特異性をフローサイトメトリー法によりさらに確認した。実施例１）－４－１で調製したＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞およびｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のそれぞれに対しハイブリドーマ培養上清を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで５００倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（ＳＩＧＭＡ社）を加えて懸濁し、４℃で１時間静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで３回洗浄した後、２μｇ／ｍＬ　７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ社）を含む５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００：ＢｅｃｋｍａｎＣｏｕｌｔｅｒ社）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏ（ＴｒｅｅＳｔａｒ社）で行った。７－ａｍｉｎｏａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ　Ｄ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成した。コントロールであるｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の蛍光強度ヒストグラムに対しｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のヒストグラムが強蛍光強度側

にシフトしているサンプルを産生するハイブリドーマを抗ヒトＯｒａｉ１抗体産生ハイブリドーマとして取得した。結果として有意にシフトしたハイブリドーマが２２５個取得された。

[0119] １）－５　抗体のアイソタイプ決定

１）－４で取得されたラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体産生ハイブリドーマの中から、強くヒトＯｒａｉ１に結合することが示唆されたＲ１１８およびＲ１９８を選抜し、抗体アイソタイプを同定した。アイソタイプは、Ｒａｔ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ｉｓｏｔｙｐｉｎｇ ｔｅｓｔ ｋｉｔ（ＡｂＤ Ｓｅｒｏｔｅｃ社）により決定された。その結果、ラット抗ヒトＯｒａｉ１モノクローナル抗体Ｒ１１８およびＲ１９８のアイソタイプはともにＩｇＧ２ａ、κ鎖であることが示された。

[0120] １）－６　ラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体の調製

ラット抗ヒトＯｒａｉ１モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養上清から精製した。

[0121] まず、Ｒ１１８およびＲ１９８産生ハイブリドーマをＣｌｏｎａＣｅｌｌ－ＨＹ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ Ｅで十分量まで増殖させた後、Ｕｌｔｒａ Ｌｏｗ ＩｇＧ ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を２０％添加したＨｙｂｒｉｄｏｍａ ＳＦＭ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）に培地交換し、５日間培養した。本培養上清を回収し０．４５μｍのフィルターを通して滅菌した。

[0122] 抗体は、上記のハイブリドーマ上清からＰｒｏｔｅｉｎＧアフィニティークロマトグラフィー（４～６℃下）１段階工程で精製した。ＰｒｏｔｅｉｎＧアフィニティークロマトグラフィー精製後のバッファー置換工程は４～６℃下で実施した。最初に、ＰＢＳで平衡化したＰｒｏｔｅｉｎＧ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社）が充填されたカラムにハイブリドーマの培養上清をアプライした。培養上清液がカラムに全て入ったのち、カラム容量２倍以上のＰＢＳでカラムを洗浄した。次に０．１　Ｍグリシン/塩酸水溶液（ｐＨ２．７）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。集

めた画分に１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９．０）を加えてｐＨ７．０～７．５に調製した後に、Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量ＵＦ３０Ｋ、Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社，４～６℃下）にてＰＢＳへのバッファー置換を行うとともに濃縮を行い、抗体濃度を０．２ｍｇ／ｍＬ以上に調製した。最後にＭｉｎｉｓａｒｔ－Ｐｌｕｓ　ｆｉｌｔｅｒ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）でろ過し、精製サンプルとした。

[0123] ［実施例２］ラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体のｉｎ　ｖｉｔｒｏ評価

２）－１　フローサイトメトリーによるラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体の結合能評価

Ｏｒａｉ１に対する結合特異性を評価するため、１）－４－１で示す方法により作製したｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液あるいはｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、それぞれに対し１）－６で作製したラット抗ヒトＯｒａｉ１モノクローナル抗体であるＲ１１８、Ｒ１９８あるいはラットＩｇＧコントロール抗体（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ社）を加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで３２０倍に希釈したＡｎｔｉ－Ｒａｔ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅを加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、１μｇ／ｍＬ　Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を含む５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏで行った。Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）を算出した。Ｒ１１８およびＲ１９８は、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞には結合せず、図１に示すとおりにｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞にのみ濃度依存的に結合したことから、特異的にヒトＯｒａｉ１

に結合することが示された。一方、ラットＩｇＧコントロール抗体では結合は観察されなかった。

[0124] ２）－２　ラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体のＴ細胞活性化抑制作用

ヒトＴ細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞を、１０％　ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍＬ　Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎおよび１００μｇ／ｍＬ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を含むＲＰＭＩ１６４０（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）で１．５ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度に調製し、９６－ｗｅｌｌｓ細胞培養プレートに８０μＬずつ播種し、ラット抗ヒトＯｒａｉ１モノクローナル抗体であるＲ１１８、Ｒ１９８、あるいはラットＩｇＧ　コントロール抗体を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加して３７℃、５％　CO_2下で６０分間前処置した。その後、１００ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡ（ＳＩＧＭＡ社）および１μｇ／ｍＬ　Ａ２３１８７（ＳＩＧＭＡ社）を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加し（最終濃度１０ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡおよび１００ｎｇ／ｍＬ　Ａ２３１８７）、よく攪拌した後、約１６時間３７℃、５％　CO_2下で培養した。プレートをよく攪拌した後、６００ｇにて３分間遠心し、上清に含まれるインターロイキン－２（ＩＬ－２）濃度をＥＬＩＳＡ法（Ｒ＆Ｄ社）で測定した 。図２は取得したラット抗ヒトＯｒａｉ１モノクローナル抗体がＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示す。Ｒ１１８およびＲ１９８はＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に阻害した。一方、ラットＩｇＧコントロール抗体では阻害は観察されなかった。

[0125] ［実施例３］ラット抗ヒトＯｒａｉ１抗体の可変領域をコードするｃＤＮＡのヌクレオチド配列の決定

３）－１　ｃＤＮＡ合成

Ｒ１１８およびＲ１９８の各抗体産生ハイブリドーマの細胞溶解液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、２５０ｍＭ　ＬｉＣｌ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８）、０．５％ドデシル硫酸Ｌｉ（ＬｉＤＳ）、２．５ｍＭ　ｄｉｔｈｉｏｔｈｒｅｉｔｏｌ（ＤＴＴ））を、オリゴｄＴ２５が結合し

た磁気ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　ｍＲＮＡ　ＤＩＲＥＣＴ　Ｋｉｔ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）と混合し、ｍＲＮＡを磁気ビーズに結合させた。次に磁気ビーズをｍＲＮＡ洗浄溶液Ａ（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、０．１５Ｍ　ＬｉＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％　ＬｉＤＳ、０．１％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）とｃＤＮＡ合成用溶液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、７５ｍＭ　ＫＣｌ、３ｍＭ　$MgCl_2$、５ｍＭ　ＤＴＴ、０．５ｍＭ　ｄＮＴＰ、０．２％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、１．２ｕｎｉｔ　ＲＮａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）で１回ずつ洗浄した後、１２ｕｎｉｔ　ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＩＩＩ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を加えたｃＤＮＡ合成用溶液でｃＤＮＡ合成を行った。続いて３’テーリング反応溶液（５０ｍＭ　リン酸カリウム、４ｍＭ　$MgCl_2$、０．５ｍＭ　ｄＧＴＰ、０．２％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、１．２ｕｎｉｔ　ＲＮａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社））で洗浄した後、４８ｕｎｉｔ　Ｔｅｒｍｉｎａｌ　Ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ，　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ（Ｒｏｃｈｅ社）を加えた反応溶液で３’テーリング反応を行った。

[0126] ３）－２　ラット免疫グロブリン重、軽鎖可変領域遺伝子断片の増幅および配列決定

磁気ビーズをＴＥ溶液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．１％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）にて洗浄後、５’－ＲＡＣＥ　ＰＣＲ法を用いてラット免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子の増幅を行った。即ち、磁気ビーズをＰＣＲ反応溶液（０．２μＭ　プライマー、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰ、０．２５ｕｎｉｔ　ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　ＨＳ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴＡＫＡＲＡ社））に移し、９４℃３０秒－６８℃９０秒の反応を３５サイクル行った。用いたプライマーセットは下記の通り。

[0127]

ＰＣＲプライマーセット（重鎖用）

5’－ＧＣＴＡＧＣＧＣＴＡＣＣＧＧＡＣＴＣＡＧＡＴＣＣＣＣＣＣＣＣＣＣＣＣＣＤＮ－３’（Ｎｈｅ－ｐｏｌｙＣ－Ｓ）（配列番号３）

5’－ＴＣＡＣＴＧＡＧＣＴＧＧＴＧＡＧＡＧＴＧＴＡＧＡＧＣＣＣ－３’（ｒｌｇγ－ＡＳ１）（配列番号４）

5’－ＴＣＡＣＣＧＡＧＣＴＧＣＴＧＡＧＧＧＴＧＴＡＧＡＧＣＣＣ－３’（ｒｌｇγ－ＡＳ２）（配列番号５）

ＰＣＲプライマーセット（軽鎖用）

5’－ＧＣＴＡＧＣＧＣＴＡＣＣＧＧＡＣＴＣＡＧＡＴＣＣＣＣＣＣＣＣＣＣＣＣＣＤＮ－３’（Ｎｈｅ－ｐｏｌｙＣ－Ｓ）（配列番号６）（重鎖用と同じ）

5’－ＴＣＡＧＴＡＡＣＡＣＴＧＴＣＣＡＧＧＡＣＡＣＣＡＴＣＴＣ－３’（ｒｌｇκ－ＡＳ）（配列番号７）

上記ＰＣＲ反応により増幅した断片について、塩基配列のシーケンス解析を実施した。重鎖用シーケンスプライマーとして5’－ＣＴＧＧＣＴＣＡＧＧＧＡＡＡＴＡＧＣＣ－３’（ｒｌｇγ－ｓｅｑ）（配列番号８）、軽鎖用シーケンスプライマーとして5’－ＴＣＣＡＧＴＴＧＣＴＡＡＣＴＧＴＴＣＣ－３’（ｒｌｇκ－ｓｅｑ）（配列番号９）の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いた。

シークエンス解析は遺伝子配列解析装置（「ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ　３７００　ＤＮＡ　Ａｎａｌｙｚｅｒ；Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ」あるいは「Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　３７３０ｘｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ；Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ」）を用いて実施し、シークエンス反応は、Ｄｙｅ　Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｗｉｔｈ　ＡｍｐｌｉＴａｑ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）およびＧｅｎ

ｅＡｍｐ　９７００（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を用いた。

[0128] 決定されたＲ１１８およびＲ１９８の重、軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列を配列表の配列番号１０（Ｒ１１８軽鎖）、１２（Ｒ１１８重鎖）配列番号１４（Ｒ１９８軽鎖）および１６（Ｒ１９８重鎖）にそれぞれ示した。また、該可変領域のアミノ酸配列を、配列表の配列番号１１（Ｒ１１８軽鎖）、１３（Ｒ１１８重鎖）、配列番号１５（Ｒ１９８軽鎖）および１７（Ｒ１９８重鎖）にそれぞれ示した。配列番号１０および１１は図１４に、配列番号１２および１３は図１５に、配列番号１４および１５は図１６に、配列番号１６および１７は図１７に、それぞれ記載されている。

[0129] ［実施例４］ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体の作製

４）－１　キメラ化およびヒト化軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫの構築

プラスミドｐｃＤＮＡ３．３－ＴＯＰＯ／ＬａｃＺ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を制限酵素ＸｂａＩおよびＰｍｅＩで消化して得られる約５．４ｋｂのフラグメントと、配列表の配列番号１８に示されるヒトκ鎖分泌シグナルおよびヒトκ鎖定常領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて結合して、ｐｃＤＮＡ３．３／ＬＫを作製した。

[0130] ｐｃＤＮＡ３．３／ＬＫを鋳型として、下記プライマーセットでＰＣＲを行い、得られた約３．８ｋｂのフラグメントをリン酸化後セルフライゲーションすることによりＣＭＶプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、およびヒトκ鎖定常領域を持つ、キメラおよびヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを構築した。

プライマーセット

５‘－ＴＡＴＡＣＣＧＴＣＧＡＣＣＴＣＴＡＧＣＴＡＧＡＧＣＴＴＧＧＣ－３’（配列番号１９：プライマー　３．３－Ｆ１）

５‘－ＧＣＴＡＴＧＧＣＡＧＧＧＣＣＴＧＣＣＧＣＣＣＣＧＡＣＧＴＴＧ－

３’（配列番号２０：プライマー　３．３－Ｒ１）

４）－２　キメラ化およびヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１の構築

ｐＣＭＡ－ＬＫをＸｂａＩおよびＰｍｅＩで消化してκ鎖分泌シグナルおよびヒトκ鎖定常領域を取り除いたＤＮＡ断片と、配列表の配列番号２１に示されるヒト重鎖シグナル配列およびヒトＩｇＧ１定常領域のアミノ酸をコードする配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキットを用いて結合して、ＣＭＶプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒトＩｇＧ１重鎖定常領域をもつキメラおよびヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を構築した。

[0131] ４）－３　ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体軽鎖発現ベクターの構築

４）－３－１　ヒトキメラ化Ｒ１１８軽鎖ｃＲ１１８＿Ｌ発現ベクターの構築

実施例３）－２で得られたＲ１１８軽鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。キメラ化およびヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＸｂａＩおよびＰｍｅＩで切断して得た約３．４ｋｂのＤＮＡ断片に、Ｒ１１８軽鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を同様の制限酵素で切断して得た約０．７ｋｂのＤＮＡ断片をＬｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ　ｖｅｒ．２（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化Ｒ１１８軽鎖（ｃＲ１１８＿Ｌ）発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＲ１１８＿Ｌ」と命名した。ヒトキメラ化ｃＲ１１８軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号２２および２３（図１８）にそれぞれ示す。

[0132] ４）－３－２　ヒトキメラ化Ｒ１９８軽鎖ｃＲ１９８＿Ｌ発現ベクターの構築

実施例３）－２で得られたＲ１９８軽鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を合

成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。キメラ化およびヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＸｂａＩおよびＰｍｅＩで切断して得た約３．４ｋｂのＤＮＡ断片に、Ｒ１９８軽鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を同様の制限酵素で切断して得た約０．７ｋｂのＤＮＡ断片をＬｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ　ｖｅｒ．２（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化Ｒ１９８軽鎖（ｃＲ１９８＿Ｌ）発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＲ１９８＿Ｌ」と命名した。ヒトキメラ化ｃＲ１９８軽鎖をコードするヌクレオチド配列および該軽鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号２４および２５（図１９）にそれぞれ示す。

[0133]　４）－４　ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体重鎖発現ベクターの構築

４）－４－１　ヒトキメラ化Ｒ１１８重鎖ｃＲ１１８＿Ｈ発現ベクターの構築

実施例３）－２で得られたＲ１１８重鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。キメラ化およびヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断して得た約４．５ｋｂのＤＮＡ断片に、Ｒ１１８重鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を同様の制限酵素で切断して得た約０．３ｋｂのＤＮＡ断片をＬｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ　ｖｅｒ．２を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化Ｒ１１８重鎖（ｃＲ１１８＿Ｈ）発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＲ１１８＿Ｈ」と命名した。ヒトキメラ化ｃＲ１１８重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号２６および２７（図２０）にそれぞれ示す。

[0134]　４）－４－２　ヒトキメラ化Ｒ１９８重鎖ｃＲ１９８＿Ｈ発現ベクターの構築

実施例３）－２で得られたＲ１９８重鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。キメラ化およびヒト化ＩｇＧ１タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで

切断して得た約４．５ｋｂのＤＮＡ断片に、Ｒ１９８重鎖の可変領域を含むＤＮＡ断片を同様の制限酵素で切断して得た約０．３ｋｂのＤＮＡ断片をＬｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ　ｖｅｒ．２を用いて挿入することにより、ヒトキメラ化Ｒ１９８重鎖（ｃＲ１９８＿Ｈ）発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＲ１９８＿Ｈ」と命名した。ヒトキメラ化ｃＲ１９８重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号２８および２９（図２１）にそれぞれ示す。

[0135] ４）－５　ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体の調製

４）－５－１　ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体の生産

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）はマニュアルに従い、継代、培養を行った。

[0136] 対数増殖期の10^7個のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を３０ｍＬボトル（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社）に播種し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｍｅｄｉｕｍ　（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）で希釈して９ｍＬに調製したのちに、３７℃、８％　CO_2インキュベーター内にて１３５ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３０μｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）５００μＬに溶解し、次にＱＩＡＧＥＮ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｍａｘｉ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社）を用いて調製したヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体重鎖発現ベクター（４μｇ）およびヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体軽鎖発現ベクター（６μｇ）を５００μＬのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭに懸濁した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液５００μＬに、発現ベクター／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液５００μＬを加え穏やかに攪拌し、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％　CO_2インキュベーターで５－７日間、９５ｒｐｍで振とう培養して得られた培養上清を０．２２μｍマイレクスフィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ

社）でろ過した。

[0137] ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＲ１１８＿ＨとｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＲ１１８＿Ｌとの組合せによって取得されたヒトキメラ化Ｒ１１８を「ｃＲ１１８」と命名した。同様にｐＣＭＡ－Ｇ１／ｃＲ１９８＿ＨとｐＣＭＡ－ＬＫ／ｃＲ１９８＿Ｈとの組合せによって取得されたヒトキメラ化Ｒ１９８を「ｃＲ１９８」と命名した。

[0138] ４）－５－２　ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体の精製

４）－５－１で得られた培養上清を、ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー一段階工程で精製した。最初に、培養上清１０ｍＬを、ＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社）にアプライした。培養液がカラムに全て入ったのち、ＰＢＳ　７ｍＬでカラムを洗浄した。次に２Ｍ　Ａｒｇｉｎｉｎｅ－ＨＣｌ　ｐＨ４．０　５ｍＬで溶出し、その溶出液を、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社）でヒスチジンバッファー（２５ｍＭ　Ｈｉｓｔｉｄｉｎｅ、５％　Ｓｏｒｂｉｔｏｒ、ｐＨ６．０）　４ｍＬに置換した。最後にＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｃｅｌ　３０Ｋ（分画分子量３０Ｋ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）にて約１００μＬに濃縮し、精製サンプルとした。

[0139] ［実施例５］ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性

５）－１　フローサイトメトリーによるヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体の抗原結合活性

ヒトＯｒａｉ１に対する結合特異性を評価するため、１）－４－１で示す方法により作製したｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液あるいはｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、それぞれに対し４）－５で作製した、ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体であるｃＲ１１８、ｃＲ１９８、あるいはヒトＩｇＧコントロール抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ社）を加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで

２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１００倍に希釈したＡｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ社）を加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、１μｇ／ｍＬ　Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を含む５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏで行った。Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）を算出した。ｃＲ１１８およびｃＲ１９８は、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞には結合せず、図３に示すとおりｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞にのみ濃度依存的に結合したことから、特異的にヒトＯｒａｉ１に結合することが示された。一方、ヒトＩｇＧコントロール抗体では結合は観察されなかった。

[0140]　５）－２　ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体のヒトＴ細胞株活性化抑制作用

ヒトＴ細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞を、１０％　ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍＬ　Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎおよび１００μｇ／ｍＬ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを含むＲＰＭＩ１６４０で１．５ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度に調製し、９６－ｗｅｌｌｓ細胞培養プレートに８０μＬずつ播種し、ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体であるｃＲ１９８およびｃＲ１１８と親抗体のＲ１９８、Ｒ１１８、あるいはヒトＩｇＧ　コントロール抗体を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加して３７℃、５％　CO_2下で６０分間前処置した。その後、１００ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡおよび１μｇ／ｍＬ　Ａ２３１８７を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加し、よく攪拌した後、約１６時間３７℃、５％　CO_2下で培養した。プレートをよく攪拌した後、６００ｇにて３分間遠心し、上清に含まれるＩＬ－２濃度をＥＬＩＳＡ法で測定した 。図４は作製したヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体がＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞か

らのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示す。ｃＲ１１８およびｃＲ１９８はＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に阻害し、その阻害強度は親抗体であるＲ１９８と同等であった。一方、ヒトＩｇＧコントロール抗体では阻害は観察されなかった。

[0141] ［実施例６］ヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体ｃＲ１９８のヒト化バージョンｈＲ１９８の設計

６）－１　Ｒ１９８の可変領域の分子モデリング

ｃＲ１９８の可変領域の分子モデリングは、相同性モデリングとして一般的に公知の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２０３，１２１－１５３，（１９９１））によって実行された。Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．２８，２３５－２４２（２０００））に登録されるヒト免疫グロブリンの可変領域の１次配列（Ｘ線結晶構造から誘導される三次元構造が入手可能である）を、上で決定されたＲ１９８の可変領域と比較した。結果として、１ＡＪ７が、ｃＲ１９８の軽鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有するとして選択された。また、１ＸＧＹが、ｃＲ１９８の重鎖の可変領域に対して最も高い配列相同性を有するとして選択された。フレームワーク領域の三次元構造は、ｃＲ１９８の軽鎖および重鎖に対応する１ＡＪ７および１ＸＧＹの座標を組み合わせて、「フレームワークモデル」を得ることによって作製された。ｃＲ１９８のＣＤＲは、Ｔｈｏｒｎｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６３，８００－８１５，（１９９６））の分類に従って、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１およびＣＤＲＨ２は、それぞれクラスター１１Ａ、７Ａ、９Ａ、１０Ａ、１０Ａに割り当てられた。ＣＤＲＨ３は、Ｈ３ルール（ＦＥＢＳ　ｌｅｔｔｅｒ　３９９，１－８（１９９６））を使用して、ｋ（６）－に分類された。次いで、それぞれのＣＤＲについての代表的なコンホメーションがフレームワークモデルに組み込まれた。

[0142]

最後に、エネルギーの点でｃＲ１９８の可変領域の可能性のある分子モデ

ルを得るために、不利な原子間接触を除くためのエネルギー計算を行った。上記手順を、市販の蛋白質立体構造予測プログラムＰｒｉｍｅおよび配座探索プログラムＭａｃｒｏＭｏｄｅｌ（Ｓｃｈｒｏｄｉｎｇｅｒ，ＬＬＣ）を使用して行った。

[0143] ６）－２　ヒト化Ｒ１９８に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化Ｒ１９８抗体の構築を、ＣＤＲグラフティング（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６，１００２９－１００３３（１９８９））として一般的に公知の方法によって行った。アクセプター抗体は、フレームワーク領域内のアミノ酸相同性に基づいて選択された。

[0144] ｃＲ１９８のフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列のＫａｂａｔデータベース（Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２９，２０５－２０６（２００１））の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、１Ｃ１０’ＣＬ抗体がフレームワーク領域についての７１％の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。１Ｃ１０’ＣＬについてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、ｃＲ１９８についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築されたｃＲ１９８の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６，１００２９－１００３３（１９８９））によって与えられる基準によって選択された。

[0145] 選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体に移入することによって、ヒト化Ｒ１９８配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

[0146] また、ｃＲ１９８の各ＣＤＲ、ＦＲ中の１乃至５個のアミノ酸残基をｃＲ１１８のアミノ酸残基に置換したＣＤＲ改変ヒト化Ｒ１９８配列についても以下の実施例に記載されるように構築した。

[0147] ６）－３　ヒト化Ｒ１９８軽鎖ｈＲ１９８＿Ｌの設計

６）－３－１　　ｈＲ１９８＿Ｌ１タイプ軽鎖：

配列表の配列番号２５に示されるｃＲ１９８軽鎖のアミノ酸番号３０番目のトレオニン残基をセリン残基に、３２番目のプロリン残基をセリン残基に、３５番目のロイシン残基をバリン残基に、３７番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に、４２番目のセリン残基をトレオニン残基に、６１番目のアスパラギン酸残基をグリシン残基に、６２番目のグリシン残基をリシン残基に、６３番目のセリン残基をアラニン残基に、６４番目のバリン残基をプロリン残基に、９２番目のセリン残基をトレオニン残基に、９４番目のセリン残基をトレオニン残基に、９６番目のトレオニン残基をセリン残基に、９９番目のグルタミン酸残基をグルタミン残基に、１００番目のセリン残基をプロリン残基に、１２０番目のトレオニン残基をグルタミン残基に、１２４番目のロイシン残基をバリン残基に、１２６番目のロイシン残基をイソロイシン残基に、１２７番目のアルギニン残基をリシン残基に、１２９番目のアラニン残基をトレオニン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８軽鎖を「ｈＲ１９８＿Ｌ１タイプ軽鎖」と命名した。

[0148] ｈＲ１９８＿Ｌ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３０であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至７０２であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至３７８である。また、ｈＲ１９８＿Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３１であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖はそのアミノ酸番号２１乃至２３４からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２１乃至１２６からなる。さらに、配列番号３０および３１の配列は、それぞれ図２２にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0149] ６）－３－２　　ｈＲ１９８＿Ｌ２タイプ軽鎖：

配列表の配列番号２５に示されるｃＲ１９８軽鎖のアミノ酸番号アミノ酸番号３０番目のトレオニン残基をセリン残基に、３２番目のプロリン残基をセリン残基に、３５番目のロイシン残基をバリン残基に、３７番目のグルタ

ミン酸残基をアスパラギン酸残基に、４２番目のセリン残基をトレオニン残基に、６１番目のアスパラギン酸残基をグリシン残基に、６２番目のグリシン残基をリシン残基に、６３番目のセリン残基をアラニン残基に、９２番目のセリン残基をトレオニン残基に、９４番目のセリン残基をトレオニン残基に、９６番目のトレオニン残基をセリン残基に、９９番目のグルタミン酸残基をグルタミン残基に、１００番目のセリン残基をプロリン残基に、１２０番目のトレオニン残基をグルタミン残基に、１２４番目のロイシン残基をバリン残基に、１２６番目のロイシン残基をイソロイシン残基に、１２７番目のアルギニン残基をリシン残基に、１２９番目のアラニン残基をトレオニン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８軽鎖を「ｈＲ１９８＿Ｌ２タイプ軽鎖」と命名した。

[0150] ｈＲ１９８＿Ｌ２タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３２であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至７０２であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至３７８である。また、ｈＲ１９８＿Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３３であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖はそのアミノ酸番号２１乃至２３４からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２１乃至１２６からなる。さらに、配列番号３２および３３の配列は、それぞれ図２３にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0151] ６）－３－３　ｈＲ１９８＿Ｌ３タイプ軽鎖：

配列表の配列番号２５に示されるｃＲ１９８軽鎖のアミノ酸番号アミノ酸番号３０番目のトレオニン残基をセリン残基に、３２番目のプロリン残基をセリン残基に、３５番目のロイシン残基をバリン残基に、３７番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に、４２番目のセリン残基をトレオニン残基に、６１番目のアスパラギン酸残基をグリシン残基に、６２番目のグリシン残基をリシン残基に、６３番目のセリン残基をアラニン残基に、６４番目のバリン残基をプロリン残基に、９２番目のセリン残基をトレオニン残基に

、９４番目のセリン残基をトレオニン残基に、９６番目のトレオニン残基をセリン残基に、９９番目のグルタミン酸残基をグルタミン残基に、１００番目のセリン残基をプロリン残基に、１１４番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に、１２０番目のトレオニン残基をグルタミン残基に、１２４番目のロイシン残基をバリン残基に、１２６番目のロイシン残基をイソロイシン残基に、１２７番目のアルギニン残基をリシン残基に、１２９番目のアラニン残基をトレオニン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８軽鎖を「ｈＲ１９８＿Ｌ３タイプ軽鎖」と命名した。

[0152] ｈＲ１９８＿Ｌ３タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３４であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至７０２であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至３７８である。また、ｈＲ１９８＿Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３５であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖はそのアミノ酸番号２１乃至２３４からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２１乃至１２６からなる。さらに、配列番号３４および３５の配列は、それぞれ図２４にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0153] ６）－３－４ ｈＲ１９８＿Ｌ４タイプ軽鎖：

配列表の配列番号２５に示されるｃＲ１９８軽鎖のアミノ酸番号アミノ酸番号３０番目のトレオニン残基をセリン残基に、３２番目のプロリン残基をセリン残基に、３５番目のロイシン残基をバリン残基に、３７番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に、４２番目のセリン残基をトレオニン残基に、６１番目のアスパラギン酸残基をグリシン残基に、６２番目のグリシン残基をリシン残基に、６３番目のセリン残基をアラニン残基に、９２番目のセリン残基をトレオニン残基に、９４番目のセリン残基をトレオニン残基に、９６番目のトレオニン残基をセリン残基に、９９番目のグルタミン酸残基をグルタミン残基に、１００番目のセリン残基をプロリン残基に、１１４番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に、１２０番目のトレオニン残

基をグルタミン残基に、１２４番目のロイシン残基をバリン残基に、１２６番目のロイシン残基をイソロイシン残基に、１２７番目のアルギニン残基をリシン残基に、１２９番目のアラニン残基をトレオニン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８軽鎖を「ｈＲ１９８＿Ｌ４タイプ軽鎖」と命名した。

[0154] ｈＲ１９８＿Ｌ４タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３６であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至７０２であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至３７８である。また、ｈＲ１９８＿Ｌ４タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３７であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖はそのアミノ酸番号２１乃至２３４からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２１乃至１２６からなる。さらに、配列番号３６および３７の配列は、それぞれ図２５にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0155] ６）－４ ヒト化Ｒ１９８重鎖ｈＲ１９８＿Ｈの設計

６）－４－１ ｈＲ１９８＿Ｈ１タイプ重鎖：

配列表の配列番号２９に示されるｃＲ１９８重鎖のアミノ酸番号２４番目のグルタミン残基をバリン残基に、３０番目のロイシン残基をバリン残基に、３１番目のアラニン残基をリシン残基に、３５番目のセリン残基をアラニン残基に、３７番目のメチオニン残基をバリン残基に、３９番目のイソロイシン残基をバリン残基に、５６番目のイソロイシン残基をバリン残基に、５７番目のリシン残基をアルギニン残基に、５９番目のトレオニン残基をアラニン残基に、６０番目のトレオニン残基をプロリン残基に、８６番目のリシン残基をアルギニン残基に、９５番目のセリン残基をトレオニン残基に、９９番目のフェニルアラニン残基をチロシン残基に、１０１番目のグルタミン残基をグルタミン酸残基に、１０６番目のトレオニン残基をアルギニン残基に、１０７番目のプロリン残基をセリン残基に、１０８番目のアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に、１１０番目のセリン残基をトレオニン残基に

、１３０番目のバリン残基をトレオニン残基に、１３１番目のメチオニン残基をロイシン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８重鎖を「ｈＲ１９８＿Ｈ１タイプ重鎖」と命名した。

[0156] ｈＲ１９８＿Ｈ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号３８であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１３９８であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至４０８である。また、ｈＲ１９８＿Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号３９であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６６からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２０乃至１３６からなる。さらに、配列番号３８および３９の配列は、それぞれ図２６にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0157] ６）－４－２ ｈＲ１９８＿Ｈ２タイプ重鎖：

配列表の配列番号２９に示されるｃＲ１９８重鎖のアミノ酸番号２４番目のグルタミン残基をバリン残基に、３０番目のロイシン残基をバリン残基に、３１番目のアラニン残基をリシン残基に、３５番目のセリン残基をアラニン残基に、３７番目のメチオニン残基をバリン残基に、３９番目のイソロイシン残基をバリン残基に、５７番目のリシン残基をアルギニン残基に、５９番目のトレオニン残基をアラニン残基に、６０番目のトレオニン残基をプロリン残基に、８６番目のリシン残基をアルギニン残基に、９５番目のセリン残基をトレオニン残基に、９９番目のフェニルアラニン残基をチロシン残基に、１０１番目のグルタミン残基をグルタミン酸残基に、１０６番目のトレオニン残基をアルギニン残基に、１０７番目のプロリン残基をセリン残基に、１０８番目のアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に、１１０番目のセリン残基をトレオニン残基に、１３０番目のバリン残基をトレオニン残基に、１３１番目のメチオニン残基をロイシン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８重鎖を「ｈＲ１９８＿Ｈ２タイプ重鎖」と命名した。

[0158] ｈＲ１９８＿Ｈ２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号４０であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１３９８であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至４０８である。また、ｈＲ１９８＿Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４１であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６６からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２０乃至１３６からなる。さらに、配列番号４０および４１の配列は、それぞれ図２７にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0159] ６）－４－３ ｈＲ１９８＿Ｈ３タイプ重鎖：

配列表の配列番号２９に示されるｃＲ１９８重鎖のアミノ酸番号２４番目のグルタミン残基をバリン残基に、３０番目のロイシン残基をバリン残基に、３１番目のアラニン残基をリシン残基に、３５番目のセリン残基をアラニン残基に、３７番目のメチオニン残基をバリン残基に、３９番目のイソロイシン残基をバリン残基に、５０番目のセリン残基をアラニン残基に、５６番目のイソロイシン残基をバリン残基に、５７番目のリシン残基をアルギニン残基に、５９番目のトレオニン残基をアラニン残基に、６０番目のトレオニン残基をプロリン残基に、６７番目のイソロイシン残基をバリン残基に、７０番目のバリン残基をイソロイシン残基に、８１番目のグルタミン酸をアラニン残基に、８２番目のリシン残基をアルギニン残基に、８６番目のリシン残基をアルギニン残基に、９５番目のセリン残基をトレオニン残基に、９９番目のフェニルアラニン残基をチロシン残基に、１０１番目のグルタミン残基をグルタミン酸残基に、１０６番目のトレオニン残基をアルギニン残基に、１０７番目のプロリン残基をセリン残基に、１０８番目のアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に、１１０番目のセリン残基をトレオニン残基に、１３０番目のバリン残基をトレオニン残基に、１３１番目のメチオニン残基をロイシン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８重鎖を「ｈＲ１９８＿Ｈ３タイプ重鎖」と命名した。

[0160]

ｈＲ１９８＿Ｈ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号４２であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１３９８であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至４０８である。また、ｈＲ１９８＿Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４３であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６６からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２０乃至１３６からなる。さらに、配列番号４２および４３の配列は、それぞれ図２８にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0161] ６）－４－４ ｈＲ１９８＿Ｈ４タイプ重鎖：

配列表の配列番号２９に示されるｃＲ１９８重鎖のアミノ酸番号２４番目のグルタミン残基をバリン残基に、３０番目のロイシン残基をバリン残基に、３１番目のアラニン残基をリシン残基に、３５番目のセリン残基をアラニン残基に、３７番目のメチオニン残基をバリン残基に、３９番目のイソロイシン残基をバリン残基に、５０番目のセリン残基をアラニン残基に、５７番目のリシン残基をアルギニン残基に、５９番目のトレオニン残基をアラニン残基に、６０番目のトレオニン残基をプロリン残基に、６７番目のイソロイシン残基をバリン残基に、７０番目のバリン残基をイソロイシン残基に、８１番目のグルタミン酸をアラニン残基に、８２番目のリシン残基をアルギニン残基に、８６番目のリシン残基をアルギニン残基に、９５番目のセリン残基をトレオニン残基に、９９番目のフェニルアラニン残基をチロシン残基に、１０１番目のグルタミン残基をグルタミン酸残基に、１０６番目のトレオニン残基をアルギニン残基に、１０７番目のプロリン残基をセリン残基に、１０８番目のアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に、１１０番目のセリン残基をトレオニン残基に、１３０番目のバリン残基をトレオニン残基に、１３１番目のメチオニン残基をロイシン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８重鎖を「ｈＲ１９８＿Ｈ４タイプ重鎖」と命名した。

[0162] ｈＲ１９８＿Ｈ４タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号４４であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１３９８であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至４０８である。また、ｈＲ１９８＿Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号４５であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６６からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２０乃至１３６からなる。さらに、配列番号４４および４５の配列は、それぞれ図２９にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0163] ［実施例７］ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体の作製

７）－１ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体軽鎖ｈＲ１９８＿Ｌ発現ベクターの構築

７）－１－１ ｈＲ１９８＿Ｌ１発現ベクターの構築

配列表の配列番号３０に示されるｈＲ１９８＿Ｌ１のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至４０２に示されるｈＲ１９８＿Ｌ１の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社 人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片を制限酵素ＡｖａｌおよびＥｃｏＲＶで切断し、キメラおよびヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを同じ制限酵素で切断した箇所に挿入することによりｈＲ１９８＿Ｌ１発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ/ｈＲ１９８＿Ｌ１」と命名した。

[0164] ７）－１－２ ｈＲ１９８＿Ｌ２発現ベクターの構築

配列表の配列番号３２に示されるｈＲ１９８＿Ｌ２のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至４０２に示されるＬ２の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社 人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（ＴＯＹＯＢＯ社）でＬ２の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を増幅

して制限酵素ＢｓｉＷＩで切断し、キメラおよびヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩで切断した箇所に挿入することによりＬ２発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ／Ｌ２」と命名した。

[0165] ７）－１－３　ｈＲ１９８＿Ｌ３およびｈＲ１９８＿Ｌ４発現ベクターの構築

配列表の配列番号３６に示されるｈＲ１９８＿Ｌ４のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至４０２に示されるｈＲ１９８＿Ｌ４の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。実施例７－１－２）と同様の方法によりｈＲ１９８＿Ｌ４発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ/ｈＲ１９８＿Ｌ４」と命名した。

[0166] ｐＣＭＡ－Ｇ１/ｈＲ１９８＿Ｌ４をテンプレートにして、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社）を用いて、アミノ酸番号６４番目のバリン残基をプロリン残基に置き換える変異を導入した。配列表の配列番号３４に示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１/ｈＲ１９８＿Ｌ３」と命名した。

[0167] ７）－２　ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体重鎖ｈＲ１９８＿Ｈ発現ベクターの構築

７）－２－１　ｈＲ１９８＿Ｈ１およびｈＲ１９８＿Ｈ２発現ベクターの構築

抗Ｏｒａｉ１抗体重鎖ｈＲ１９８のヒト化候補とした配列表の配列番号１１１に示されるＨ０のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４２５に示されるＨ０の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－でＨ０の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラおよびヒト化抗体ＩｇＧ１タイプ重鎖発現

ベクターｐＣＭＡ－Ｇ１を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ社）を用いて挿入することによりＨ０発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１/Ｒ１９８__Ｈ０」と命名した。Ｈ０のアミノ酸配列は、配列番号１１２に示されている。

[0168] 次にｐＣＭＡ－Ｇ１/Ｒ１９８__Ｈ０をテンプレートにして、ＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｋｉｔ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて、アミノ酸番号６６番目のトリプトファン残基をチロシン残基に置き換える変異を導入した。配列表の配列番号４０に示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１/ｈＲ１９８__Ｈ２」と命名した。

[0169] 次にｐＣＭＡ－Ｇ１／Ｒ１９８__Ｈ２をテンプレートにして、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社）と下記プライマーセットを用いてアミノ酸番号５６番目のイソロイシン残基をバリン残基に置き換える変異を導入した。配列表の配列番号３８に示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８__Ｈ１」と命名した。

[0170] ７）－２－２　ｈＲ１９８__Ｈ３およびｈＲ１９８__Ｈ４発現ベクターの構築

抗Ｏｒａｉ１抗体重鎖ｈＲ１９８のヒト化候補とした配列表の配列番号１１３に示されるＨ５のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４２５に示されるＨ５の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。実施例７）－２－１と同様の方法でＨ５発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１/ｈＲ１９８__Ｈ５」と命名した。Ｈ５のアミノ酸配列は、配列番号１１４に示されている。

[0171] 次にｐＣＭＡ－Ｇ１/Ｈ５をテンプレートにして、ＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｋｉｔを用いて、アミノ酸番号６６番目のトリプ

トファン残基、６７番目のイソロイシン残基をそれぞれチロシン残基、バリン残基に置き換える変異を導入した。配列番号４４に示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１/ｈＲ１９８__Ｈ４」と命名した。

[0172] 次にｐＣＭＡ－Ｇ１/ｈＲ１９８__Ｈ４をテンプレートにして、実施例７）－２－１と同様の方法でアミノ酸番号５６番目のイソロイシン残基をバリン残基に置き換える変異を導入し、配列表の配列番号４４に示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１/ｈＲ１９８__Ｈ３」と命名した。

[0173] ７）－３　ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体ｈＲ１９８の調製

４）－５－１と同様の方法によって、ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体重鎖発現ベクターとヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体軽鎖発現ベクターをＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に遺伝子導入し、抗体を含む培養上清を得た。

[0174] ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８__Ｈ１とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８__Ｌ１、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８__Ｈ２とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８__Ｌ２、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８__Ｈ３とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８__Ｌ３、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８__Ｈ４とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８__Ｌ４との組合せによって取得されたヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体をそれぞれ、「ｈＲ１９８__Ｈ１／Ｌ１」、「ｈＲ１９８__Ｈ２／Ｌ２」、「ｈＲ１９８__Ｈ３／Ｌ３」、「ｈＲ１９８__Ｈ４／Ｌ４」と命名した。

[0175] ４）－５－２と同様の方法によって、得られた培養上清をｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィーで精製し、精製抗体サンプルを得た。

[0176] ［実施例８］ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性

８）－１　フローサイトメトリーによるヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体の抗原結合活性

ヒトＯｒａｉ１に対する結合特異性を評価するため、１）－４－１で示す方法により作製したｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸

濁液あるいはｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、それぞれに対し７）－５で作製したヒト化抗Ｏｒａｉ１抗体ｈＲ１９８＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＲ１９８＿Ｈ２／Ｌ２、ｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３、ｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４と、親抗体のｃＲ１１８、ｃＲ１９８を加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１００倍に希釈したＡｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅを加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、１μｇ／ｍＬ　Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅを含む５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏで行った。Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）を算出した。ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体ｈＲ１９８＿Ｈ１／Ｌ１、ｈＲ１９８＿Ｈ２／Ｌ２、ｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３、ｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４は親抗体のｃＲ１１８、ｃＲ１９８と同様、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞には結合せず、図５に示すとおりｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞にのみ濃度依存的に結合したことから、特異的にヒトＯｒａｉ１に結合することが示された。

[0177]　８）－２　ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体のヒトＴ細胞株活性化抑制作用

ヒトＴ細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞を、１０％　ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍＬ　Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎおよび１００μｇ／ｍＬ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを含むＲＰＭＩ１６４０で１．５ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度に調製し、９６－ｗｅｌｌｓ細胞培養プレートに８０μＬずつ播種し、ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体であるｈＨ１／Ｌ１、ｈＨ２／Ｌ２、ｈＨ３／Ｌ３、ｈＨ４／Ｌ４、およびヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体であるｃＲ１１８およびｃＲ１９８を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加して３７℃、５％　CO_2下で６０分間前処置した。その後、１００ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡおよび１μｇ／ｍＬ　Ａ

２３１８７を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加し、よく攪拌した後、約１６時間３７℃、５％　CO_2下で培養した。プレートをよく攪拌した後、６００ｇにて３分間遠心し、上清に含まれるＩＬ－２濃度をＥＬＩＳＡ法で測定した 。図６はヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体がＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示す。ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体はＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に阻害し、ｈＨ１／Ｌ１およびｈＨ２／Ｌ２の阻害活性はヒトキメラ化抗ヒトＯｒａｉ１抗体ｃＲ１１８およびｃＲ１９８と同等であった。一方ｈＨ３／Ｌ３およびｈＨ４／Ｌ４は、ｃＲ１１８およびｃＲ１９８よりも低濃度で阻害活性を示した。

[0178] ［実施例９］リボソームディスプレイによる活性増強変異の同定

９）－１　Ｈ鎖およびＬ鎖ライブラリーの作製

ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体ｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４を鋳型として、Ｈ鎖またはＬ鎖に変異を導入したライブラリーを構築し、リボソームディスプレイによる活性増強変異の同定に供した。

９）－１－１　Ｈ鎖ライブラリーの作製

ｈＲ１９８＿Ｈ４遺伝子を鋳型にして以下のプライマーセットとｒＴａｑ ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（ＴＯＹＯＢＯ社）を用いて８０サイクルのＰＣＲを行い、当該遺伝子領域にランダムに変異を導入した。

プライマーセット

５’－ＡＴＧＣＡＡＧＴＣＣＡＡＣＴＧＧＴＴＣＡＡＴＣ－３’　（配列番号４６：プライマー　Ｏｒａｉ１　ＨＦ）

５’－ＴＧＡＣＧＧＡＧＣＣＡＧＣＧＧＧＡＡＧＡＣ－３’　（配列番号４７：プライマー　Ｏｒａｉ１　ＣＨ　ＦＲ）

次にランダムに変異を導入したＨ鎖遺伝子とＴ７プロモーターを含む５’ＵＴＲ部位、および５’側にｃ－Ｍｙｃを３’側にＳｅｃＭ配列を付加したＴｏｌＡ遺伝子断片を鋳型にして、以下のプライマーセットを用いてオーバーラップＰＣＲを行い、Ｈ鎖ライブラリーを調製した。

プライマーセット

5’－ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧ－３’　（配列番号４８：プライマー　Ｍ１３　ｒｅｖ　ｌｏｎｇ）

5’－ＣＴＣＧＡＧＴＴＡＴＴＣＡＴＴＡＧＧＴＧＡＧＧＣＧＴＴＧＡＧＧ－３’　（配列番号４９：プライマー　ＳｅｃＭ　Ｓｔｏｐ　Ｒ）

９）－１－２　Ｌ鎖ライブラリーの作製

ｈＲ１９８＿Ｌ４遺伝子を鋳型にして以下のプライマーセットとｒＴａｑ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを用いて８０サイクルのＰＣＲを行い、当該遺伝子領域にランダムに変異を導入した。

プライマーセット

5’－ＡＴＧＧＡＣＡＴＴＣＡＡＣＴＧＡＣＣＣＡＡＡＧＣ－３’　（配列番号５０：プライマー　Ｏｒａｉ１　Ｌｃ　Ｆ）

5’－ＧＡＴＡＡＡＡＡＣＡＣＴＣＧＧＧＧＣＣＧＣＣＡＣ－３’　（配列番号５１：プライマー　Ｏｒａｉ１　ＣＬ－ＦＲ）

９）－１－１の記載と同様にランダムに変異を導入したＬ鎖遺伝子と上記２つの遺伝子断片を鋳型にして、オーバーラップＰＣＲを行い、Ｌ鎖ライブラリーを調製した。

[0179] ９）－１－３　Ｈ鎖遺伝子断片の作製

ｈＲ１９８＿Ｈ４遺伝子を鋳型にして以下のプライマーセットとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲを行い、Ｈ鎖遺伝子領域を増幅した。

プライマーセット

5’－ＡＴＧＣＡＡＧＴＣＣＡＡＣＴＧＧＴＴＣＡＡＴＣ－３’　（配列番号４６：プライマー　Ｏｒａｉ１　ＨＦ）

5’－ＴＣＡＴＴＡＴＴＴＧＴＣＡＴＣＧＴＣＡＴＣＴＴＴＡＴＡＧＴＣＧＡＡＴＴＣＴＴＣＧＣＣＡＣＧＡＴＴＡＡＡＧＧＡＴＴＴＧＧＴＧＡＣ－３’　（配列番号５２：プライマー　Ｏｒａｉ１　ＨＲ－ＦＬＡＧ　Ｒ）

次に当該遺伝子断片とＴ７プロモーターを含む5’ＵＴＲ部位鋳型にして以下のプライマーセットを用いてオーバーラップＰＣＲを行い、Ｈ鎖遺伝子

断片を調製した。

プライマーセット

5’－ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧ－３’　（配列番号４８：プライマー　Ｍ１３　ｒｅｖ　ｌｏｎｇ）

5’－ＴＣＡＴＴＡＴＴＴＧＴＣＡＴＣＧＴＣＡＴＣＴＴＴＡＴＡＧＴＣＧＡＡＴＴＣＴＴＣＧＣＣＡＣＧＡＴＴＡＡＡＧＧＡＴＴＴＧＧＴＧＡＣ－３’　（配列番号５２：プライマー　Ｏｒａｉ１　ＨＲ－ＦＬＡＧ　Ｒ）

９）－１－４　Ｌ鎖遺伝子断片の作製

ｈＲ１９８＿Ｌ４遺伝子を鋳型にして以下のプライマーセットとＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲを行い、Ｌ鎖遺伝子領域を増幅した。

プライマーセット

5’－ＡＴＧＧＡＣＡＴＴＣＡＡＣＴＧＡＣＣＣＡＡＡＧＣ－３’　（配列番号５０：プライマー　Ｏｒａｉ１　Ｌｃ　Ｆ）

5’－ＴＣＡＴＴＡＴＴＴＧＴＣＡＴＣＧＴＣＡＴＣＴＴＴＡＴＡＧＴＣＧＡＡＴＴＣＴＴＣＧＣＣＡＣＧＡＴＴＡＡＡＧＧＡＴＴＴＧＧＴＧＡＣ－３’　（配列番号５３：プライマー　Ｏｒａｉ１　ＣＬ－ＦＬＡＧ　Ｒ）

次に９）－１－１の記載と同様にオーバーラップＰＣＲを行い、Ｌ鎖遺伝子断片を調製した。

プライマーセット

5’－ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣＣＡＴＧ－３’　（配列番号４８：プライマー　Ｍ１３　ｒｅｖ　ｌｏｎｇ）

5’－ＴＣＡＴＴＡＴＴＴＧＴＣＡＴＣＧＴＣＡＴＣＴＴＴＡＴＡＧＴＣＧＡＡＴＴＣＴＴＣＧＣＣＡＣＧＡＴＴＡＡＡＧＧＡＴＴＴＧＧＴＧＡＣ－３’　（配列番号５３：プライマー　Ｏｒａｉ１　ＣＬ－ＦＬＡＧ　Ｒ）

９）－１－５　ｍＲＮＡの調製

実施例９）－１－１乃至９）－１－４にて作製したライブラリーおよび遺伝子断片を鋳型にして、Ｔ７　ＲｉｂｏＭａｘ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｌａｒｇｅ　Ｓｃａｌｅ　ＲＮＡ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍ

ｅｇａ社）でそれぞれのｍＲＮＡを合成した。

[0180] ９）－２　リボソームディスプレイによるスクリーニング

Ｈ鎖ライブラリーとＬ鎖遺伝子断片を組み合わせてＨ鎖リボソームディスプレイＦａｂを、Ｌ鎖ライブラリーとＨ鎖遺伝子断片を組み合わせてＬ鎖リボソームディスプレイＦａｂを調製した。ＰＵＲＥｆｒｅｘ反応液（ＧｅｎｅＦｒｏｎｔｉｅｒ社）に２０　ｐｍｏｌのＨ鎖（またはＬ鎖）ライブラリーｍＲＮＡと１００　ｐｍｏｌのリボソームを加えて、３０℃で４５分間保温した。同様にＰＵＲＥｆｒｅｘ反応液に４０ｐｍｏｌのＬ鎖（またはＨ鎖）ｍＲＮＡと２００ｐｍｏｌのリボソームを加えて、３０℃で４５分間インキュベートした。次にＨ鎖（またはＬ鎖）ライブラリーおよびＬ鎖（またはＨ鎖）の翻訳後の反応液を混ぜ合わせ、３０℃でさらに９０分間保温することにより、Ｈ鎖（またはＬ鎖）リボソームディスプレイＦａｂを調製し、その後４℃に冷却することで反応を停止した。続いて当該反応液に抗原を加え、４℃で１時間ゆるやかに攪拌することでＦａｂと抗原との結合を行った。なお、抗原としては、１）－１－１で作製したｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１を利用して樹立したヒトＯｒａｉ１恒常発現ＣＨＯ細胞をホルマリン固定処理したサンプル、もしくは以下に示されるビオチンＰＥＧ化ヒトＯｒａｉ１ループ領域ペプチド（ＳＩＧＭＡ社）を用いた。

[0181] ビオチンＰＥＧ化ヒトＯｒａｉ１ループ領域ペプチド

Ｂｉｏｔｉｎ－ＰＥＧ－ＳＧＳＧＦＬＰＬＫＫＱＰＧＱＰＲＰＴＳＫＰＰＡＳＧＡＡＡＮＶＳＴＳＧＩＴＰＧＱＡＡＡＩＡＳＴＴＩ　（配列番号１１５）

抗原と結合したリボソームディスプレイＦａｂをＮｏｎｏｌｉｎｋ　Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ　ｍａｇｎｅｔｉｃ　ｂｅａｄｓ　（ＳｏｌｕＬｉｎｋ社）にて回収した。続いて抗原を５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１５ｍＭ　Ｍｇ（ＯＡｃ）$_2$、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０、１ｍｇ／ｍＬ　ｙｅａｓｔ　ＲＮＡおよび５０ｍＭ　Ｔｒｉ

ｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１５ｍＭ　Ｍｇ（ＯＡｃ）$_2$、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０にて洗浄した。その後抗原に５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１５ｍＭ　Ｍｇ（ＯＡｃ）$_2$、５０　ｍＭ　ＥＤＴＡを添加し、室温で１０分間静置後遠心によってｍＲＮＡを含む上清を回収した。回収したｍＲＮＡはＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｒ　Ｈｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ社）によってｃＤＮＡとした後、下記プライマーセットおよびＫＯＤ　－Ｐｌｕｓ－を用いてＰＣＲを行ないＤＮＡとして増幅した。当該ＤＮＡを鋳型にしてｍＲＮＡを合成し、さらに同様のスクリーニングに供した。当該スクリーニングサイクルを複数回実施することにより、抗原に強く結合する抗体遺伝子を選抜した。

プライマーセット

５’－ＡＴＧＧＡＣＡＴＴＣＡＡＣＴＧＡＣＣＣＡＡＡＧＣ－３’　（配列番号５０：プライマー　Ｏｒａｉ１－ＬｃＦ）

５’－ＣＡＧＡＴＣＣＴＣＣＴＣＡＧＡＧＡＴＣＡＧＣＴＴＣＴＧＣＴＣ－３’　（配列番号５４：プライマー　Ｍｙｃ－Ｒ）

９）－３　Ｆａｂ蛋白質の調製

選抜した遺伝子を大腸菌発現用ベクターにサブクローニングし、ヒトＯｒａｉ１恒常発現ＣＨＯ細胞に対する結合性が向上したクローンをＣｅｌｌ　ＥＬＩＳＡにてスクリーニングした。まず選抜後のＤＮＡを制限酵素ＥｃｏＲＶおよびＸｈｏＩで切断し、同じ酵素で切断したＦａｂ発現用ベクター（ＧｅｎｅＦｒｏｎｔｉｅｒ社）に挿入後大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入した。当該形質転換体を丸底９６ｗｅｌｌプレート上で、１　ｗｅｌｌあたり１５０μＬのカルベニシリ／０．１％　グルコース／２ｘＹＴで３７℃にて４－５時間培養した。次にプレートを４℃まで冷やした後、終濃度０．５ｍＭになるようにＩＰＴＧを添加し、３０℃で一晩振とう培養した。次に遠心により菌体を回収した後、Ｌｙｓｉｓ　ｂｕｆｆｅｒ（２．５ｍｇ／ｍＬ　Ｌｙｓｏｔｙｍｅ、１００Ｕ　ＤＮａｓｅＩ）を加え、室温にて６０分間振

とうした。続いて遠心により上清を回収し、Ｆａｂ検体とした。

[0182] ９）－４　Ｃｅｌｌ　ＥＬＩＳＡによるスクリーニング

ヒトＯｒａｉ１発現細胞を３８４プレートにフルシートに培養後、洗浄バッファー（ＰＢＳ（－）、２０ｍＭ　$MgSO_4$、２．５％　ＦＢＳ）にて洗浄した。次にＦａｂ検体を当該プレートに加え、４℃で１時間振とうした。洗浄バッファーにて４回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトＦ（ａｂ’）$_2$ヤギ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ社）を加え、４℃で３０分間振とうした。洗浄バッファーにて３回洗浄後、ＰＢＳ（－）、２０ｍＭ　$MgSO_4$にて３回洗浄した。その後発色試薬（０．４ｍｇ／ｍＬ　Ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌ－ｂｅｎｚｉｍｉｎｅ、　２００ｍＭ　酢酸ナトリウム（ｐＨ３．４）、０．０１％　過酸化水素水）を加え、室温で１５分間振とうした。その後２Ｎ　ＨＣｌを加えた後、OD_{450}を測定した。コントロールのＣＨＯ細胞と比較し、ヒトＯｒａｉ１恒常発現ＣＨＯ細胞の方でより高いOD_{450}を示すＦａｂ検体を選抜した。

[0183] ９）－５　フローサイトメトリーによる抗ヒトＯｒａｉ１抗体Ｆａｂの抗原結合活性

ヒトＯｒａｉ１に対する結合特異性を評価するため、１）－４－１で示す方法により作製したｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液あるいはｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、それぞれに対し９）－４で選抜された軽鎖変異クローンＬＣＤＲ６０、ＬＣＤＲ６７、ＬＣＤＲ８３、ＣＥ１５１、ＰＥ０５７ならびに重鎖変異クローンＨＣＤＲ０４６、ＨＣＤＲ０４７、ＨＥＰ０８７、ＨＥＰ１２４、ＨＥＰ２３７と、親抗体ＦａｂのｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４－Ｆａｂを加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１００倍に希釈したＡｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅを加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、１μｇ／ｍＬ　Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅを含む５％　ＦＢＳ含有

ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏで行った。Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）を算出した。軽鎖変異クローンＬＣＤＲ６０、ＬＣＤＲ６７、ＬＣＤＲ８３、ＣＥ１５１、ＰＥ０５７ならびに重鎖変異クローンＨＣＤＲ０４６、ＨＣＤＲ０４７、ＨＥＰ０８７、ＨＥＰ１２４、ＨＥＰ２３７は親抗体ＦａｂのｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４－Ｆａｂと同様、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞には結合せず、図７に示すとおりｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に対しては、親抗体Ｆａｂと比べて同等以上にヒトＯｒａｉ１に結合する傾向が見られた。

[0184] ［実施例１０］ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体のアフィニティマチュレーション抗体の作製

実施例９）により選択された軽鎖変異クローンＬＣＤＲ６０、ＬＣＤＲ６７、ＬＣＤＲ８３、ＣＥ１５１、ＰＥ０５７ならびに重鎖変異クローンＨＣＤＲ０４６、ＨＣＤＲ０４７、ＨＥＰ０８７、ＨＥＰ１２４、ＨＥＰ２３７で認められた活性を増強する変異のうち、いくつかをｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３に移入することによって、１００種類以上の改変ｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３抗体を作製し、結合親和性、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性、生産性、ヒトに対する異種抗原性の観点から評価した。結果として、以下に示す抗体を選抜した。

[0185] １０）－１　ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体のアフィニティマチュレーション抗体の設計

１０）－１－１　ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖：

配列表の配列番号３５に示されるｈＲ１９８＿Ｌ３軽鎖のアミノ酸番号５１番目のアスパラギン残基をグリシン残基に、１１３番目のトレオニン残基をイソロイシン残基に、１１７番目のトレオニン残基をセリン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８軽鎖を「ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖」と命名した。

[0186] ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号５５であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至７０２であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至３７８である。また、ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号５６であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖はそのアミノ酸番号２１乃至２３４からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２１乃至１２６からなる。さらに、配列番号５５および５６の配列は、それぞれ図３０にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0187] １０）－１－２ ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖：

配列表の配列番号３５に示されるｈＲ１９８＿Ｌ３軽鎖のアミノ酸番号４４番目のアルギニン残基をヒスチジン残基に、４８番目のセリン残基をアスパラギン残基に、５１番目のアスパラギン残基をグリシン残基に、７０番目のセリン残基をロイシン残基に、７５番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に、７６番目のセリン残基をトリプトファン残基に、１１３番目のトレオニン残基をイソロイシン残基に、１１７番目のトレオニン残基をセリン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８軽鎖を「ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖」と命名した。

[0188] ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号５７であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至７０２であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至３７８である。また、ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号５８であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖はそのアミノ酸番号２１乃至２３４からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２１乃至１２６からなる。さらに、配列番号５７および５８の配列は、それぞれ図３１にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0189] １０）－１－３ ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖：

配列表の配列番号３５に示されるｈＲ１９８＿Ｌ３軽鎖のアミノ酸番号４４番目のアルギニン残基をヒスチジン残基に、４７番目のグルタミン残基をアルギニン残基に、４８番目のセリン残基をアスパラギン残基に、５１番目のアスパラギン残基をグリシン残基に、７０番目のセリン残基をロイシン残基に、７３番目のトレオニン残基をセリン残基に、７５番目のグルタミン酸残基をアスパラギン酸残基に、７６番目のセリン残基をトリプトファン残基に、１１３番目のトレオニン残基をイソロイシン残基に、１１７番目のトレオニン残基をセリン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８軽鎖を「ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖」と命名した。

[0190] ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号５９であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至７０２であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号６１乃至３７８である。また、ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６０であり、シグナル配列が切除された成熟軽鎖はそのアミノ酸番号２１乃至２３４からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２１乃至１２６からなる。さらに、配列番号５９および６０の配列は、それぞれ図３２にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0191] １０）－１－４ ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖：

配列表の配列番号４３に示されるｈＲ１９８＿Ｈ３重鎖のアミノ酸番号７８番目のアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に、１２３番目のバリン残基をアラニン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８重鎖を「ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ軽鎖」と命名した。

[0192] ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６１であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１３９８であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至４０８である。また、ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６２であり、シグナル配列が切除さ

れた成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６６からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２０乃至１３５からなる。さらに、配列番号６１および６２の配列は、それぞれ図３３にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0193] １０）－１－５　ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ重鎖：

配列表の配列番号４３に示されるｈＲ１９８＿Ｈ３重鎖のアミノ酸番号４８番目のバリン残基をイソロイシン残基に、７８番目のアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に、８１番目のアラニン残基をグリシン残基に、１２３番目のバリン残基をアラニン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８重鎖を「ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ軽鎖」と命名した。

[0194] ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６３であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１３９８であり、可変領域をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至４０８である。また、ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６４であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６６からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２０乃至１３５からなる。さらに、配列番号６３および６４の配列は、それぞれ図３４にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0195] １０）－１－６　ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ重鎖：

配列表の配列番号４３に示されるｈＲ１９８＿Ｈ３重鎖のアミノ酸番号４８番目のバリン残基をイソロイシン残基に、７８番目のアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に、８１番目のアラニン残基をメチオニン残基に、１２３番目のバリン残基をアラニン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化Ｒ１９８重鎖を「ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ軽鎖」と命名した。

[0196] ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号６５であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖をコードするのはヌクレオチド番号５８乃至１３９８であり、可変領域をコードするのはヌ

クレオチド番号５８乃至４０８である。また、ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号６６であり、シグナル配列が切除された成熟重鎖はそのアミノ酸番号２０乃至４６６からなり、可変領域はそのアミノ酸番号２０乃至１３５からなる。さらに、配列番号６５および６６の配列は、それぞれ図３５にも記載されている。各ＣＤＲ配列および対応する配列番号は図３８に示されている。

[0197] １０）－２　ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体のアフィニティマチュレーション抗体発現ベクターの作製

１０）－２－１　ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖発現ベクターの構築

ｐＣＭＡ－ＬＫ/ｈＲ１９８＿Ｌ３をテンプレートにして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓを用いて、アミノ酸番号５１番目のアスパラギン残基をグリシン残基に、１１３番目のトレオニン残基をイソロイシン残基に、１１７番目のトレオニン残基をセリン残基に置き換える変異を導入した。配列表の配列番号５５に示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ/ｈＲ１９８＿ＬＧ１」と命名した。

[0198] １０）－２－２　ｈＲ１９８＿ＬＧ２およびＬＧ３タイプ軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号５９に示されるＬＧ３のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至４０２に示されるｈＲ１９８＿ＬＧ３の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片を制限酵素ＥｃｏＲＶおよびＡｖａＩで切断し、同じ制限酵素で切断したｐＣＭＡ－ＬＫ/ｈＲ１９８＿ＬＧ１に挿入することによりｈＲ１９８＿ＬＧ３発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ/ｈＲ１９８＿ＬＧ３」と命名した。

[0199] ｐＣＭＡ－ＬＫ/ｈＲ１９８＿ＬＧ３をテンプレートにして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓを用いて、アミノ酸番号４７番目のアルギニン残基をグルタミン残基に、７３番目のセリン残基をトレオニン残基に置き換える変異を導入した。配列表の配列番号５７に示されるヌクレオチド配列

を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－ＬＫ/ｈＲ１９８＿ＬＧ２」と命名した。

[0200] １０）－２－３　ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖発現ベクターの構築

ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿Ｈ３をテンプレートにして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓを用いて、アミノ酸番号７８番目のアスパラギン残基をアスパラギン酸残基に、１２３番目のバリン残基をアラニン残基に置き換える変異を導入した。配列表の配列番号６１示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ１」と命名した。

[0201] １０）－２－４　ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ重鎖発現ベクターの構築

ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ１をテンプレートにして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓを用いて、アミノ酸番号４８番目のバリン残基をイソロイシン残基に、８１番目のアラニン残基をグリシン残基に置き換える変異を導入した。配列表の配列番号６３に示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ２」と命名した。

[0202] １０）－２－５　ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ重鎖発現ベクターの構築

ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ２をテンプレートにして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓを用いて、アミノ酸番号８１番目のグリシン残基をメチオニン残基に置き換える変異を導入した。配列表の配列番号６５に示されるヌクレオチド配列を含む得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ３」と命名した。

[0203] １０）－３　ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体のアフィニティマチュレーション抗体の調製

４）－５－１と同様の方法によって、１０）－２で作製したヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体重鎖発現ベクターとヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体軽鎖発現ベクターをＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に遺伝子導入し、抗体を含む培養上清を得た。

[0204] 鋳型としたｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿Ｈ３、変異を導入したｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ１、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ２、ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ３と、ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８＿ＬＧ１、ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８＿ＬＧ２、ｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８＿ＬＧ３との組合せによって取得されたヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体をそれぞれ、「ｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１」、「ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１」、「ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ２」、「ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ３」、「ｈＲ１９８＿ＨＧ２／ＬＧ１」、「ｈＲ１９８＿ＨＧ３／ＬＧ１」と命名した。

[0205] ４）－５－２と同様の方法によって、得られた培養上清をｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィーで精製し、精製抗体サンプルを得た。

[0206] ［実施例１１］アフィニティマチュレーション抗体のｉｎ ｖｉｔｒｏ活性

１１）－１ フローサイトメトリーによるアフィニティマチュレーション抗体の結合能評価

ヒトＯｒａｉ１に対する結合特異性を評価するため、１）－４－１で示す方法により作製したｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液あるいはｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、それぞれに対し１０）－３で作製したアフィニティマチュレーション抗体のｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ２、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ３、ｈＲ１９８＿ＨＧ２／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ３／ＬＧ１と、親抗体のｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３、ｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４を加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％ ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、５％ ＦＢＳ含有ＰＢＳで１００倍に希釈したＡｎｔｉ－ｈｕｍａｎ ＩｇＧ ＦＩＴＣ ｃｏｎｊｕｇａｔｅを加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％ ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、１μｇ／ｍＬ Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ ｉｏｄｉｄｅを含む５％ ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメータ

ー（ＦＣ５００）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏで行った。Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）を算出した。アフィニティマチュレーション抗体ｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ２、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ３、ｈＲ１９８＿ＨＧ２／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ３／ＬＧ１は、親抗体であるｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３、ｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４と同様、ｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞には結合せず、図８に示すとおりｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に対しては、親抗体と比べて同等以上にヒトＯｒａｉ１に結合する傾向が見られた。

[0207] １１）－２　アフィニティマチュレーション抗体のＴ細胞活性化抑制作用

ヒトＴ細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞を、１０％　ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍＬ　Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎおよび１００μｇ／ｍＬ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを含むＲＰＭＩ１６４０で１．５ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度に調製し、９６－ｗｅｌｌｓ細胞培養プレートに８０μＬずつ播種し、アフィニティマチュレーション抗体であるｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ２、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ３、ｈＲ１９８＿ＨＧ２／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ３／ＬＧ１、ヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体であるｈＲ１９８＿Ｈ３／Ｌ３、ｈＲ１９８＿Ｈ４／Ｌ４を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加して３７℃、５％　CO_2下で６０分間前処置した。その後、１００ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡおよび１μｇ／ｍＬ　Ａ２３１８７を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加し、よく攪拌した後、約１６時間３７℃、５％　CO_2下で培養した。プレートをよく攪拌した後、６００ｇにて３分間遠心し、上清に含まれるＩＬ－２濃度をＥＬＩＳＡ法で測定した 。図９はアフィニティマチュレーション抗体がＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示す。アフィニティマチュレーション抗体はＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を

添加濃度依存的に阻害し、その阻害活性はいずれも親抗体であるヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体ｈＨ３／Ｌ３、ｈＨ４／Ｌ４を上回るものであった。

[0208] ［実施例１２］アフィニティマチュレーション抗体のエフェクター活性低減改変体の作製

ｈＲ１９８＿ＨＧ１の定常領域の２個のアミノ酸残基を置換した定常領域改変ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ配列を以下の実施例に記載されるように構築した。

１２）－１　ＬＡＬＡタイプ重鎖発現ベクターの設計

正常のヒトＯｒａｉ１発現細胞への細胞傷害を回避するために、抗体のエフェクター活性は低いことが望ましい。エフェクター活性は抗体のサブクラスによって異なることが知られている。ＩｇＧ４はＡＤＣＣ、ＣＤＣ活性が低く、ＩｇＧ２はＣＤＣ活性を有するが、ＡＤＣＣ活性は低い、などの特徴が見られる。この特徴より、ＩｇＧ１の定常領域の一部の配列をＩｇＧ２，４を参考にして置換することにより、ＡＤＣＣ、ＣＤＣ活性が低減されたＩｇＧ１抗体を作製することが可能である。一例として、Ｍａｒｊａｎ　Ｈｅｚａｒｅｈ　ｅｔ．　ａｌ．　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，７５（２４）：１２１６１－１２１６８（２００１）によれば、ＩｇＧ１の２３４番目、２３５番目のロイシン残基（数字はＫａｂａｔらによるＥＵインデックス）をそれぞれアラニン残基に置換すると、ＡＤＣＣ、ＣＤＣ活性が低下することが示されている。そこで、１０）－１で作製されたｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖に対して、アミノ酸番号２５３番目のロイシン残基をアラニン残基に、２５４番目のロイシン残基をアラニン残基に置き換えることを伴い設計されたヒト化抗ヒトＯｒａｉ１抗体重鎖を「ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡタイプ重鎖」と命名した。

[0209] １２）－２　ＬＡＬＡタイプ重鎖発現ベクターの構築

１２）－２－１　ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡタイプ重鎖発現ベクターの構築

７）－２で作製された、ｈＲ１９８＿Ｈ４タイプ重鎖ｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈ

Ｒ１９８＿Ｈ４をテンプレートとし、ＫＯＤ －Ｐｌｕｓ－ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔを用いて、変異を導入することによりｈＲ１９８＿Ｈ４－ＬＡＬＡタイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１－ＬＡＬＡ／ｈＲ１９８＿Ｈ４」と命名した。ｈＲ１９８＿Ｈ４－ＬＡＬＡタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号６７および６８（図３６）にそれぞれ示す。

[0210] ｐＣＭＡ－Ｇ１－ＬＡＬＡ／ｈＲ１９８＿Ｈ４を制限酵素ＰｓｔＩおよびＸｂａＩで消化して得られる約４．２ｋｂのＤＮＡ断片に、１０）－２で作製されたｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ１を同様の制限酵素で消化して得られる抗体可変領域を含む約０．６ｋｂのＤＮＡ断片を、Ｌｉｇａｔｉｏｎ Ｈｉｇｈ ｖｅｒ．２を用いて挿入することにより、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡタイプ重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ１－ＬＡＬＡ／ｈＲ１９８＿ＨＧ１」と命名した。ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列および該重鎖のアミノ酸配列を、配列表の配列番号６９および７０（図３７）にそれぞれ示す。

[0211] １２）－３ アフィニティマチュレーション抗体のエフェクター活性低減改変体の調製

１２）－３－１ アフィニティマチュレーション抗体のエフェクター活性低減改変体の生産

ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ細胞（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期の１．２×10^9個のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３Ｆ細胞（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を３Ｌ Ｆｅｒｎｂａｃｈ Ｅｒｌｅｎｍｅｙｅｒ Ｆｌａｓｋ（ＣＯＲＮＩＮＧ社）に播種し、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｍｅｄｉｕｍ （Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で希釈して１．０

×１０６細胞／ｍＬに調製したのちに、３７℃、８％CO_2インキュベーター内で９０ｒｐｍで一時間振とう培養した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅ　＃２４７６５）３．６ｍｇをＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）２０ｍＬに溶解し、次にＰｕｒｅＬｉｎｋ　ＨｉＰｕｒｅ　Ｐｌａｓｍｉｄキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いて調製した軽鎖発現ベクター（０．８ｍｇ）および重鎖発現ベクター（０．４ｍｇ）を２０ｍＬのＯｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）に添加した。Ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅｉｍｉｎｅ／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液２０ｍｌに、発現ベクター／Ｏｐｔｉ－Ｐｒｏ　ＳＦＭ混合液２０ｍＬを加え穏やかに攪拌し、さらに５分間放置した後にＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３Ｆ細胞に添加した。３７℃、８％CO_2インキュベーターで７日間、９０ｒｐｍで振とう培養して得られた培養上清をＤｉｓｐｏｓａｂｌｅ　Ｃａｐｓｕｌｅ　Ｆｉｌｔｅｒ　（ＡＤＶＡＮＴＥＣ社　＃ＣＣＳ－０４５－Ｅ１Ｈ）でろ過した。ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１はｐＣＭＡ－Ｇ１／ｈＲ１９８＿ＨＧ１とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８＿ＬＧ１との組合せにより生産し、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１はｐＣＭＡ－Ｇ１－ＬＡＬＡ／ｈＲ１９８＿ＨＧ１とｐＣＭＡ－ＬＫ／ｈＲ１９８＿ＬＧ１との組合せにより生産した。

[0212] １２）－３－２　アフィニティマチュレーション抗体のエフェクター活性低減改変体の二段階工程精製

実施例１２）－３－１で得られた培養上清から抗体を、ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー（４－６℃下）とセラミックハイドロキシアパタイト（室温下）の二段階工程で精製した。ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティークロマトグラフィー精製後とセラミックハイドロキシアパタイト精製後のバッファー置換工程は４－６℃下で実施した。ＰＢＳで平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔＳｕＲｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社、ＨｉＴｒａｐカラム）に培養上清をアプライした。培養上清がカラムに全て入ったのち、カラム容量２倍以上のＰＢＳでカラムを洗浄し

た。次に２Ｍアルギニン塩酸塩溶液（ｐＨ４．０）で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ）によりＰＢＳに置換した後、５ｍＭリン酸ナトリウム／５０ｍＭ　ＭＥＳ／ｐＨ７．０のバッファーで５倍希釈した抗体溶液を、５ｍＭ　ＮａＰｉ／５０ｍＭ　ＭＥＳ／３０ｍＭ　ＮａＣｌ／ｐＨ７．０のバッファーで平衡化されたセラミックハイドロキシアパタイトカラム（日本バイオラッド社、Ｂｉｏ－Ｓｃａｌｅ　ＣＨＴ　Ｔｙｐｅ－１　Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ　Ｃｏｌｕｍｎ）にアプライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社，Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｃａｓｓｅｔｔｅ）によりＨＢＳｏｒ（２５ｍＭ　ヒスチジン／５％　ソルビトール、ｐＨ６．０）への液置換を行った。Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ＵＦ　Ｆｉｌｔｅｒ　Ｄｅｖｉｃｅ　ＶＩＶＡＳＰＩＮ２０（分画分子量ＵＦ１０Ｋ，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社、４℃下）にて濃縮し、ＩｇＧ濃度を５ｍｇ／ｍＬ以上に調製した。最後にＭｉｎｉｓａｒｔ－Ｐｌｕｓ　ｆｉｌｔｅｒ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ社）でろ過し、精製サンプルとした。

[0213] ［実施例１３］ヒト抗ヒトＯｒａｉ１抗体２Ｃ１．１および５Ｈ３．１の発現ベクターの作製

２Ｃ１．１抗体および５Ｈ３．１抗体はＷＯ２０１１０６３２７７Ａ１に記載されている軽鎖、および重鎖のアミノ酸配列をもとに作製した。

１３）－１　キメラ化およびヒト化ＩｇＧ２タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ２の構築

ｐＣＭＡ－ＬＫをＸｂａＩおよびＰｍｅＩで消化してκ鎖分泌シグナルおよびヒトκ鎖定常領域を取り除いたＤＮＡ断片と、配列表の配列番号７１に示されるヒト重鎖分泌シグナルおよびヒトＩｇＧ２定常領域のアミノ酸をコードする配列を含むＤＮＡ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　Ａｄｖａｎｔａｇｅ　ＰＣＲクローニングキットを用いて結合して、ＣＭＶプロモーターの下流

にシグナル配列、クローニングサイト、ヒトＩｇＧ２重鎖定常領域をもつキメラおよびヒト化ＩｇＧ２タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ２を構築した。

[0214] １３）－２　２Ｃ１．１抗体重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号７２に示される２Ｃ１．１抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４３４に示される２Ｃ１．１抗体重鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－で２Ｃ１．１抗体重鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラおよびヒト化抗体ＩｇＧ２タイプ重鎖発現ベクターｐＣＭＡ－Ｇ２を制限酵素ＢｌｐＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキットを用いて挿入することにより２Ｃ１．１抗体重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ２／２Ｃ１．１」と命名した。

[0215] ２Ｃ１．１抗体重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号７３に示した。

[0216] １３）－３　２Ｃ１．１抗体軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号７４に示される２Ｃ１．１抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至７３９に示される２Ｃ１．１抗体軽鎖の可変領域と定常領域（λ鎖）をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－で２Ｃ１．１抗体軽鎖の可変領域と定常領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラおよびヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＢｓｉＷＩおよびＰｍｅＩで切断した箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキットを用いて挿入することにより２Ｃ１．１抗体軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｌ／２Ｃ１．１」と命名した。

[0217] ２Ｃ１．１抗体軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号７５に示した。

[0218] １３）－４　５Ｈ３．１抗体重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号７６に示される５Ｈ３．１抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３６乃至４３４に示される５Ｈ３．１抗体重鎖の可変領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。実施例１３）－２と同様の方法で５Ｈ３．１抗体重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｇ２／５Ｈ３．１」と命名した。

[0219] ５Ｈ３．１抗体重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号７７に示した。

[0220] １３）－５　５Ｈ３．１抗体軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号７８に示される５Ｈ３．１抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列のヌクレオチド番号３８乃至７４２に示される５Ｈ３．１抗体軽鎖の可変領域と定常領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。実施例１３）－３と同様の方法で５Ｈ３．１抗体軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ－Ｌ／５Ｈ３．１」と命名した。

[0221] ５Ｈ３．１抗体軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号７９に示した。

[0222] １３）－６　２Ｃ１．１抗体および５Ｈ３．１抗体の調製

１３）－６－１　２Ｃ１．１抗体および５Ｈ３．１抗体の生産

実施例１２）－３－１と同様の方法で、抗体を生産した。２Ｃ１．１抗体はｐＣＭＡ－Ｇ２／２Ｃ１．１とｐＣＭＡ－Ｌ／２Ｃ１．１との組合せにより生産し、５Ｈ３．１抗体はｐＣＭＡ－Ｇ２／５Ｈ３．１とｐＣＭＡ－Ｌ／５Ｈ３．１との組合せにより生産した。

[0223] １３）－６－２　２Ｃ１．１抗体および５Ｈ３．１抗体の二段階工程精製

実施例１２）－３－２と同様の方法で、実施例１３）－６－１で生産された培養上清について抗体の二段階工程精製を行った。

[0224] ［実験例１４］マウス抗ヒトＯｒａｉ１抗体１０Ｆ８、１４Ｆ７４、および１７Ｆ６の作製

１０Ｆ８抗体、１４Ｆ７４抗体、および１７Ｆ６抗体はＷＯ２０１３０９１９０３Ａ１に記載されている軽鎖、および重鎖のアミノ酸配列をもとに作製

した。

１４）－１　１０Ｆ８抗体重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号８０に示される１０Ｆ８抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。合成したＤＮＡ断片をテンプレートとして、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－で１０Ｆ８抗体重鎖をコードする配列を含むＤＮＡ断片を増幅し、キメラおよびヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＸｂａＩおよびＰｍｅＩで消化してκ鎖分泌シグナルおよびヒトκ鎖定常領域を取り除いた箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキットを用いて挿入することにより１０Ｆ８抗体重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ　／１０Ｆ８Ｈ」と命名した。

[0225]　１０Ｆ８抗体重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号８１に示した。

[0226]　１４）－２　１０Ｆ８抗体軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号８２に示される１０Ｆ８抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社Ｓｔｒｉｎｇｓ　ＤＮＡ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ）。合成したＤＮＡ断片を、キメラおよびヒト化抗体軽鎖発現ベクターｐＣＭＡ－ＬＫを制限酵素ＸｂａＩおよびＰｍｅＩで消化してκ鎖分泌シグナルおよびヒトκ鎖定常領域を取り除いた箇所にＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　ＰＣＲクローニングキットを用いて挿入することにより１０Ｆ８抗体軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ　／１０Ｆ８Ｌ」と命名した。

[0227]　１０Ｆ８抗体軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号８３に示した。

[0228]　１４）－３　１４Ｆ７４抗体重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号８４に示される１４Ｆ７４抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。実施例１４）－１と同様の方法により１４Ｆ７４抗体重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ　／１４Ｆ７４Ｈ」と命名した。

[0229] １４Ｆ７４抗体重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号８５に示した。

[0230] １４）－４　１４Ｆ７４抗体軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号８６に示される１４Ｆ７４抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社Ｓｔｒｉｎｇｓ ＤＮＡ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ）。実施例１４）－２と同様の方法により１４Ｆ７４抗体軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ　／１４Ｆ７４Ｌ」と命名した。

[0231] １４Ｆ７４抗体軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号８７に示した。

[0232] １４）－５　１７Ｆ６抗体重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号８８に示される１７Ｆ６抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社　人工遺伝子合成サービス）。実施例１４）－１と同様の方法により１７Ｆ６抗体重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ　／１７Ｆ６Ｈ」と命名した。

[0233] １７Ｆ６抗体重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号８９に示した。

[0234] １４）－６　１７Ｆ６抗体軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号９０に示される１７Ｆ６抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡ断片を合成した（ＧＥＮＥＡＲＴ社Ｓｔｒｉｎｇｓ ＤＮＡ　Ｆｒａｇｍｅｎｔｓ）。実施例１４）－２と同様の方法により１７Ｆ６抗体軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「ｐＣＭＡ／１７Ｆ６Ｌ」と命名した。

[0235] １７Ｆ６抗体軽鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号９１に示した。

[0236] １４）－７　１０Ｆ８抗体、１４Ｆ７４抗体、および１７Ｆ６抗体の調製

１４）－７－１　１０Ｆ８抗体、１４Ｆ７４抗体、および１７Ｆ６抗体の生産

実施例１２）－３－１と同様の方法で生産した。１０Ｆ８抗体はｐＣＭＡ／１０Ｆ８ＨとｐＣＭＡ　／１０Ｆ８Ｌとの組合せにより生産し、１４Ｆ７４抗体はｐＣＭＡ　／１４Ｆ７４ＨとｐＣＭＡ　／１４Ｆ７４Ｌの組み合わせ

により生産し、１７Ｆ６抗体はｐＣＭＡ　/１７Ｆ６ＨとｐＣＭＡ　/１７Ｆ６Ｌの組み合わせにより生産した。

[0237] １４）－７－２　１０Ｆ８抗体、１４Ｆ７４抗体、および１７Ｆ６抗体の二段階工程精製

実施例１２）－３－２と同様の方法で、実施例１４）－７－１で得られた培養上清について抗体の二段階工程精製を行った。

[0238] ［実施例１５］アフィニティマチュレーション抗体のエフェクター活性低減改変体とその他の抗ヒトＯｒａｉ１抗体のｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性比較

１５）－１　フローサイトメトリーによる抗ヒトＯｒａｉ１抗体の抗原結合活性

１）－１－１で構築したヒトＯｒａｉ１発現ベクターを１）－４－２で示す方法によりＨＥＫ２９３Ｔ細胞に導入した細胞懸濁液を遠心し、上清を除去した後、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞およびｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のそれぞれに対し、１２）－３で作製したｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１－ＬＡＬＡ、１３）－６で作製した２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１４）－７で作製した１０Ｆ８、１４Ｆ７４、１７Ｆ６、およびコントロールとしてヒトＩｇＧコントロール抗体とマウスＩｇＧコントロール抗体を加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、ヒト抗体に関しては、５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで１００倍に希釈したＡｎｔｉ－ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ、マウス抗体に関してはＡｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ　ＦＩＴＣ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ（Ｃａｐｐｅｌ社）を加えて懸濁し、４℃で３０分静置した。５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳで２回洗浄した後、１μｇ／ｍＬ　Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅを含む５％　ＦＢＳ含有ＰＢＳに再懸濁し、フローサイトメーター（ＦＣ５００）で検出を行った。データ解析はＦｌｏｗｊｏで行った。Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ　ｉｏｄｉｄｅ陽性の死細胞をゲートで除外した後、生細胞のＦＩＴＣ蛍光強度のヒストグラムを作成し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）を算出した。

ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、１７Ｆ６はｐｃＤＮＡ３．１－ＤＥＳＴ導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞には結合せず、図１０（ヒト抗体）、図１１（マウス抗体）に示すとおり、ｐｃＤＮＡ３．１－ｈＯｒａｉ１導入ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に対しては、結合が見られたことから、いずれの抗体も特異的にヒトＯｒａｉ１に結合することが示された。一方、マウスＩｇＧコントロール抗体では結合は観察されなかった。

[0239] １５）－２　抗ヒトＯｒａｉ１抗体のヒトＴ細胞株活性化抑制作用

ヒトＴ細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞を、ＲＰＭＩ１６４０（１０％　ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍＬ　Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎおよび１００μｇ／ｍＬ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを含む）で１．５ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度に調製し、９６－ｗｅｌｌｓ細胞培養プレートに８０μＬずつ播種し、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、１７Ｆ６を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加して３７℃、５％　ＣＯ$_{2}$下で６０分間前処置した。その後、１００ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡおよび１μｇ／ｍＬ　Ａ２３１８７を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加し（最終濃度１０ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡおよび１００ｎｇ／ｍＬ　Ａ２３１８７）、よく攪拌した後、約１６時間３７℃、５％　ＣＯ$_{2}$下で培養した。プレートをよく攪拌した後、６００ｇにて３分間遠心し、上清に含まれるＩＬ－２濃度をＥＬＩＳＡ法で測定した　。図１２は抗ヒトＯｒａｉ１抗体がＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞からのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示す。図１３は抗体非添加時のＩＬ－２濃度を１００％とした時の、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、１７Ｆ６の半数阻害濃度（ＩＣ$_{50}$）および８０％阻害濃度（ＩＣ$_{80}$）を示す。先行技術の抗体のＩＣ$_{50}$は８０ｎｇ／ｍＬ以上である一方で、本発明の代表的な抗体のＩＣ$_{50}$は１０ｎｇ／ｍＬ以下である。また先行技術の抗体のＩＣ$_{80}$は６００００ｎｇ／ｍＬ以上である一方で、本発明の代表的な抗体のＩ

C_{80}は２００ｎｇ／ｍＬ以下である。

[0240] １５）－３　アフィニティマチュレーション抗体のエフェクター活性低減改変体とその他の抗ヒトＯｒａｉ１抗体のヒト末梢血単核球活性化抑制作用

ヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ）はＣｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社から凍結品として購入し、指示書に従って解凍して使用した。１０％ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍＬ　Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎおよび１００μｇ／ｍＬ　Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを含むＲＰＭＩ１６４０で２．０ｘ１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの濃度に調製したＰＢＭＣを９６－ｗｅｌｌｓ細胞培養プレートに８０μＬずつ播種し、各種抗ヒトＯｒａｉ１抗体を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加して３７℃インキュベーター内で６０分間前処置した。その後、１００ｎｇ／ｍＬ　ＰＭＡおよび１μｇ／ｍＬ　Ａ２３１８７を１０μＬ／ｗｅｌｌ添加し、よく攪拌した後、約１６時間３７℃、５％　CO_2下で培養した。プレートをよく攪拌した後、６００ｇにて３分間遠心し、上清に含まれるＩＬ－２濃度およびインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）濃度（ＭＡＢＴＥＣＨ社）をＥＬＩＳＡ法で測定した 。図５１は抗ヒトＯｒａｉ１抗体がＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２の放出を添加濃度依存的に抑制することを示す。図５２は抗体非添加時のＩＬ－２濃度を１００％とした時の、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、１７Ｆ６の半数阻害濃度（IC_{50}）および８０％阻害濃度（IC_{80}）を示す。先行技術の抗体のIC_{50}は１００ｎｇ／ｍＬ以上である一方で、本発明の代表的な抗体のIC_{50}は２０ｎｇ／ｍＬ以下である。また先行技術の抗体のIC_{80}は１７０００ｎｇ／ｍＬ以上である一方で、本発明の代表的な抗体のIC_{80}は４００ｎｇ／ｍＬ以下である。図５３は抗ヒトＯｒａｉ１抗体がＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒトＰＢＭＣからのＩＦＮ－γの放出を添加濃度依存的に抑制することを示す。図５４は抗体非添加時のＩＦＮ－γ濃度を１００％とした時の、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、２Ｃ１．１、５Ｈ３．１、１０Ｆ８、１４Ｆ７４、１７Ｆ

６の半数阻害濃度（ＩＣ$_{50}$）および８０％阻害濃度（ＩＣ$_{80}$）を示す。先行技術の抗体のＩＣ$_{50}$は８００ｎｇ／ｍＬ以上である一方で、本発明の代表的な抗体のＩＣ$_{50}$は４０ｎｇ／ｍＬ以下である。また先行技術の抗体のＩＣ$_{80}$は３００００ｎｇ／ｍＬ以上である一方で、本発明の代表的な抗体のＩＣ$_{80}$は２０００ｎｇ／ｍＬ以下である。

[0241] ［実施例１６］ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１のｉｎ ｖｉｖｏ活性

１６）－１ ヒトＰＢＭＣ移入マウス移植片対宿主病モデルに対するｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１の投与効果

重度複合免疫不全マウスであるＮＳＧマウス（ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃ＜ｓｃｉｄ＞Ｉｌ２ｒｇ＜ｔｍ１Ｗｊｌ＞／ＳｚＪ）にヒトＰＢＭＣを移入することで、ヒト移植片対宿主病様の反応が誘導できることが知られている（Ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１５７：１０４－１１８（２００９））。日本チャールス・リバー社から購入した６週齢の雄性ＮＳＧマウス１７匹に２．０ＧｙのＸ線を照射した後（日立Ｘ線照射装置 ＭＢＲ－１５２０Ｒ－４）、マウスを２匹の１群と５匹の３群に分割した。ＨＢＳｏｒ（２５ｍＭ ｈｙｓｔｉｄｉｎｅ／５％ ｓｏｒｂｉｔｏｌ，ｐＨ６．０）にて３ｍｇ／ｍＬおよび６ｍｇ／ｍＬとなるよう調製したｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１を１０ｍＬ／ｋｇ、即ち３０ｍｇ／ｋｇおよび６０ｍｇ／ｋｇとなるよう２群（ｎ＝５）のマウスに尾静脈内投与した。１群（ｎ＝５）はＶｅｈｉｃｌｅ群としてＨＢＳｏｒのみを投与した。翌日、凍結ヒトＰＢＭＣ（Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社）をＣＴＬ－ａｎｔｉａｇｇｒｉｇａｔｅ（Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社）を用いてプロトコールに従って解凍し、３百万個のヒトＰＢＭＣを２００μＬのＰＢＳに浮遊させて３群（ｎ＝５）のマウスに移入、１群（ｎ＝２）はヒトＰＢＭＣを移入せずＸ線照射コントロール群として経過を観察した。投与群においては、Ｘ照射後第０日、７日、１４日、２１日に同用量のｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１もしくはＨＢＳｏｒを投与した。各マウスの体重は第０日、１日、４日、７日、９日、１０日、１１

日と１３日以降の毎日計測し、第０日の体重を１００％として体重変化をパーセント換算し、各群の平均体重変化を図５５に示した。Ｖｅｈｉｃｌｅ投与群の平均体重の減少は第１６日くらいから観察され始めた。実験はＶｅｈｉｃｌｅ投与群の平均体重が８０％を下回った第２１日に終了した。この時点において、ヒトＰＢＭＣを移入しなかったＸ線照射コントロール群は体重減少を示さなかった。ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１を３０ｍｇ／ｋｇおよび６０ｍｇ／ｋｇ投与したマウスも体重は減少せず、平均体重はヒトＰＢＭＣ非移入マウスと同等であった。本系においてヒトＰＢＭＣの活性化による移植片対宿主病の症状を顕著に抑制したｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１（抗Ｏｒａｉ１抗体）には、ヒト移植片対宿主病に対する治療および／または予防効果が期待される。

[0242] １６）－２　Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスを用いたｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１のｉｎ　ｖｉｖｏ活性評価

１６）－２－１　Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスの作出

マウスＯｒａｉ１の第２細胞外ループドメインのアミノ酸配列をヒトＯｒａｉ１配列に置換したＨｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスは、遺伝子改変マウス作製の定法に従って株式会社特殊免疫研究所で作出された。概要を記すと、マウスＯｒａｉ１遺伝子座を含むＢＡＣクローンのコード領域のＤＮＡ配列をヒトＯｒａｉ１遺伝子座に置換するとともに、ｌｏｘＰ配列で挟まれたネオ耐性遺伝子を導入し、ヒトＯｒａｉ１遺伝子のノックインターゲティングベクターを構築した。このターゲティングベクターをマウスＥＳ細胞に導入し、Ｇ４１８耐性株を樹立した。サザンハイブリダイゼ?ション法により、標的遺伝子座が特異的に組み換えられたＥＳ細胞株をスクリーニングした。さらに、Ｃｒｅ発現ベクターを導入してセレクションマーカーを除去し、そのＥＳ細胞株を利用してキメラＦ１マウスを作出した。サザンハイブリダイゼーションでジェノタイピングを行ない、Ｆ１マウスの中からヘテロ変異体個体を選別し、このＦ１ヘテロ変異体個体の交配により、Ｆ２ホモ変異体であるＨｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスを作出した。

[0243] １６）－２－２　ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１の受動皮膚アナフィラキシー（ＰＣＡ）反応抑制効果

マウスＰＣＡ反応は、定法に従って行った。特殊免疫研究所で生産された８週齢のＨｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスあるいは野生型の同腹兄弟マウスを保定器にて保定後、ＨＢＳｏｒにて６ｍｇ／ｍＬとなるよう調製したｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１を１０ｍＬ／ｋｇ、即ち６０ｍｇ／ｋｇとなるように尾静脈内投与した。Ｖｅｈｉｃｌｅ群にはＨＢＳｏｒのみを投与した。翌日イソフルラン（ファイザー社）吸入麻酔下、生理食塩水にて１０ｕｇ／ｍＬに調整したＭｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ａｎｔｉ－ＯＶＡ　ＩｇＥ（ｃｈｏｎｄｒｅｘ社）を１０μＬずつ耳介皮内に投与した。２４時間後、２ｍｇ／ｍＬのＯＶＡ（Ａｌｂｕｍｉｎ　ｆｒｏｍ　ｃｈｉｃｋｅｎ　ｅｇｇ　ｗｈｉｔｅ、ＳＩＧＭＡ社）および２０ｍｇ／ｍＬのＥｖａｎｓ　ｂｌｕｅ（Ｍｅｒｃｋ社）を含む生理食塩水を、５ｍｇ／ｋｇＯＶＡおよび１００ｍｇ／ｋｇＥｖａｎｓ　ｂｌｕｅとなるように尾静脈内投与した。３０分後にイソフルラン深麻酔下、放血致死させて耳介を切除し、０．５ｍＬのＤＭＳＯに浸し、Ｅｖａｎｓ　ｂｌｕｅを抽出した（３７℃、７２時間）。Ｅｖａｎｓ　ｂｌｕｅが抽出されたＤＭＳＯ溶液は、２００μＬずつ９６ウェルマイクロプレートに移し、Ｏ．Ｄ．６５０ｎｍをマイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｄｅｖｉｃｅｓ社、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍ５ｅ）で測定した。浸出したＥｖａｎｓ　ｂｌｕｅの吸光度は以下の計算法に従い、Ｖｅｈｉｃｌｅ投与群の平均値を１００％として表した。Ｂｌａｎｋには、ＤＭＳＯ溶液の吸光度を求めた。％＝（ＯＤ６５０ｓａｍｐｌｅ－ＯＤ６５０ｂｌａｎｋ）／（ＯＤ６５０ｖｅｈｉｃｌｅ－ＯＤ６５０ｂｌａｎｋ）。図５６は、Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスに誘導したＰＣＡ反応をｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１が抑制することを示している。マウスＰＣＡ反応はヒトのＩ型アレルギー反応であるアナフィラキシーを再現した即時型アレルギーの基本的なモデル系であり、本系が抗アレルギー薬の評価に使用可能であることが知られている（Ａｒｃｈｉｖｅｓ　ｉｎｔｅｒｎａ

ｔｉｏｎａｌｅｓ ｄｅ ｐｈａｒｍａｃｏｄｙｎａｍｉｅ ｅｔ ｄｅ ｔｈｅｒａｐｉｅ，１６５：９２－１０２（１９６７）、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ａｒｃｈｉｖｅｓ ｏｆ ａｌｌｅｒｇｙ ａｎｄ ａｐｐｌｉｅｄ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，７８：１１３－１１７（１９８５））。本系においてＩｇＥ依存的なマスト細胞脱顆粒に対する抑制活性が認められたｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１（抗Ｏｒａｉ１抗体）には、既存のマスト細胞脱顆粒阻害薬に認められる気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、さらに同じヒトのＩ型アレルギー疾患、例えばアレルギー性喘息などに対する治療および／または予防効果が期待される。

[0244] １６）－２－３ ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１の遅延型過敏（ＤＴＨ）反応抑制効果

マウスＤＴＨ反応は、定法に従って行った。特殊免疫研究所で生産された８週齢のＨｕｍａｎ Ｏｒａｉ１ノックインマウスあるいは野生型の同腹兄弟マウスを保定機にて保定後、ＨＢＳｏｒにて６ｍｇ／ｍＬとなるよう調製したｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１を１０ｍＬ／ｋｇ、即ち６０ｍｇ／ｋｇとなるように尾静脈内投与した。Ｖｅｈｉｃｌｅ群にはＨＢＳｏｒのみを投与した。翌日生理食塩水にて５ｍｇ／ｍＬに希釈したｍＢＳＡ（Ａｌｂｕｍｉｎ Ｂｏｖｉｎｅ Ｍｅｔｈｙｌａｔｅｄ，ＳＩＧＭＡ社）とＦｒｅｕｎｄ‘ｓ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ Ａｄｊｕｖａｎｔ（ＤＩＦＣＯ社）を等量混合して調製したエマルジョン５０μＬずつを両腋下に皮下投与し免疫を行った。６日後、再びｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１を６０ｍｇ／ｋｇとなるように尾静脈内投与した。翌日生理食塩水にて０．５ｍｇ／ｍＬに調製したｍＢＳＡと生理食塩水をそれぞれイソフルラン吸入麻酔下方肢に皮内投与し、投与後６、２４、４８時間後の肢の腫れをダイアルゲージにて測定した。肢の腫れは０時間を０（10^{-2}ｍｍ）とし、経時的に変化する腫れの厚みを計算し、Ｖｅｈｉｃｌｅ投与群の平均値を１００％とし求めた。図５７は、Ｈｕｍａｎ Ｏｒａｉ１ノックインマウスに誘導したＤＴＨ反応を、抗原投与後６時間（Ａ）２４時間（Ｂ）４８時間（Ｃ）の各時点でｈＲ１９８＿ＨＧ１／Ｌ

Ｇ１が抑制していることを示す。マウスＤＴＨ反応はＴ細胞依存的な免疫の成立と応答を見る系であり、本系において活性を示した薬剤が強力な免疫抑制剤として開発されたことは良く知られている（Ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，５２：５９９－６０６（１９８３））。本系においてＴ細胞免疫の抑制活性が認めれたｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１（抗Ｏｒａｉ１抗体）には、Ｔ細胞活性に起因するヒトの生体反応や疾患、例えば移植物の拒絶、免疫疾患、炎症性疾患に対する治療および／または予防効果が期待される。

[0245] １６）－２－４ 抗Ｏｒａｉ１抗体の皮膚炎に対する抑制活性の検討

皮膚炎は以下のいずれかの方法で惹起する。すなわちマウスの腹腔内にアルブミン抗原液を０．５ｍＬ投与し、さらに２週間後に同量の抗原で追加免疫を施した後、アルブミン抗原液を耳（２０μＬ）または背部（１００μＬ）に３日～２週間ごとに３～６回繰り返し塗布する。あるいはダニ抗原クリームを耳（２０μＬ）または背部（１００μＬ）に３日～２週間ごとに３～６回繰り返し塗布する。あるハプテンであるピクリルクロライドまたはＤｉｎｉｔｒｏｆｌｕｏｒｏｂｅｎｚｅｎｅをプロトコールに従い調製し、耳（２０μＬ）または背部（１００μＬ）に週１回または２回、最大８週間塗布する。あるいは皮膚反応誘発物質であるＨｉｓｔａｍｉｎｅ、Ｃｏｍｐｏｕｎｄ ４０／８０、５－（ａｎｄ ６－）ｃａｒｂｏｘｙｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ ｄｉａｃｅｔａｔｅ ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ ｅｓｔｅｒ、Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ ｉｓｏｔｈｉｏｃｙａｎａｔｅ、Ｂｏｍｂｅｓｉｎ様ペプチドを耳（２０μＬ）、背部（１００μＬ）、脊髄内（５μＬ）に投与する。抗Ｏｒａｉ１抗体は皮膚炎誘導の前日もしくは１時間から４時間前に静脈内もしくは皮下に投与する。その後、投与頻度を７日から２８日間隔として抗体投与を継続する。皮膚炎誘発後、経時的にダイアルシックネスゲージを用いて耳介の厚さの測定や皮膚炎の肉眼的スコア化を行う。また試験期間終了後、血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度の定量、皮膚・末梢血・胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄から得た細胞の増殖活

性やサイトカイン産生能、表面抗原などの検討や、病理組織解析などを実施し、抗Ｏｒａｉ１抗体の皮膚炎に対する抑制活性を判定する。

[0246] １６）－２－５　抗Ｏｒａｉ１抗体の乾癬に対する抑制活性の検討

Ｉｍｉｑｕｉｍｏｄを用いる場合は、耳介両側または片面（５～３０ｍｇ）および剃毛済み背部（５０～１００ｍｇ）に塗布し乾癬性皮膚炎を誘導する。あるいは１０ｍｇ／ｍＬのＺｙｍｏｓａｎリン酸緩衝液中懸濁液を２００ｕＬ腹腔内投与して皮膚炎を誘導する。起炎物質としてサイトカイン（ＩＬ－２３など）を用いる場合は、１～５％イソフルラン深麻酔下で、マウス耳介片面へサイトカイン０．１～２μｇ含む溶液を２０～５０μＬ皮内投与し乾癬性皮膚炎を誘導する。抗Ｏｒａｉ１抗体は皮膚炎誘導の前日もしくは１時間から４時間前に静脈内もしくは皮下に投与する。その後、投与頻度を７日から２８日間隔として抗体投与を継続する。皮膚炎誘発後、経時的にダイアルシックネスゲージを用いて耳介の厚さ測定や皮膚炎の肉眼的スコア化を行う。また試験期間終了後、炎症部位の重量およびその部位に浸潤した好中球のミエロペルオキシダーゼ活性、浸潤した細胞のフローサイトメトリー解析、遺伝子解析、サイトカイン濃度測定などをし、抗Ｏｒａｉ１抗体の乾癬抑制活性を判定する。

[0247] １６）－２－６　抗Ｏｒａｉ１抗体の多発性硬化症に対する抑制活性の検討

Ｍｙｅｌｉｎ　ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅ　ｇｌｙｃｏｐｒｏｔｅｉｎまたはそのペプチド抗原を生理食塩水で４ｍｇ／ｍＬに調整し、生理食塩水で８ｍｇ／ｍＬに調整したフロイントの完全アジュバントと等量混合して乳化させ、この混合液２００μＬをマウスの脇腹または腹部の皮内に投与、その直後に同マウスに２μｇ／ｍＬの百日咳毒素水溶液を１００μＬ尾静脈から投与する。さらに２日後に上述の百日咳毒素液を再度尾静脈から投与することで実験的脳脊髄炎を誘導する。実験開始１週間から２週間後より脳脊髄炎が発症し、尾から下肢、前肢へと麻痺が拡大していく。この麻痺の程度を四肢・尾の動きを肉眼的に観察することによりスコア化する。抗Ｏｒａ

ｉ１抗体は脳脊髄炎誘導の前日もしくは１時間から４時間前に静脈内もしくは皮下に投与する。その後、投与頻度を７日から２８日間隔として抗体投与を継続し、抗Ｏｒａｉ１抗体の多発性硬化症に対する投与効果を判定する。

[0248] １６）－２－７　抗Ｏｒａｉ１抗体の関節炎に対する抑制活性の検討

２ｍｇ／ｍＬのウシＩＩ型コラーゲンとフロイントの完全アジュバントを体積比１：１．３で混合し乳化したものを、１ｍＬの注射筒とツベルクリン針を用いてマウスの尾根部皮内に１００μＬ投与する。２～３週間後に同じ処置を実施し、その後の四肢の関節腫脹をの肉眼的あるいはダイアルシックネスゲージを用いてスコア化する。試験期間終了時には、血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度、皮膚・末梢血・胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄から得た細胞の増殖活性・サイトカイン産生能・表面抗原などを測定する。抗Ｏｒａｉ１抗体は関節炎誘導の前日もしくは１時間から４時間前に静脈内もしくは皮下に投与する。その後、投与頻度を７日から２８日間隔として抗体投与を継続し、抗Ｏｒａｉ１抗体の関節炎に対する投与効果を判定する。

[0249] １６）－２－８　抗Ｏｒａｉ１抗体の大腸炎に対する抑制活性の検討

Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスのリンパ節と脾臓から採取し精製したリンパ球を、抗ＣＤ４抗体ＧＫ１．５、抗ＣＤ２５抗体ＰＣ６１．５、抗ＣＤ４５Ｒ抗体Ｃ３６３．１６Ａ（いずれもｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社）を用いてセルソーターにより単離する。この方法で得られた細胞が純度９５％以上のＣＤ４＋ＣＤ２５－ＣＤ４５ＲＢｈｉ　Ｔ－ｃｅｌｌｓであることをフローサイトメーターで確認したのち、０．５百万個を１２から１６週齢のＲａｇ２－／－マウスの腹腔内に移入する。その後１２週間、体重測定と下痢などの症状を観察し、観察期間終了後に剖検により腸管の肥厚度、ポリープの個数と大きさ、病理的特徴の有無を検討する。また血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度の定量、腸管・末梢血・胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄から得た細胞の増殖活性やサイトカイン産生能、表面抗原などを解析する。抗Ｏｒａｉ１抗体は細胞移入の前日もしくは１時間

から４時間前に静脈内もしくは皮下に投与する。その後、投与頻度を７日から２８日間隔として抗体投与を継続し、抗Ｏｒａｉ１抗体の大腸炎に対する投与効果を判定する。

[0250] １６）－２－９　抗Ｏｒａｉ１抗体の骨髄細胞移植系に対する作用の検討

Ｈｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスの大腿骨および脛骨を摘出し、針付き注射筒を用いて骨端から１０％ＦＢＳ－ＲＰＭＩ１６４０培地１～５ｍＬを注入して骨髄内の細胞を押し出し、セルストレイナー処理後の遠沈回収で骨髄細胞を回収、１０ｍＭＨＥＰＥＳ、０．５ｍＭＥＤＴＡ、０．５％Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ／Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎを含有するＩｎｊｅｃｔｉｏｎ　ｂｕｆｆｅｒに２００μＬ中１０百万個の骨髄細胞が含まれるよう調整する。同時にＨｕｍａｎ　Ｏｒａｉ１ノックインマウスの脾臓より定法に従って脾細胞を採取する。レシピエントである１０～１３週齢のＢＡＬＢ／ｃマウスに２．０～８．０ＧｙのＸ線を照射した後、２００μＬのドナー骨髄細胞に０～４百万個のドナー脾臓細胞を加え、この細胞混合液をレシピエントの尾静脈から注入する。その後、４から１６週間の体重変化や生存率、試験終了時のレシピエントマウスの血液や組織中の抗体・サイトカイン・血中バイオマーカー濃度、腸管・末梢血・胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄から得た細胞の表面抗原・増殖活性・サイトカイン産生能を測定する。抗Ｏｒａｉ１抗体は骨髄移植の前日もしくは１時間から４時間前に静脈内もしくは皮下よりレシピエントマウスに投与する。その後、投与頻度を７日から２８日間隔として抗体投与を継続し、抗Ｏｒａｉ１抗体の移植細胞の生着や移植片対宿主病の発生率に対する作用を判定する。

[0251] ［実施例１７］アフィニティマチュレーション抗体とその他の抗ヒトＯｒａｉ１抗体との物理化学的性質の比較

ｍ－ＶＲＯＣによる粘度測定

１０）－３で作製したｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１、１２）－３で作製したｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１、および１３）－６で作製した２Ｃ１．１を、ＶＩＶＡＰＯＲＥ　５（Ｓａｒｔ

ｏｒｉｕｓ社）で１５０ｍｇ／ｍＬ以上に濃縮後、ＨＢＳｏｒで９０、１２０および１５０ｍｇ／ｍＬに調製した。ｍ－ＶＲＯＣ（ＲｈｅｏＳｅｎｓｅ社）を用いて２５℃における粘度を各濃度３回測定し、平均Ｖｉｓｃｏｓｉｔｙ（ｍＰａ・ｓ）を算出した。結果を図５８および表１に示す。ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１の粘度はいずれの濃度においても２Ｃ１．１の粘度よりも低かった。特に、１５０ｍｇ／ｍＬでは、ｈＲ１９８＿ＨＧ１／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿Ｈ３／ＬＧ１、ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡ／ＬＧ１の粘度はそれぞれ１１．４、１０．０、１０．８ｍＰａ・ｓであるのに対し、２Ｃ１．１は２１．０ｍＰａ・ｓであり、２Ｃ１．１と比較して、アフィニティマチュレーション抗体は高濃度化しても粘度が低いことが示された。

[0252] [表1]

Sample	Concentration	Average Viscosity	SD Viscosity
	[mg/mL]	[mPa· s]	[mPa· s]
hR198_HG1/LG1	90	3.74	0.05
	120	6.11	0.02
	150	11.43	0.09
hR198_H3/LG1	90	3.66	0.04
	120	5.78	0.07
	150	9.98	0.10
hR198_HG1-LALA/LG1	90	3.74	0.06
	120	5.68	0.20
	150	10.82	0.37
2C1.1	90	4.05	0.02
	120	8.67	0.12
	150	20.96	0.08

産業上の利用可能性

[0253] 本発明のヒト化抗Ｏｒａｉ１抗体は、公知の抗体より強力なＴ細胞活性抑制作用を有しており、移植拒絶等の治療または予防剤となり得る。

配列表フリーテキスト

[0254] 配列番号１：ヒトＯｒａｉ１の遺伝子配列

配列番号２：ヒトＯｒａｉ１のアミノ酸配列

配列番号３：ＰＣＲプライマー　Ｎｈｅ－ｐｏｌｙＣ－Ｓ

配列番号４：ＰＣＲプライマー　ｒｌｇγ－ＡＳ１

配列番号５：ＰＣＲプライマー　ｒｌｇγ－ＡＳ２

配列番号６：ＰＣＲプライマー　Ｎｈｅ－ｐｏｌｙＣ－Ｓ

配列番号７：ＰＣＲプライマー　ｒｌｇκ－ＡＳ

配列番号８：シーケンスプライマー　ｒｌｇγ－ｓｅｑ

配列番号９：シーケンスプライマー　ｒｌｇκ－ｓｅｑ

配列番号１０：Ｒ１１８軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号１１：Ｒ１１８軽鎖のアミノ酸配列

配列番号１２：Ｒ１１８重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号１３：Ｒ１１８重鎖のアミノ酸配列

配列番号１４：Ｒ１９８軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号１５：Ｒ１９８軽鎖のアミノ酸配列

配列番号１６：Ｒ１９８重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号１７：Ｒ１９８重鎖のアミノ酸配列

配列番号１８：ヒトκ鎖分泌シグナルおよびヒトκ鎖定常領域をコードする配列を含むＤＮＡ断片

配列番号１９：ＰＣＲプライマー　３．３－Ｆ１

配列番号２０：ＰＣＲプライマー　３．３－Ｒ１

配列番号２１：ヒト重鎖シグナル配列およびヒトＩｇＧ１定常領域のアミノ酸をコードする配列を含むＤＮＡ断片

配列番号２２：ヒトキメラ化ｃＲ１１８軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号２３：ヒトキメラ化ｃＲ１１８軽鎖のアミノ酸配列

配列番号２４：ヒトキメラ化ｃＲ１９８軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号２５：ヒトキメラ化ｃＲ１９８軽鎖のアミノ酸配列

配列番号２６：ヒトキメラ化ｃＲ１１８重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号２７：ヒトキメラ化ｃＲ１１８重鎖のアミノ酸配列

配列番号２８：ヒトキメラ化ｃＲ１９８重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号２９：ヒトキメラ化ｃＲ１９８重鎖のアミノ酸配列

配列番号３０：ｈＲ１９８＿Ｌ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号３１：ｈＲ１９８＿Ｌ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号３２：ｈＲ１９８＿Ｌ２タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号３３：ｈＲ１９８＿Ｌ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号３４：ｈＲ１９８＿Ｌ３タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号３５：ｈＲ１９８＿Ｌ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号３６：ｈＲ１９８＿Ｌ４タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号３７：ｈＲ１９８＿Ｌ４タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号３８：ｈＲ１９８＿Ｈ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号３９：ｈＲ１９８＿Ｈ１タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号４０：ｈＲ１９８＿Ｈ２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号４１：ｈＲ１９８＿Ｈ２タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号４２：ｈＲ１９８＿Ｈ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号４３：ｈＲ１９８＿Ｈ３タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号４４：ｈＲ１９８＿Ｈ４タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号４５：ｈＲ１９８＿Ｈ４タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号４６：ＰＣＲプライマー　Ｏｒａｉ１　ＨＦ

配列番号４７：ＰＣＲプライマー　Ｏｒａｉ１　ＣＨ　ＦＲ

配列番号４８：ＰＣＲプライマー　Ｍ１３　ｒｅｖ　ｌｏｎｇ

配列番号４９：ＰＣＲプライマー　ＳｅｃＭ　Ｓｔｏｐ　Ｒ

配列番号５０：ＰＣＲプライマー　Ｏｒａｉ１　Ｌｃ　Ｆ

配列番号５１：ＰＣＲプライマー　Ｏｒａｉ１　ＣＬ－ＦＲ

配列番号５２：ＰＣＲプライマー　Ｏｒａｉ１　ＨＲ－ＦＬＡＧ　Ｒ

配列番号５３：ＰＣＲプライマー　Ｏｒａｉ１　ＣＬ－ＦＬＡＧ　Ｒ

配列番号５４：ＰＣＲプライマー　Ｍｙｃ－Ｒ

配列番号５５：ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号５６：ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号５７：ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配

列

配列番号５８：ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号５９：ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号６０：ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖のアミノ酸配列

配列番号６１：ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号６２：ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号６３：ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号６４：ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号６５：ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号６６：ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号６７：ｈＲ１９８＿Ｈ４－ＬＡＬＡタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号６８：ｈＲ１９８＿Ｈ４－ＬＡＬＡタイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号６９：ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡタイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号７０：ｈＲ１９８＿ＨＧ１－ＬＡＬＡタイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号７１：ヒト重鎖分泌シグナルおよびヒトＩｇＧ２定常領域のアミノ酸をコードする配列を含むＤＮＡ断片

配列番号７２：２Ｃ１．１抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号７３：２Ｃ１．１抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号７４：２Ｃ１．１抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号７５：２Ｃ１．１抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号７６：５Ｈ３．１抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号７７：５Ｈ３．１抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号７８：５Ｈ３．１抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号７９：５Ｈ３．１抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号８０：１０Ｆ８抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号８１：１０Ｆ８抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号８２：１０Ｆ８抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号８３：１０Ｆ８抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号８４：１４Ｆ７４抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号８５：１４Ｆ７４抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号８６：１４Ｆ７４抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号８７：１４Ｆ７４抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号８８：１７Ｆ６抗体重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号８９：１７Ｆ６抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号９０：１７Ｆ６抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号９１：１７Ｆ６抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号９２：ラットＣＤＲＬ１（Ｒ１９８に由来し、ｈＲ１９８＿Ｌ１乃至Ｌ４タイプ軽鎖に使用）

配列番号９３：改変型ＣＤＲＬ１（ｈＲ１９８＿ＬＧ１タイプ軽鎖に使用）

配列番号９４：改変型ＣＤＲＬ１（ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖に使用）

配列番号９５：改変型ＣＤＲＬ１（ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖に使用）

配列番号９６：ラットＣＤＲＬ２（Ｒ１１８およびＲ１９８で共通であり、ｈＲ１９８＿Ｌ１乃至Ｌ４およびＬＧ１タイプ軽鎖に使用）

配列番号９７：改変型ＣＤＲＬ２（ｈＲ１９８＿ＬＧ２タイプ軽鎖に使用）

配列番号９８：改変型ＣＤＲＬ２（ｈＲ１９８＿ＬＧ３タイプ軽鎖に使用）

配列番号９９：ラットＣＤＲＬ３（Ｒ１１８に由来し、ｈＲ１９８＿Ｌ３およびＬ４タイプ軽鎖に使用）

配列番号１００：ラットＣＤＲＬ３（Ｒ１９８に由来し、ｈＲ１９８＿Ｌ１およびＬ２タイプ軽鎖に使用）

配列番号１０１：改変型ＣＤＲＬ３（ｈＲ１９８＿ＬＧ１乃至ＬＧ３タイプ

軽鎖に使用）

配列番号１０２：ラットＣＤＲＨ１（Ｒ１１８に由来し、ｈＲ１９８＿Ｈ３、Ｈ４およびＨＧ１乃至ＨＧ４タイプ重鎖に使用）

配列番号１０３：ラットＣＤＲＨ１（Ｒ１９８に由来し、ｈＲ１９８＿Ｈ１およびＨ２タイプ重鎖に使用）

配列番号１０４：ラットＣＤＲＨ２（Ｒ１１８に由来し、ｈＲ１９８＿Ｈ３およびＨ４タイプ重鎖に使用）

配列番号１０５：ラットＣＤＲＨ２（Ｒ１９８に由来し、ｈＲ１９８＿Ｈ１およびＨ２タイプ重鎖に使用）

配列番号１０６：改変型ＣＤＲＨ２（ｈＲ１９８＿ＨＧ１タイプ重鎖に使用）

配列番号１０７：改変型ＣＤＲＨ２（ｈＲ１９８＿ＨＧ２タイプ重鎖に使用）

配列番号１０８：改変型ＣＤＲＨ２（ｈＲ１９８＿ＨＧ３タイプ重鎖に使用）

配列番号１０９：ラットＣＤＲＨ３（Ｒ１１８およびＲ１９８で共通であり、ｈＲ１９８＿Ｈ１乃至Ｈ４タイプ重鎖に使用

配列番号１１０：改変型ＣＤＲＨ３（ｈＲ１９８＿ＨＧ１乃至ＨＧ３タイプ重鎖に使用）

配列番号１１１：ｈＲ１９８＿Ｈ０タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号１１２：ｈＲ１９８＿Ｈ０タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号１１３：ｈＲ１９８＿Ｈ５タイプ重鎖をコードするヌクレオチド配列

配列番号１１４：ｈＲ１９８＿Ｈ５タイプ重鎖のアミノ酸配列

配列番号１１５：ビオチンＰＥＧ化ヒトＯｒａｉ１ループ領域ペプチド配列

配列番号１１６：ラットＣＤＲＬ１（Ｒ１１８に由来するが、ヒト化抗体では使用されていない。）

請求の範囲

[請求項1] 配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０４、１０６、１０７または１０８のいずれか一つに示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１０９または１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３、９４または９５のいずれか一つに示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６、９７または９８のいずれか一つに示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項2] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする請求項１に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項3] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０６に示されるアミノ酸配列か

らなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９４に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９７に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする請求項１に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項4] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９５に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９８に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする請求項１に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項5] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０７に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からな

ること；

を特徴とする請求項１に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項6] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０８に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする請求項１に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項7] 重鎖配列が、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＨ１は配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ２は配列番号１０４に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＨ３は、配列番号１０９に示されるアミノ酸配列からなること；および

軽鎖配列がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３を有する可変領域を含み、前記ＣＤＲＬ１は配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ２は配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなり、前記ＣＤＲＬ３は、配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなること；

を特徴とする請求項１に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項8] 配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１または２に記載の抗体または該

抗体の抗原結合性断片。

[請求項9] 配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項８に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項10] 配列番号７０に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項８に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項11] 配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１または３に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項12] 配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５８に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項１１に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項13] 配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号６０に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１または４に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項14] 配列番号６２に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号６

０に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項１３に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項15] 配列番号６４に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１または５に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項16] 配列番号６４に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項１５に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項17] 配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１または６に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項18] 配列番号６６に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３４番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項１７に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項19] 配列番号４３に示されるアミノ酸配列の２０乃至１３６番目のアミノ酸残基からなる重鎖可変領域配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至１２６番目のアミノ酸残基からなる軽鎖可変領域配列を含むことを特徴とする請求項１または７に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項20] 配列番号４３に示されるアミノ酸配列の２０乃至４６５番目または２０乃至４６６番目のアミノ酸残基からなる重鎖配列および配列番号５６に示されるアミノ酸配列の２１乃至２３５番目のアミノ酸残基からなる軽鎖配列からなることを特徴とする請求項１９に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項21] Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’およびＦｖからなる群から選択される、請求項１乃至２０のいずれか一つに記載の抗体の抗原結合性断片。

[請求項22] ｓｃＦｖであることを特徴とする、請求項１乃至８、１１、１３、１５、１７または１９のいずれか一つに記載の抗体。

[請求項23] 請求項１乃至２２に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片の少なくともいずれか一つを含有することを特徴とする、医薬組成物。

[請求項24] 移植物の拒絶、免疫関連疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、癌の治療および／または予防剤、抗血小板または抗血栓活性剤、Ｏｒａｉ１発現細胞活性化抑制剤であることを特徴とする、請求項２３に記載の医薬組成物。

[請求項25] 移植物の拒絶が、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、皮膚等の臓器もしくは組織の移植に対する拒絶反応および宿主対移植片反応、そして造血細胞（骨髄、末梢血、臍帯血等）の移植によって起こる移植片対宿主病であることを特徴とする、請求項２４に記載の医薬組成物。

[請求項26] 免疫関連疾患が、結合組織や筋骨格系（関節リウマチ、強直性脊椎炎、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発筋炎、皮膚筋炎など）、血液系（再生不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病など）、消化器系（クローン病、潰瘍性大腸炎など）、神経系（多発性硬化症、重症筋無力症など）、視覚系（ブドウ膜炎など）、血管系（ベーチェット病、ヴェゲナー肉芽腫症など）、表皮系（乾癬、天疱瘡、白斑など）、内分泌系（１型糖尿病、自己免疫甲状腺炎、バセドウ病、橋本病など）等であること、アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎、喘息、アナ

フィラキシー、アナフィラキシー様反応、食物アレルギー、鼻炎、中耳炎、薬物反応、昆虫刺傷反応、植物反応、ラテックスアレルギー、結膜炎、じんま疹等であること、炎症性疾患が炎症性腎疾患（糸球体腎炎、ネフローゼなど）、炎症性肺疾患（慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、間質性肺炎など）、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、回腸炎など）、炎症性肝疾患（自己免疫肝炎、ウイルス肝炎など）、炎症性心疾患（心筋炎、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症など）、炎症性皮膚疾患（接触性皮膚炎、湿疹など）、炎症性眼疾患（トラコーマ、眼内炎など）、炎症性中枢神経疾患（髄膜炎、脳脊髄炎、自己免疫脳炎など）、関節の炎症性疾患（例えば関節炎、骨関節炎など）、全身性炎症（敗血症、出血、過敏症、癌化学療法などに起因するショック症状など）等であることを特徴とする、請求項２４に記載の医薬組成物。

[請求項27] 癌の治療および／または予防が乳癌、肺癌、皮膚癌、白血病等であること、抗血小板または抗血栓活性が治療および／または予防に役立つ例が心筋梗塞、脳卒中、虚血性心疾患、血栓症等であること、Ｏｒａｉ１発現細胞活性化抑制が治療および／または予防に役立つ例がマスト細胞白血病、マスト細胞症、好塩基性白血病、子宮内膜症、ストールモルケン症、小管集合性ミオパチー、関節リウマチ、強直性脊椎炎、アトピー性皮膚炎等であることを特徴とする、請求項２４記載の医薬組成物。

[請求項28] 請求項１乃至２２のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片をコードするポリヌクレオチド。

[請求項29] 請求項２８に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項30] 請求項２８に記載のいずれか一つのポリヌクレオチドを含む形質転換宿主細胞。

[請求項31] 請求項２９に記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

[請求項32] 請求項３０または３２に記載の宿主細胞を培養し、培養産物から抗体を精製する工程を含む請求項１乃至２２のいずれか一つに記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片の生産方法。

[請求項33] 配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が８０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項34] ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたＪｕｒｋａｔ細胞が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が１０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、請求項３３に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項35] 配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒト末梢血単核球が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が１００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項36] ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒト末梢血単核球が放出するＩＬ－２量を５０％阻害する濃度が２０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、請求項３５記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項37] 配列番号２に記載のアミノ酸配列に特異的に結合し、ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒト末梢血単核球が放出するＩＦＮ－γ量を５０％阻害する濃度が８００ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、抗体または該抗体の抗原結合性断片。

[請求項38] ＰＭＡおよびＡ２３１８７処理されたヒト末梢血単核球が放出するＩＦＮ－γ量を５０％阻害する濃度が４０ｎｇ／ｍＬ以下であることを特徴とする、請求項３７に記載の抗体または該抗体の抗原結合性断片。