

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5992340号
(P5992340)

(45) 発行日 平成28年9月14日 (2016. 9. 14)

(24) 登録日 平成28年8月26日 (2016. 8. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 16/28 (2006. 01)	C 0 7 K 16/28
C 0 7 K 16/46 (2006. 01)	C 0 7 K 16/46
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 37/06 (2006. 01)	A 6 1 P 37/06

請求項の数 11 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-553431 (P2012-553431)	(73) 特許権者	511170892
(86) (22) 出願日	平成23年2月16日 (2011. 2. 16)		エフィミュヌ
(65) 公表番号	特表2013-519389 (P2013-519389A)		E F F I M U N E
(43) 公表日	平成25年5月30日 (2013. 5. 30)		フランス、エフ-44035 ナント セ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/050646		デックス、リュ ガストン ヴェイ 1、
(87) 国際公開番号	W02011/101791		ファクルト ド メディシン
(87) 国際公開日	平成23年8月25日 (2011. 8. 25)		Faculte de Medecine
審査請求日	平成26年1月10日 (2014. 1. 10)		, 1 rue Gaston Veil
(31) 優先権主張番号	10290389.5		, F-44035 Nantes Ce
(32) 優先日	平成22年7月13日 (2010. 7. 13)		dex, FRANCE
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	10290080.0		
(32) 優先日	平成22年2月18日 (2010. 2. 18)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CD28ヒト化抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 以下の配列により定義される第1の可変ドメイン(ここで、「重鎖可変ドメイン」とも定義される) :

【化 1】

VQLQQSGAELKKPGASVKVSKASGYTFTEYI IHWIKLRSGQGLEWIGWFYPGSNDIQYNAQFKGKATLT
ADKSSSTVYMELTGLTPEDSAVYFCARRDDFSGYDALPYWGQGLTVTVSA (配列番号 1)

(ここで、前記可変ドメインは、任意にN末端にQ残基をさらに含んでもよい) ;

10

- 以下の配列により定義される第2の可変ドメイン(ここで、「軽鎖可変ドメイン」とも定義される) :

【化 2】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKTNENIYSNLAWYQQKDGKSPQLLIYAATHLVEGVPSRFSGSGSGTQ
YSLTISSLQPEDFGNYQCQHFWGTPXTFGGGTKLEIKR (配列番号 2)

(ここで、X = C、A 又は N) :

からなるCD28結合部位を有することを特徴とする抗CD28抗体。

【請求項 2】

20

一価抗体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

- 配列番号 4 のアミノ酸21～251の配列を有する第 1 のタンパク質の鎖
 - 配列番号 6 のアミノ酸21～234の配列を有する第 2 のタンパク質の鎖
 のヘテロ二量体である請求項 2 に記載の一価抗体。

【請求項 4】

- N 末端から C 末端までが、
 * 請求項 1 に記載の抗体の重鎖可変ドメインである領域 A ;
 * ペプチドリンカー並びに IgG イムノグロブリンの CH2 及び CH3 ドメインからなる領域 B ;
 から本質的になる第 1 のタンパク質の鎖 :
 - N 末端から C 末端までが、
 * 請求項 1 に記載の抗体の軽鎖可変ドメインである領域 A' ;
 * 第 1 のポリペプチドの領域 B と同一の領域 B ;
 から本質的になる第 2 のタンパク質の鎖 :
 のヘテロ二量体である請求項 2 に記載の一価抗体。

10

【請求項 5】

ペプチドリンカーが、
 - EPKSCDKTHTCPPCP (配列番号 7) の配列を有するヒト IgG1 イムノグロブリンのヒンジ領域 ;
 - DKHTHTCPPCP (配列番号 8) の配列を有するヒト IgG1 イムノグロブリンのヒンジ領域 ;
 から選択される請求項 4 に記載の一価抗体。

20

【請求項 6】

CH2 及び CH3 ドメインが、IgG4 サブクラスのイムノグロブリンのものである請求項 4 又は 5 に記載の一価抗体。

【請求項 7】

- 第 1 のタンパク質の鎖のポリペプチド配列が配列番号10のアミノ酸21～368の配列であり、第 2 のタンパク質の鎖のポリペプチド配列が配列番号12のアミノ酸21～355の配列である一価抗体 ;
 - 第 1 のタンパク質の鎖のポリペプチド配列が配列番号14のアミノ酸21～373の配列であり、第 2 のタンパク質の鎖のポリペプチド配列が配列番号16のアミノ酸21～360の配列である一価抗体 ;
 から選択される請求項 6 に記載の一価抗体。

30

【請求項 8】

X がアラニン又はアスパラギン残基を表す配列番号 2 の可変ドメインを含む請求項 2 に記載の一価抗体。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む治療用組成物。

【請求項 11】

移植拒絶、慢性同種異系移植血管症、移植片対宿主病、T リンパ球媒介性自己免疫疾患、アレルギー現象及び慢性炎症性疾患からなる群より選択される病的状態を治療するための請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD28 に結合するヒト化抗体、その一価フラグメント及び特に T 細胞活性化の調節に関連するそれらの治療用途に関する。

【背景技術】

【0002】

50

T細胞の異常な活性化は、多くの自己免疫疾患の発生病理に、また生長するように移植された臓器に対して免疫反応を引き起こす移植拒絶現象にも関わっている。

Tリンパ球の活性化を調節する最も重要な系のひとつは、分子系B7/CD28/CTLA4である。この系は、例えば、移植拒絶の機序に本質的な役割を果たしている(Woodwardら、Transplantation, 66, 14-20, 1998)。APCによって担持される分子B7.1 (CD80)及びB7.2 (CD86)は、Tリンパ球の受容体CD28及び受容体CTLA4を活性化できる。CD28の活性化は、細胞を刺激する陽性シグナルをTリンパ球に送る;他方、CTLA4の活性化は、無反応(アネルギー)をもたらす陰性シグナルを送る(FALLARINOら、J. Exp. Med., 188, 205-210, 1998)。

【 0 0 0 3 】

休止Tリンパ球は、大量のCD28を発現し、CTLA4をほとんど発現しない。APCとTリンパ球とに最初の認識接触があるときには、細胞を活性化するCD28/B7相互作用が好まれる。CTLA4の膜発現増加によってB7に対するCTLA4の親和性がCD28の親和性の5~10倍高くなり、B7/CD28相互作用がB7/CTLA4相互作用に有利にシフトするのは、活性化の開始から僅か数時間後である。

【 0 0 0 4 】

調節Tリンパ球は、調節Tリンパ球の抑制活性をそれぞれ妨害するか又は許容する大量のCD28及びCTLA4を発現する。高レベルのB7を発現するAPCの存在下に、CD28/B7相互作用は、調節Tリンパ球の抑制活性を妨害する(Sansomら、Trends Immunol. 24, 314-319, 2003)。

【 0 0 0 5 】

CD28によりT細胞に与えられるアゴニストシグナルの選択的阻害は、CD28/B7相互作用の特異的なブロッキングを介してCTLA4/B7対からなるアンタゴニスト系をインタクトなまま残し、Tリンパ球の活性化を妨害すること及び調節Tリンパ球による免疫抑制を促進することを可能にするであろう。CD28/B7相互作用のこのような特異的なブロッキングは、CD28を指向する幾つかの抗体を用いて得ることができる。

【 0 0 0 6 】

これら抗体は、天然の二価の形態で用いられるときに、それらのCD28への結合がこの受容体の二量体化及び活性化を引き起こすので、一価の形態で(例えば、Fab又はscFvフラグメントとして)用いられることとなる。Fabフラグメントは各々が軽鎖及び最初の半分の重鎖を含む; scFvフラグメントは、可撓性リンカーを介して互いに連結されることによって(CLACKSONら、Nature, 352, 624-628, 1991)、単鎖タンパク質を形成している、親抗体の重鎖及び軽鎖の可変部分からなる。

【 0 0 0 7 】

このような抗体の一つは、ハイブリドーマ細胞系CNCM 1-2582により産生され、PCT出願WO 02/051871に開示される抗体CD28.3である。この抗体は、scFvフラグメントのような一価の形態で用いられるときに、受容体CD28を活性化することなく、受容体CD28をインビトロでブロックでき(PCT WO 02/051871; VANHOVEら、Blood, 102, 564-70, 2003)、インビボにおけるその効果もマウス及び霊長類における臓器移植モデルにおいて示されている(POIRIERら、World Transplant Congress, Sydney, Australia. August 16-21, 2008; POIRIERら、Sci Trans Med, 2:17, p17ra10, 2010)。

【 0 0 0 8 】

マウス源に由来する全てのモノクローナル抗体の欠点は、ヒト被験者に投与されるときにそれらの免疫原性である。それらは、特に繰り返しの投与が要求されるときに、より低い治療効果をもたらす抗マウス免疫応答を誘発する。

この欠点は、原理上、ヒト化抗体の使用により回避できる。ヒト化の目的は、相補性決定領域(CDR)の配列が由来するマウスモノクローナル抗体に類似する抗原結合特性を有し、ヒトにおいて免疫原性がかなり低い組換え抗体を得ることである。

CDRは、抗原に直接接触する抗体の可変ドメインの部分であり、抗原結合特異性を決定する; 可変ドメイン中のCDRの間に位置するフレームワーク領域(FR)は、抗原に直接接触しないが、可変ドメインの全体の構造を維持するための足場として働く。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 9 】

抗体のヒト化に関する幾つかのアプローチが報告されている。最も広く用いられているものは、マウス抗体のCDRを適当なヒトFRに移植することを含む「CDRグラフティング(CDR grafting)」に基づいている。しかしながら、多くの抗体において、幾つかのFR残基は、それらがCDRのコンホメーション、したがってCDRの抗原結合特性、特に結合親和性に影響を与えるので、抗原結合に重要である。結合親和性の喪失は、天然の二価抗体よりも抗原に対して低い親和性を一般的に示す一価の形態で用いられることを意図する抗体の場合において、特に不利益である。よって、ほとんどの場合において、十分な結合親和性を得るために、望ましくない免疫原性を同時に復活させるリスクを伴って、ヒトFR中にマウス抗体由来の1つ又は幾つかのフレームワーク残基を再び導入することがさらに必要となる。

10

【 0 0 1 0 】

抗体のヒト化に関する別のアプローチは、「脱免疫化(de-immunization)」と呼ばれ、「外来(foreign)」として認識され、したがってヒトにおいて潜在的に免疫原性のB細胞及びT細胞のエピトープを抗体のFR領域の範囲内で同定すること及び前記エピトープを適当なアミノ酸置換により除去することを含む。このアプローチは、しかしながら、抗原結合に重要なFR残基が欠失されるというリスクも伴っている。さらに、幾つかの免疫原性エピトープはCDR中に存在することがあり、それらを除去しようとすることは、抗原結合親和性だけでなく、抗体の抗原結合特異性をも破壊してしまうという非常に大きなリスクを伴う。

20

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 1 】

したがって、抗体のヒト化における大きな課題は、どのアミノ酸残基が抗原結合特性を保持するのに重要であるか決定することである。FR領域中の置換についてより適当な部位を予測するために様々な方法が提案されている。それらはヒト化の第1の工程において幾らかの助力となり得る一般的な原理を提供するが、最終的な結果は、抗体ごとに大きく変化する。よって、ある所定の抗体について、どの置換が望ましい結果を提供するか前もって知ることは非常に困難である。FR中の置換だけでなくCDR中の置換までもがヒトにおける免疫原性を満足に減少させるために必要となる場合には、最終的な結果は、完全に予測不可能となる。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

本発明者らは、低い免疫原性を有し、重鎖のCDR2中に非保存的なK→Q置換を含むアミノ酸置換を幾つか有しているが親マウスのCD28.3のCD28結合特性を保持するヒト化CD28.3(ここで、以下hCD28.3という)を製造することに成功している。一価の形態で用いられるとき、本発明のhCD28.3もまた、親マウスCD28.3のCD28結合特性を保持する。

【 発明の詳細な説明 】

【 0 0 1 3 】

本発明は、

a) - 以下の配列により定義される第1の可変ドメイン(ここで、「重鎖可変ドメイン」とも定義される)：

40

【 化 1 】

VQLQQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTEYIIHWIKLRSGQGLEWIGWFGSGNDIQYNAQFKGKATLT
ADKSSSTVYMELTGLTPEDSAVYFCARRDDFSGYDALPYWGQGLTVTVSA (配列番号1)

(ここで、前記可変ドメインは、任意にN末端にQ残基をさらに含んでもよい)；

- 以下の配列により定義される第2の可変ドメイン(ここで、「軽鎖可変ドメイン」とも定義される)：

【化 2】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKTNENIYSNLAWYQQKDGKSPQLLIYAATHLVEGVPSRFSGSGSGTQ
YSLTISSLQPEDFGNYCQHFHWGTPXTFGGGTKLEIKR (配列番号 2)

(ここで、X = C、A 又は N) :

からなるCD28結合部位を有する抗体

b) - 配列番号 1 の可変ドメインのCDRを有する第 1 の可変ドメイン ;

- 配列番号 2 の可変ドメインのCDRを有する第 2 の可変ドメイン ;

からなるCD28結合部位を有する抗体

から選択されることを特徴とする抗CD28抗体を提供する。

10

【 0 0 1 4 】

ここで、用語「抗CD28抗体」とは、ヒトCD28に特異的に結合可能な(軽鎖及び重鎖の可変ドメインからなる)少なくとも 1 つの抗原結合部位を有する任意の抗原結合タンパク質をいう。抗CD28抗体は、2 つのCD28結合部位を有する二価の形態にある抗体(例えば、天然のイムノグロブリン分子又はF(ab)'₂フラグメント)、並びに 1 つのCD28結合部位を有する一価の形態にある抗体(例えば、Fab、Fab'、Fv及びscFvフラグメント)を包含する。多くの場合、一価の形態にある抗体が好ましい。

【 0 0 1 5 】

抗CD28抗体は、特に 1 又はそれより多い非相同ポリペプチドと結合したCD28結合部位を含む組換え抗体を含む。

20

例として、本発明の抗体は、配列番号 1 の可変ドメインの C 末端に融合したヒトイムノグロブリンの定常ドメインCH1、及び配列番号 2 の可変ドメインの C 末端に融合したヒトイムノグロブリンの定常ドメインCLを含む組換えFab又はFab'フラグメントであり得る。このような組換えFabフラグメントの例は、配列番号 4 のアミノ酸21~251の配列を有する重鎖及び配列番号 6 のアミノ酸21~234の配列を有する軽鎖を有するFabフラグメントである。

【 0 0 1 6 】

また、本発明のhCD28.3抗体は、上記に定義される配列番号 1 及び配列番号 2 の可変ドメインの他に、1 又はそれより多い以下の構成要素を含み得る :

- ヒト定常領域(Fc)。この定常領域は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含む任意のクラスのイムノグロブリン、並びにIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む任意のアイソタイプからの定常ドメインから選択され得る。好ましい定常領域は、IgGの定常ドメインから選択され、特にIgG4である。

30

- 例えばPCT WO 02/051871に開示されるような、一価の形態でインビボ投与されるときに血漿中での半減期を延長することを可能にするタンパク質 ; PCT/IB/2010/000196に開示されるように、ある好ましい実施態様においては、前記タンパク質は、IgG分子のCH2-CH3ドメインである ; 前記実施態様によれば、本発明のhCD28.3一価抗体は :

- N末端からC末端までが、

* 配列番号 1 の配列を有する領域 A ;

* ペプチドリンカー並びにIgGイムノグロブリンのCH2及びCH3ドメインからなる領域 B ;

40

から本質的になる第 1 のタンパク質の鎖 :

- N末端からC末端までが、

* 配列番号 2 の配列を有する領域 A' ;

* 第 1 のポリペプチドの領域 B と同一の領域 B ;

から本質的になる第 2 のタンパク質の鎖 :

のヘテロ二量体である。

【 0 0 1 7 】

好ましくは、ペプチドリンカーは、配列EPKSCDKTHTCPPCP (配列番号 7)を有するヒトIgG1イムノグロブリンのヒンジ領域であり、CH2及びCH3ドメインは、IgG4サブクラスのイムノグロブリンのヒンジ領域である。当業者は、配列DKTHTCPPCP (配列番号 8)を有する、

50

ヒンジ領域の短縮型を用いることもできる。

【 0 0 1 8 】

好ましい実施態様によれば、第1のタンパク質の鎖のポリペプチド配列は、配列番号10のアミノ酸21～368の配列であり、第2のタンパク質の鎖のポリペプチド配列は、配列番号12のアミノ酸21～355の配列である。別の好ましい実施態様によれば、第1のタンパク質の鎖のポリペプチド配列は、配列番号14のアミノ酸21～373の配列であり、第2のタンパク質の鎖のポリペプチド配列は、配列番号16のアミノ酸21～360の配列である。

【 0 0 1 9 】

任意に、本発明のhCD28.3抗体は、1又はそれより多い以下の構成要素をさらに含む得る：

- 薬理活性を有するタンパク質(例えばトキシン)；
- 1又はそれより多いタグポリペプチド。

【 0 0 2 0 】

或いは、それらの血漿中での半減期を延長させるために、特にFabフラグメントの形態であるときに、本発明の抗体は、水溶性ポリマー、例えばポリエチレングリコールと結合(PEG化)し得る。PEG化は、治療用ポリペプチドの薬物動態特性を高めるための古典的手法であり、当該技術において公知の技術によって達成され得る。

【 0 0 2 1 】

この点に関して、本発明者らは、天然のCD28.3の可変ドメインの96位の元のシステイン残基のアラニン又はアスパラギン残基による置換え(配列番号2(ここで、X = A又はN)の可変ドメインを含む軽鎖を有する抗体をもたらす)は、システイン96が抗体の軽鎖のCDR3に含まれるにも拘らず、その結合活性を実質的に改変することなく、(反応性のシステイン残基を標的化する)マレイミドで活性化されたポリエチレングリコールを用いる抗体のPEG化におけるより良好な効率を可能にする。可変ドメインの96位の元のシステイン残基の置換えの利点は、重鎖のC末端システイン残基上へのポリエチレングリコールの特異的な分枝に主にある。天然CD28.3の可変ドメインの96位の元のシステイン残基の置換えなしでは、マレイミドで活性化されたポリエチレングリコールは、当該システイン残基に結合し、Fab分子の結合活性を損傷し得る。

また、本発明者らは、重鎖のC末端システインの後のジアラニン伸長の付加もまたより良好なPEG化効率をもたらすことを見出した。

【 0 0 2 2 】

また、本発明は、

a)配列番号1のCDRを有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特に配列番号1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

b)配列番号2のCDRを有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特に配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

c)上記に定義される本発明のhCD28.3抗体をコードするポリヌクレオチド；
から選択されるポリヌクレオチドも包含する。

【 0 0 2 3 】

本発明のポリヌクレオチドは、総じて、付加的な配列も含む：例えば、それらは、有利には、タンパク質の鎖の分泌を可能にするリーダー配列又はシグナルペプチドをコードする配列を含み得る。

【 0 0 2 4 】

また、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを、選択される宿主細胞中で活性である転写及び翻訳制御因子と共に含む組換えベクター、特に発現ベクターも包含する。本発明による発現ベクターを構築するために用いられ得るベクターは、それ自体公知であり、特に用いられることを意図する宿主細胞に応じて選択される。

【 0 0 2 5 】

また、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを用いてトランスフォームされた宿主細胞も包含する。好ましくは、宿主細胞は、本発明のhCD28.3抗体の重鎖をコードする配列を

10

20

30

40

50

含むポリヌクレオチド及び本発明のhCD28.3抗体の軽鎖をコードする配列を含むポリヌクレオチドを用いてトランスフォームされており、前記抗体を発現する。前記ポリヌクレオチドは、同一の発現ベクター中に又は2つの別個の発現ベクター中に挿入され得る。

【0026】

本発明に関連して用いられ得る宿主細胞は、原核又は真核細胞であり得る。用いられ得る真核細胞のうち、特に植物細胞、酵母からの細胞、例えばサッカロミセス (Saccharomyces)、昆虫細胞、例えばドロソフィラ (Drosophila) 又はスポドプテラ (Spodoptera) 細胞、及び哺乳動物細胞、例えばHeLa、CHO、3T3、C127、BHK、COS等の細胞が挙げられる。

【0027】

本発明の発現ベクターの構築及び宿主細胞のトランスフォーメーションは、分子生物学の慣用技術によって行われ得る。

【0028】

さらに、本発明の別の対象は、本発明のhCD28.3抗体の製造方法である。前記方法は、本発明のhCD28.3抗体の重鎖をコードする配列を含むポリヌクレオチド及び本発明のhCD28.3抗体の軽鎖をコードする配列を含むポリヌクレオチドを用いてトランスフォームされた宿主細胞を培養し、培養物から前記抗体を回収することを含む。

【0029】

抗体が宿主細胞により分泌されるのであれば、該抗体は、培養培地から直接回収され得る；そうでなければ、細胞溶解が事前に行われる。抗体は、したがって、培養培地から又は細胞溶解物から、それ自体当業者に公知の慣用手順、例えば分別沈殿 (fractionated precipitation)、特に硫酸アンモニウムを用いる沈殿、電気泳動、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィ等によって精製され得る。

【0030】

本発明のhCD28.3抗体は、医薬品を得るために用いられ得る。これら医薬品もまた、本発明の対象の一部である。

また、本発明は、本発明のhCD28.3抗体を、医薬的に許容され得る賦形剤と共に含む治療用組成物も含む。

【0031】

好ましくは、組成物は、0.5 ~ 20 mg/Kg、有利には5 ~ 10 mg/Kgの用量の本発明のhCD28.3抗体の投与を可能にするために製剤化された非経口投与用組成物である。組成物の注入経路は、好ましくは皮下又は静脈内であり得る。

【0032】

例えば、本発明のhCD28.3抗体は、受容体CD28に関連するT細胞活性化現象を選択的にブロックする免疫抑制性の医薬品を得るために用いることができる。CD28の選択的ブロッキングにより作用するこのような免疫抑制性の医薬品は、特に移植拒絶、移植片対宿主病、Tリンパ球媒介性自己免疫疾患、例えばI型糖尿病、リウマチ性関節炎又は多発性硬化症、アレルギー現象に関与するIV型過敏を含む全てのTリンパ球依存性の病的状態に、並びに特に病原性物質への感染症（特にらい病、結核、リーシュマニア症、リステリア症等）の後の慢性炎症性疾患に用途がある。

【0033】

本発明は、本発明によるhCD28.3抗体の製造及び特性の非限定的な実施例について言及する以下に続く更なる記載からより明確に理解されるであろう。

本発明の発現ベクターの構築及び宿主細胞のトランスフォーメーションは、分子生物学の標準的技術により行なうことができる。

本発明のhCD28.3抗体は、該抗体をコードする核酸配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞を、その発現に適した条件下で培養し、宿主細胞培養物から前記抗体を回収することにより得ることができる。

【0034】

本発明は、本発明のhCD28.3抗体の特性を説明する実施例について言及する以下の更な

10

20

30

40

50

る記載によって更に説明される。しかしながら、これら実施例は本発明を説明する目的のみ与えられるものであり、本発明の如何なる限定も構成しないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 5 】

【図 1】Signal-VH-hCH1構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列。太字：リーダー配列；下線付：親CD28.3抗体のCDRの位置。イタリック体：ヒトCH1領域；ハイライト及び二重下線付：CD28.3抗体のVH領域中にされた置換。

【図 2】Signal-VL-hC κ 構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列。太字：リーダー配列；下線付：親CD28.3抗体のCDRの位置。イタリック体：ヒトc κ 領域；ハイライト及び二重下線付：CD28.3抗体のVL領域中にされた置換。

10

【図 3】A) 結合ELISA(Binding ELISA)における漸増濃度のFR104、hCD28.3 Fab又はCD28.3 Fabの405 nmでの光学密度；B) 比較値AC50の決定を可能にする回帰曲線の算出。

【図 4】hVHCD28.3-短縮型ヒンジ γ 1-h γ 4CH2CH3構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列。太字：リーダー配列。下線付：CDR。二重下線付：ヒンジ領域。点線下線付：ヒトIgG4のCH2-CH3ドメイン。

【図 5】hVLCD28.3-短縮型ヒンジ γ 1-h γ 4CH2CH3構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列。太字：リーダー配列。下線付：CDR。二重下線付：ヒンジ領域。点線下線付：ヒトIgG4のCH2-CH3ドメイン。

【図 6】hVHCD28.3-完全ヒンジ γ 1-h γ 4CH2CH3構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列。太字：リーダー配列。下線付：CDR。二重下線付：ヒンジ領域。点線下線付：ヒトIgG1のCH2-CH3ドメイン。

20

【図 7】hVLCD28.3-完全ヒンジ γ 1-h γ 4CH2CH3構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列。太字：リーダー配列。下線付：CDR。二重下線付：ヒンジ領域。点線下線付：ヒトIgG1のCH2-CH3ドメイン。

【図 8】hVH/VL CD28.3一価抗体の抗CD28結合特性。COS細胞を、(各々が) 2 μ gのpSignal-hVH-short hinge γ 1-h γ 4CH2-CH3及びpSignal-hVL-short hinge γ 1-h γ 4CH2-CH3を用いてコトランスフェクトしたか、又は(各々が) 2 μ gのpSignal-hVH-full hinge γ 1-h γ 4CH2-CH3及びpSignal-hVL-full hinge γ 1-h γ 4CH2-CH3を用いてコトランスフェクトした。6日後、上清を回収し、第1のサンドイッチELISAを用いて一価抗体を定量した。また、固定化されたCD28標的分子に対する結合ELISAを用いて上清を評価し、結合した一価の抗CD28抗体をペルオキシダーゼで標識した抗ヒトFc抗体を用いて明らかにした。A：示された分子を用いて、それらの濃度に応じて得られた光学密度。B：回帰曲線及びED50(50%有効量)(このアッセイにおいて50%の結合活性に達するのに必要とされる濃度)の算出式を有する表。

30

【図 9】hVH/VL CD28.3一価抗体は、活性化されたT細胞によるIL-2分泌を阻害する。Jurkat T細胞を、SEEスーパー抗原及びRaji抗原提示細胞で48時間、示された濃度の精製されたhVH/VL-短縮型ヒンジ γ 1-h γ 4CH2-CH3一価抗体の存在下で刺激した。上清を回収し、IL-2をELISAで測定した。

【図 10】ヒト化CD28.3抗体からのC96-FabのPEG化後の非還元条件下でのSPセファロースHPクロマトグラフィ(左)及びSDS-PAGE(右)。レーン1：マーカー；レーン2：ロード；レーン3：ピーク1；レーン4：ピーク2；レーン5：ピーク3。

40

【図 11】C96変異を有するか又は有しない組換えhCD28.3 FabのCD28に対する結合特性。グラフは、Fab濃度(X軸)に対する結合特性(Y軸)を示す。

【図 12】ヒト化CD28.3抗体からのC96A-FabのPEG化後の非還元条件下でのSPセファロースHPクロマトグラフィ(左)及びSDS-PAGE(右)。レーン1：MWマーカー；レーン2：PEG化されたタンパク質のプレクロマトグラフィ；レーン3：開始物質の41%に相当するモノPEG化されたFabを含むピーク1。

【図 13】重鎖中にCAA C末端配列を有するヒト化CD28.3抗体からのC96A-FabのPEG化後の非還元条件下でのSPセファロースHPクロマトグラフィ(左)及びSDS-PAGE(右)。レーン1

50

：MWマーカー；レーン 2：PEG化されたタンパク質のブレイクマトグラフィ；レーン 3：ピーク。

【実施例】

【0036】

実施例 1：hCD28.3 一価抗体 (Fab フラグメント) の構築及び真核発現 (eukaryotic expression)

重鎖：

ヒト CH1 領域をコードする配列 (NCBI アクセッション番号 AAF03881) 及び天然のマウス CD28.3 抗体の重鎖のリーダーペプチドをコードする配列と融合している、hCD28.3 の VH 領域をコードする配列 (配列番号 1) を化学的に合成し、増幅のために、クローニングベクター pGA18 (Geneart) に導入した。次いで、配列を KpnI/BamHI 制限酵素を用いて消化により切り出し、プラスミド pcDNA3.1-hygro (Invitrogen) の KpnI/BamHI サイトにサブクローニングした。陽性クローンを増幅し、トランスフェクション工程のために、Midiprep-endotoxin free (Macherey-Nagel) により精製した。

【0037】

得られたプラスミドを pSignal-VH-hCH1 と呼ぶ。それは、CD28.3 の重鎖のリーダーペプチドをコードする配列とヒト CH1 領域をコードする配列 (NCBI アクセッション番号 AAF03881) との間に hCD28.3 の VH 領域をコードする配列を含む構築物を含む。この構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図 1 に示す。また、それらは、同封される配列表において、配列番号 3 及び配列番号 4 と表される。

【0038】

軽鎖：

ヒト Cκ 領域をコードする配列 (NCBI アクセッション番号 BAC01725) 及び天然のマウス CD28.3 抗体の軽鎖のリーダーペプチドをコードする配列と融合している、hCD28.3 の VL 領域をコードする配列 (配列番号 2) を化学的に合成し、増幅のために、クローニングベクター pGA18 (Geneart) に導入した。次いで、配列を KpnI/BamHI 制限酵素を用いて消化により切り出し、プラスミド pcDNA3.1-hygro (Invitrogen) の KpnI/BamHI サイトにサブクローニングした。陽性クローンを増幅し、トランスフェクション工程のために、Midiprep-endotoxin free (Macherey-Nagel) により精製した。

【0039】

得られたプラスミドを pSignal-VL-hCκ と呼ぶ。それは、CD28.3 の軽鎖のシグナルペプチドをコードする配列とヒト Cκ 領域をコードする配列 (NCBI アクセッション番号 BAC01725) との間に hCD28.3 の VL 領域をコードする配列を含む構築物を含む。この構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図 2 に示す。また、それらは、同封される配列表において、配列番号 5 及び配列番号 6 と表される。

【0040】

真核発現

COS 細胞を、(各々が) 2 µg の pSignal-VL-hCH1 及び pSignal-VH-hCH1 で、Fugene リポフェクションキット (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて、製造業者の説明書に従ってコトランスフェクトした。培養物を 3 日間 37 °C で維持し、3 分の 1 に分け、更に 3 日間の培養を再開し、その後細胞上清を回収した。

hCD28.3 一価抗体の活性は、以下の実施例 2 に記載されるようにして、ELISA により直接上清中において評価する。

【0041】

実施例 2：ELISA による hCD28.3 Fab フラグメント結合活性の検出

hCD28.3 Fab フラグメントの結合特性を、Cos 細胞を (ヒト化されていない) CD28.3 Fab をコードするプラスミドでトランスフェクションした後に得られた結合特性と、2 つの ELISA アッセイを用いて比較した。

【0042】

* 第 1 に (サンドイッチ ELISA)、トランスフェクトされた COS 細胞の培地上清中の hCD28.3

10

20

30

40

50

及びCD28.3 Fabフラグメントの濃度を、サンドイッチELISAを用いて測定した。簡潔には、上清中に含まれる抗CD28 Fabをまず(天然のCD28.3の重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む単鎖Fvを用いてウサギを免疫した後に得られ、CD28.3 Fab-セファロースへの免疫吸着により精製された)CD28.3の重鎖及び軽鎖可変ドメインに特異的なウサギポリクローナル抗体により捕捉する。捕捉したタンパク質を、次いで、ヒトIgGのκ鎖を指向するマウスモノクローナル抗体、続いてペルオキシダーゼで標識したヤギポリクローナル抗マウス抗体を用いて明らかにする。結合した抗体は、TMB基質を用いて比色法により明らかにし、405 nmで読み出した。

【0043】

種々の上清希釈度に対応するODを、次いで、トランスフォームされたCHO細胞の培地上清からクロマトグラフィの標準的技術を用いて精製され、BCA(ピシンコニン酸)アッセイで定量した既知量のCD28.3 Fab(FR104と呼ばれる)を用いて得られた標準曲線と比較する。FR104は、天然の(ヒト化されていない)、CD28.3抗体のVH及びVL領域を含む。したがって、細胞上清中に存在するFabタンパク質の量を評価することができる。

【0044】

*第2に(結合ELISA)、CD28.3 Fabと比較したhCD28.3 Fabフラグメントの結合活性を分析するために、カーボネートバッファー 0.05M pH 9.2中の2 µg/mlのヒトCD28/Fcキメラ(R&D Systems, Abingdon, United Kingdom)を用いて、マイクロタイタープレート(Nunc Immunoplates)のウェル(50 µL/ウェル)を一晩4 でコーティングした。これらの固定化されたCD28標的分子は、抗CD28活性を有する免疫反応性分子だけに結合する。

次いで、ウェルを200 µLのPBS-0.05% Tweenを用いて連続的に3回洗浄し、100 µLのPBS Tween 0.1% BSA 1%を用いて2時間37 で飽和させた。

【0045】

次いで、200 µLのPBS-0.05% Tweenを用いて3回洗浄後、既知濃度のCD28.3又はhCD28.3 Fabフラグメントを含む上清を、PBS-0.1% Tween中に種々の希釈度に加え(50 µL/ウェル)、2時間37 でインキュベートした。200 µLのPBS-0.05% Tweenを用いて3回洗浄後、ヒトIgGのκ鎖を指向するマウスモノクローナル抗体(希釈度 1/10000)を加え(1時間、37)、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体(希釈度 1/2000)を加え、TMB基質を用いて比色法により明らかにし、405 nmで読み出した。

【0046】

次いで、結果を、結合ELISAを用いて測定した吸光(Y軸)として、サンドイッチELISAを用いて測定したFab濃度(X軸)に対してプロットする。結合アッセイにおいて最大の光学密度(OD)の50%に達するために必要とされる抗CD28 Fabの濃度として、線形領域における曲線の傾きを算出した後、AC50(抗体濃度50)を決定する。

【0047】

結果を図3及び表Iに示す。

図3Aは、結合ELISAにおける漸増濃度のFR104、hCD28.3 Fab又はCD28.3 Fabの405 nmでの光学密度を示す。

図3Bは、比較値AC50の決定を可能にする回帰曲線の算出結果を示す。

下記の表Iに、標準FR104、並びにFabフラグメントVH-野生型+VL-野生型及びFab hCD28.3についてのOD50、等式及びAC50を纏める。

【0048】

【表1】

表 I

	OD50	等式	AC50
標準 FR104	1,792	$y = 1,1424\ln(x) - 3,6351$	115
CD28.3 Fab	1,82	$y = 0,9776\ln(x) - 3,2483$	162
hCD28.3 Fab	1,804	$y = 1,0217\ln(x) - 3,2859$	151

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

これらの結果は、FabフラグメントVH-野生型 + VL-野生型(CD28.3 Fab)及びhCD28.3 Fabについて同様の濃度でCD28に対する結合活性の50%に達し得ることを示す。標準についての濃度は、おそらくそれがアッセイ前に精製されるためにわずかに低い。よって、hCD28.3は、CD28の野生型VH及びVL配列のCD28結合特性を保持する。

【 0 0 5 0 】

実施例 3 : 短縮型 γ 1 ヒンジ及び γ 4 CH2-CH3ドメインを有するhCD28.3一価抗体(Fv-Fcフラグメント)の構築及び真核発現

重鎖 :

ヒトIgG1のヒンジ領域の一部をコードする配列(配列番号 8)、ヒトIgG4のCH2-CH3ドメイン(NCBIアクセッション番号 BC025985の配列のヌクレオチド787~1440)とC末端側で融合し、天然のマウスCD28.3抗体の重鎖のリーダーペプチドをコードする配列をN末端の位置に有する、hCD28.3のVH領域をコードする配列(配列番号 1)を化学的に合成し、増幅のために、クローニングベクターpMA (Geneart)に導入した。次いで、配列をNheI/EcoRI制限酵素を用いて消化により切り出し、プラスミドpCIneo (Promega)のNheI/EcoRIサイトにサブクローニングした。E. コリ細胞のトランスフォーメーション後、陽性クローンを増幅し、抽出したプラスミドをMidiprep-endotoxin freeカラム(Macherey-Nagel)により精製した。

10

【 0 0 5 1 】

得られたプラスミドをpSignal-hVH-shorthinge γ 1-h γ 4CH2-CH3と呼ぶ。それは、CD28.3の重鎖のシグナルペプチドをコードする配列とヒト γ 1 ヒンジ領域の一部をコードする配列及びヒト γ 4CH2-CH3ドメインの配列との間にhCD28.3のVH領域をコードする配列を含む構築物を含む。この構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図 4 に示す。また、それらは、同封される配列表において、配列番号 9 及び配列番号10と表される。

20

【 0 0 5 2 】

軽鎖 :

ヒトIgG1のヒンジ領域の一部をコードする配列(配列番号 8)、ヒトIgG4のCH2-CH3ドメイン(NCBIアクセッション番号 BC025985の配列のヌクレオチド787~1440)と融合し、天然のマウスCD28.3抗体の重鎖のリーダーペプチドをコードする配列をN末端の位置に有する、hCD28.3のVL領域をコードする配列(配列番号 2)を化学的に合成し、増幅のために、クローニングベクターpMA (Geneart)に導入した。次いで、配列をNheI/EcoRI制限酵素を用いて消化により切り出し、プラスミドpCIneo (Promega)のNheI/EcoRIサイトにサブクローニングした。E. コリ細胞のトランスフォーメーション後、陽性クローンを増幅し、抽出したプラスミドをMidiprep-endotoxin freeカラム(Macherey-Nagel)により精製した。

30

【 0 0 5 3 】

得られたプラスミドをpSignal-hVL-shorthinge γ 1-h γ 4CH2-CH3と呼ぶ。それは、CD28.3の軽鎖のシグナルペプチドをコードする配列とヒト γ 1領域の一部をコードする配列及びヒト γ 4 CH2-CH3ドメインの配列との間にhCD28.3のVL領域をコードする配列を含む構築物を含む。この構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図 5 に示す。また、それらは、同封される配列表において、配列番号11及び配列番号12と表される。

40

【 0 0 5 4 】

真核発現

COS細胞を、(各々が) 1 μ gのpSignal-hVL-shorthinge γ 1-h γ 4CH2-CH3及びpSignal-hVH-shorthinge γ 1-h γ 4CH2-CH3で、Lipofectamineリポフェクションキット(Invitrogen)を用いて、製造業者の説明書に従ってコトランスフェクトした。培養物を3日間37℃で維持し、その後細胞上清を回収した。一価抗体の活性は、以下の実施例 5 に記載されるようにして、ELISAにより直接上清中において評価した。

【 0 0 5 5 】

実施例 4 : 完全長 γ 1 ヒンジ及び γ 4 CH2-CH3ドメインを有するhCD28.3一価抗体(Fv-Fcフラグメント)の構築及び真核発現

50

重鎖：

ヒトIgG1の完全長ヒンジ領域をコードする配列(配列番号7)、ヒトIgG4のCH2-CH3ドメイン(NCBIアクセッション番号 BC025985の配列のヌクレオチド787~1440)とC末端側で融合し、天然のマウスCD28.3抗体の重鎖のリーダーペプチドをコードする配列をN末端の位置に有する、hCD28.3のVH領域をコードする配列(配列番号1)を化学的に合成し、増幅のために、クローニングベクターpMA (Geneart)に導入した。次いで、配列をNheI/EcoRI制限酵素を用いて消化により切り出し、プラスミドpCIneo (Promega)のNheI/EcoRIサイトにサブクローニングした。E.コリ細胞のトランスフォーメーション後、陽性クローンを増幅し、抽出したプラスミドをMidiprep-endotoxin freeカラム(Macherey-Nagel)により精製した。

10

【0056】

得られたプラスミドをpSignal-hVH-fullhinge γ1-h γ4CH2-CH3と呼ぶ。それは、CD28.3の重鎖のシグナルペプチドをコードする配列とヒトγ1ヒンジ領域及びヒトγ4 CH2-CH3ドメインをコードする配列との間にhCD28.3のVH領域をコードする配列を含む構築物を含む。この構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図6に示す。また、それらは、同封される配列表において、配列番号13及び配列番号14と表される。

【0057】**軽鎖：**

ヒトIgG1の完全長ヒンジ領域をコードする配列(配列番号7)、ヒトIgG4のCH2-CH3ドメイン(NCBIアクセッション番号 BC025985の配列のヌクレオチド787~1440)と融合し、天然のマウスCD28.3抗体の重鎖のリーダーペプチドをコードする配列をN末端の位置に有する、hCD28.3のVL領域をコードする配列(配列番号2)を化学的に合成し、増幅のために、クローニングベクターpMA (Geneart)に導入した。次いで、配列をNheI/EcoRI制限酵素を用いて消化により切り出し、プラスミドpCIneo (Promega)のNheI/EcoRIサイトにサブクローニングした。E.コリ細胞のトランスフォーメーション後、陽性クローンを増幅し、抽出したプラスミドをMidiprep-endotoxin freeカラム(Macherey-Nagel)により精製した。

20

【0058】

得られたプラスミドをpSignal-hVL-fullhinge γ1-h γ4CH2-CH3と呼ぶ。それは、CD28.3の軽鎖のシグナルペプチドをコードする配列とヒトγ1の完全長ヒンジ領域をコードする配列及びヒトγ4-CH2-CH3ドメインの配列との間にhCD28.3のVL領域をコードする配列を含む構築物を含む。この構築物のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図7に示す。また、それらは、同封される配列表において、配列番号15及び配列番号16と表される。

30

【0059】**真核発現**

COS細胞を、(各々が)1 μgのpSignal-hVH-fullhinge γ1-h γ4CH2-CH3及びpSignal-hVL-fullhinge γ1-h γ4CH2-CH3で、Lipofectamineリポフェクションキット(Invitrogen)を用いて、製造業者の説明書に従ってコトランスフェクトした。培養物を3日間37℃で維持し、その後細胞上清を回収した。

hCD28.3一価抗体の活性は、以下の実施例5に記載されるようにして、ELISAにより直接上清中において評価した。

40

【0060】

実施例5：ELISAによるhCD28.3-完全長γ1ヒンジ-γ4CH2-CH3ドメイン及びhCD28.3-短縮型γ1ヒンジ-γ4CH2-CH3ドメイン一価抗体の結合活性の評価

トランスフェクトされたCOS細胞により産生されたhCD28.3一価抗体であるhCD28.3-完全γ1ヒンジ-γ4CH2-CH3ドメイン及びhCD28.3-短縮型γ1ヒンジ-γ4CH2-CH3ドメインの結合特性を、2つのELISAアッセイを用いて分析した。

【0061】

*第1に(サンドイッチELISA)、トランスフェクトされたCOS細胞の培地上清中のhCD28.3一価抗体の濃度を、サンドイッチELISAを用いて測定した。簡潔には、上清中に含まれる一価抗体をまずヒトIgGを指向するヤギポリクローナル抗体により捕捉する。捕捉したタ

50

ンパク質を、次いでビオチン化されたFc特異的ヤギポリクローナル抗ヒトIgG抗体、続いてペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを用いて明らかにする。結合した抗体は、TMB基質を用いて比色法により明らかにし、405 nmで読み出した。

【0062】

種々の上清希釈度に対応するODを、次いで、トランスフォームされたCHO細胞の培地上清からクロマトグラフィの標準的技術を用いて精製され、BCA(ピシンコニン酸)アッセイで定量した既知量のhCD28.3一価抗体を用いて得られた標準曲線と比較する。

【0063】

*第2に(結合ELISA)、hCD28.3一価抗体の結合活性を分析するために、カーボネートバッファー 0.05M pH 9.2中の2 µg/mlのヒトCD28/Fcキメラ(R&D Systems, Abingdon, United Kingdom)を用いて、マイクロタイタープレート(Nunc Immunoplates)のウェル(50 µL/ウェル)を一晩4℃でコーティングした。これらの固定化されたCD28標的分子は、抗CD28活性を有する免疫反応性分子だけに結合する。

次いで、ウェルを200 µLのPBS-0.05% Tweenを用いて連続的に3回洗浄し、100 µLのPBS Tween 0.1% BSA 1%を用いて2時間37℃で飽和させた。

【0064】

次いで、200 µLのPBS-0.05% Tweenを用いて3回洗浄後、既知濃度の分析される一価抗体を含む上清を、PBS-0.1% Tween中に種々の希釈度で加え(50 µL/ウェル)、2時間37℃

でインキュベートした。200 µLのPBS-0.05% Tweenを用いて3回洗浄後、(天然のCD28.3の重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む単鎖Fvを用いるウサギの免疫後に得られ、CD28.3 Fab-セファロースに対する免疫吸着により精製された)CD28.3の重鎖及び軽鎖可変ドメインに特異的なウサギポリクローナル抗血清を加えた(希釈度 1/500; 1時間、37℃)。これに続いて、ペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギ抗体(希釈度 1/2000)、続いてTMB基質を用いる比色法により明らかにし、405 nmで読み出した。

【0065】

次いで、結果を、結合ELISAを用いて測定した吸収(Y軸)として、サンドイッチELISAを用いて測定した一価抗体濃度(X軸)に対してプロットする。結合アッセイにおいて最大の光学密度(OD)の50%に達するために必要とされる一価抗体の濃度として、線形領域における曲線の傾きを算出した後、AC50(抗体濃度50)を決定する。

【0066】

図8は、結合ELISAにおいて、hCD28.3-完全IgG1ヒンジ-IgG4CH2-CH3ドメイン一価抗体の結合活性をhCD28.3-短縮型IgG1ヒンジ-IgG4CH2-CH3ドメイン一価抗体の結合活性と比較している(図8A)。

図8Bに、一価抗体についての等式、回帰係数(regression factor)及びAC50を纏める。

【0067】

これらの結果は、CD28に対する結合活性の50%がhCD28.3-完全γ1ヒンジ-γ4CH2-CH3ドメイン又はhCD28.3-短縮型γ1ヒンジ-γ4CH2-CH3ドメインの一価抗体に類似する濃度に達し得ることを示す。

【0068】

実施例6：hCD28.3一価抗体はT細胞活性化を妨害する

hCD28.3一価抗体がCD28依存的T細胞活性化をブロックすることを確認するために、Raji B細胞系により提示されるSEEスーパー抗原でヒトT細胞(Jurkat細胞)を刺激した。エンドトキシンであるSEEは、クラスII陽性B細胞リンパ芽球様Raji系に提示されるとき、Vβ8を発現するT細胞Jurkat系を活性化してIL-2を分泌する(Hermanら、1990, J. Exp. Med. 172:709)。Jurkat細胞が高レベルのCD28を発現し、Raji細胞がCD80/86を発現するので、この反応は部分的にCD28依存的である。このアッセイにおいて、ELISA (ELISA Max™ Set Deluxe Human IL-2 Kit; Biolegend #431805)により、48時間後、漸増濃度のhVH/VL CD28.3-短縮型γ1ヒンジ-γ4CH2-CH3ドメインの存在下にインターロイキン-2の合成を測定した。

10

20

30

40

50

結果を図9に示す。それらは、hCD28.3一価抗体が用量依存的様式でT細胞によるIL-2合成を減少させることを明らかにする。

【0069】

実施例7：PEG化されたhCD28.3一価抗体の製造

実施例1に記載されるようにして製造されたhCD28.3 Fabフラグメントを、還元及びPEG化の標準的な条件を用いて、マレイミドで活性化された40 KDaのPEGでPEG化した。

【0070】

簡潔には、Fab抗体フラグメントを1 mg/mLに濃縮し、次いで20 mMリン酸ナトリウム、2 mM EDTA、pH 7.0に対してダイアフィルトレーションした。次いで、Fab'抗体フラグメントを、塩化システアミンをモル当量比 = 30 : 1 で室温にて加えることにより還元した。5時間後、溶液を脱塩カラムにアプライした。ポリエチレングリコール(PEG) (Sunbright GL2 400MA, NOF Corporation)を20 mM ホスフェート、2 mM EDTA, pH 7.0中に溶解し、9 % (w/w)の溶液を得た。脱塩したFab溶液及びPEGをモル当量比 = 1 : 1.5で混合し、周囲温度にて3時間インキュベートした。PEG化の後に、Fab-pegを、クロマトグラフィによりSPセファローズHP媒体を用いて精製した。標的タンパク質を0 ~ 1 M NaClの塩勾配で溶出した。溶出したピークをSDS-Pageにより分析した。ピーク1はモノPEG化された物質を、ピーク2はPEG化されていない物質を、ピーク3はポリPEG化された物質を表した。

【0071】

結果を図10に示す。

これらの結果は、CD28.3 mAbからのFabタンパク質の大部分が、わずか約5 %のモノPEG化されたFab収率をもたらす乱されたPEG化プロフィールを表すことを示す(ピーク1)。

【0072】

CD28.3 mAbは、鎖内又は鎖間ジスルフィドブリッジに携わらないシステイン残基(C96)を可変ドメイン軽鎖の96位に含む。フリーなシステインは、ジスルフィドブリッジに携わるシステイン残基よりも高い反応性を有し、したがって、優先的にマレイミドで活性化されたPEGの標的となる。したがって、第2の望まれないPEG化がこの残基で起こる蓋然性が高い。

【0073】

この問題を解決するため、本発明者らは、VL-C96変異の研究を行い、C96残基を別のアミノ酸により抗体の結合特性を改変することなく置換することが可能かどうか判定した。

【0074】

軽鎖中に改変されていないC96を有するか、又はC96からのA、G、S、V、T、N若しくはR変異を有するヒト化抗CD28.3 Fabをコードするプラスミドを構築し、実施例1に開示されるようにして、リポフェクションによりCos細胞にトランスフェクトした。細胞上清をまずサンドイッチELISAにより分析し、実施例2に開示されるようにして、Fabの全濃度を測定した。次いで、上清をELISAにより分析し、実施例2に開示されるようにして、固定化された組換えCD28に対する結合活性を測定した。

【0075】

結果を図11に示す。これらの結果は、分析された全ての他の置換とは異なって、C96A置換が十分に活性な抗体をもたらしたこと及びC96N置換が活性の穏やかな減少だけをもたらしたことを示す。

【0076】

C96A FabフラグメントのバリエーションをPEG化し、上記のクロマトグラフィで精製した。PEG化されたタンパク質のプレクロマトグラフィ及び溶出ピークは、SDS-Pageにより分析した。結果を図12に示す。ピーク1は、モノPEG化された物質を表す。

これらの結果は、C96A Fabフラグメントが41%に達する効率でPEG化され得ることを示す(図12)。

【0077】

重鎖のCAA C末端の利点

フリーなシステインのすぐ近くの分子環境は、システインのマレイミド-PEG化しやすさ

10

20

30

40

50

【 図 1 】

[illegible]

【圖 2】

[illegible]

Figure 2

【図 4】

```

1  ATG GAA TGG TGC TGG GTG TTC CTG TTC CTG CTG TCC GTG ACC GCT 45
1  Met Glu Trp Cys Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala 15
46  GGC GTG CAC TCC AAG CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGC GCC GAG 90
46  Gly Val His Ser Lys Glu Val Glu Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu 30
91  CTG AAG AAG CCG GGC GGC TCC GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGC TCC 135
31  Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Val Ser Cys Lys Ala Ser 45
136  GGC TAC ACC TTC ACC GAG TAC ATC ATC CAC TGG ATC AAG CTC AGA 180
46  Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile His Thr Ile Lys Leu Arg 60
181  TCC GGC CAG GGC CTG GAA TGG ATC GGC TCC TTC TAC CCG GGC TCC 225
61  Ser Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Thr Tyr Pro Gly Ser 75
226  AAC GAC ATC CAG TAC AAC GCC CAG TTC AAG GGC AAG GCC ACC CTG 270
76  Asn Asp Ile Glu Trp Asp Ala Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu 90
271  ACC GCC CAC AAG TCC TCC TCC ACC GTG TAC ATG GAA CTG ACC GGC 315
91  Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly 105
316  CTG ACC CCG GAG CAG TCC GCC GTG TAC TTC TGC GGC AAG CGG GAC 360
106  Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp 120
361  GAC TTC TCT GGC TAC GAC GCC CTC CCG TAT TGG GGC CAG GGC ACC 405
121  Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Glu Gly Thr 135
406  CTG GTG ACC GTG TCC GCC GAG GCC AAG ACT CAC ACA TGC CCA CGG TGC 450
136  Leu Val Thr Val Ser Ala Asn Lys Thr His Thr Cys Pro Glu Ser 150
451  CCA GCA CCG CCG TGC GTG GGC GCA GCA TCA CTC TTC CTG TTC CCC 495
151  Arg Ala Pro Glu Phe Thr Leu Gly Gly Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro 165
496  CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC CGG ACC COT GAG GTC 540
166  Arg Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met His Ser Arg Thr Pro Glu Val 180
941  ACC TGC GTG GTG GTG GAG GTG GAG GTC AAG GAC CCC GAG CTC CAG 585
181  Thr Cys Val Val Val Val Val Ser Ser Glu Glu Asp Pro Glu Val Glu 195
586  TTC AAC TGC TAC CTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GGC AAG ACA 630
196  Phe Asp Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asp Asp Lys Thr 210
631  AAG CGC GGC GAG CAG TGC AAC AGC AGC TGC CCG GTC GTG GTC AGC 675
211  Lys Trp Asp Glu Glu Glu Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser 225
676  GTC CTC ACC GTC CTC GAG CAG CAG TGG CCG AAC GGC AAG GAG TAC 720
226  Val Leu Thr Val Val Leu His Glu Asp Thr Leu Asn Gly Tyr Ser Arg 240
721  AAG TGC AAG GTC TCC AAG AAA GGC CTC CGC TCC TCC ATC GAG AAA 765
241  Lys Cys Lys Val Val Ser Asp Lys Gly Leu Pro Ser Ser His Glu Lys 280
766  ACC ATC TCC AAA GGC AAA GGC CAG GGC CCA GAG CCA GAG GTG TAC 810
256  Thr His Ser Pro Lys Asp Lys Glu Glu Phe Asp Arg Glu Pro Glu Val Tyr 270
811  ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC 855
271  Thr Leu Pro Pro Ser Glu Glu Glu Met His Lys Pro Ser Asp His Ala Val 285
856  CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCG AGC GAC ATC GGC GTG 900
286  Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Phe Tyr Pro Ser Asp His Ala Val 300
901  GAG TGG GAG AGC AAT GGC CAG CGG GAG AAC TAC AAG ACC AGC 945
301  Glu Trp Glu Glu Asp Lys Glu Phe Phe Asp Lys Asn Tyr Lys Thr Thr 960
946  CCG CCG GTC GAG TCC GAG ACC GGC TCC TTC CTC TAC TAC ACC AAG 990
316  Pro Pro Val Leu Asp Ser Ser Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg 1005
991  CCG CCG GTC GAG TCC GAG ACC GGC TCC TTC CTC TAC TAC ACC AAG 1035
316  Pro Pro Val Leu Asp Ser Ser Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg 1050
1036  TGC TCC GTC ATG CAT GAG GTC CAG GGC CAG AAC CAC TAC ACA CAG 1080
346  Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Glu Lys 360
1081  AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA 1107
361  Ser Leu Ser Leu Ser Leu Val Lys End

```

Figure 4

【図 5】

```

1  ATG TCC GTG CCT ACC CAG GTG CTG GGA CTG CTG CTG CTG TGG CTG 45
1  Met Ser Val Pro Thr Glu Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu 15
46  ACC GAC GCC AGA TGC GAG ACT CAG ATG ACC CAG TCC CCC TCC TCC 90
16  Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Glu Met Thr Glu Ser Pro Ser Ser 30
91  CTG TCT GGC TCC GTG GGC CAG GGC GTG ACC ATC ACC TGT AAG ACC 135
31  Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr 45
136  AAC GAG AAC ATC TAC TCC AAG CTG GGC TGC TAT CAG CAG AAG GAC 180
46  Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Asn Ala Trp Tyr Glu Glu Lys Asp 60
181  GGC AAG TCC CCT CAG CTG CTG ATC TAC GGC GGC ACC CAT CTG GTG 225
61  Gly Lys Ser Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val 75
226  GAG GGC GTG CCC TCT AGA TGC TCC GGC TCC GGC TCT GGC ACC CAG 270
76  Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu 90
271  TAC TCC CTG ACC ATC AGC TCC CTG CAG CCG GAG GAC TTC GGC AAC 315
91  Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Gly Asn 105
316  TAC TAC TGC CAG CAC TTC TGG GGC ACC CCG TGT ACC TCC GGC GGA 360
106  Tyr Tyr Cys Glu His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly 120
361  GGC ACC AAG CTC GAA ATC AAG CGG CAG AAC ACT CAC ACA TGC CCA 405
121  Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Asp Lys Thr His Thr Lys Pro 135
406  CCG TGC CCA GCA CCG GAG TTC CTG GGC GCA CCA TCA GTC TTC CTG 450
136  Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 465
451  TTC CCC CCA AAA CCC AAG CAG ACT CTC ATC TCC CCG ACC CCG 495
151  Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Ser His Ser Arg Thr Pro 165
496  GAG GTC ACC TGC GTG GTG GTG GAG GTG ACC CAG GAA CAG CCG GAG 540
166  Glu Val Thr Cys Val Val Val Val Asn Val Ser Glu Glu Asp Lys 180
541  GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GAG GTC GAG GTC CAT AAT 585
181  Val Glu Phe Asn Trp Tyr Val Asp Glu Val Val Val Val Val Val 195
586  AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC ACC ACC TAC CCG GTG 630
196  Lys Thr Lys Pro Asp Glu Glu Glu Phe Asn Ser Thr Tyr Ser Val 210
631  GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTC CAG CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG 675
211  Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asp Lys Lys 225
676  GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG TCC TCC ATC 720
226  Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Lys 240
721  GAG AAA ACC ATC TCC AAA CCC AAA GGC CAG CCC CCA GAG CCA CAG 765
241  Glu Lys Thr His Ser Lys Ala Lys Gly Glu Pro Arg Glu Pro Glu 280
766  GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG 810
256  Val Tyr Phe Leu Pro Pro Ser Glu Glu Glu Met Thr Lys Asn Glu 270
811  GTC AGC GTC ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC 855
271  Val Ser Ser Thr Thr Leu Val Lys Glu Phe Tyr Pro Ser Asp His 285
856  GGC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGC CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG 900
286  Ala Val Glu Thr Glu Ser Asn Gly Glu Pro Glu Asp Asp Tyr Lys 300
901  ACC AGC CCG CCG GTC GTC GAG TCC GAG GGC GGC TCC TTC CTC TAC 945
301  Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 315
946  AGC AGC CTC ACC GTG GAG AAC AGC AGC AGC TGC CAG GAG GGT ATC 990
316  Ser Arg Ser Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Glu Glu Asn Val 1005
991  TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GGT CTC CAG AAC CAC TAC ACA 1035
331  Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 345
1036  CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTC GGT AAA TGA 1068
346  Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys End

```

Figure 5

【図 6】

```

1  ATG GAA TGG TGC TGG GTG TTC CTG TTC CTG CTG TCC GTG ACC GCT 45
1  Met Glu Trp Cys Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala 15
46  GGC GTG CAC TCC AAG CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGC GCC GAG 90
16  Gly Val His Ser Lys Glu Val Glu Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu 30
91  CTG AAG AAG CCG GGC GGC TCC GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGC TCC 135
31  Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser 45
136  GGC TAC ACC TTC ACC GAG TAC ATC ATC CAC TGG ATC AAG CTG AGA 180
46  Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile His Thr Trp Ile Lys Leu Arg 60
181  TCC GGC CAG GGC CTG GAA TGG ATC GGC TGG TTC TAC CCG GGC TCC 225
61  Ser Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Thr Tyr Pro Gly Ser 75
226  AAC GAC ATC CAG TAC AAC GCC CAG TTC AAG GGC AAG GCC ACC CTG 270
76  Asn Asp Ile Glu Trp Asp Ala Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu 90
271  ACC GCC CAC AAG TCC TCC TCC ACC GTG TAC ATG GAA CTG ACC GGC 315
91  Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly 105
316  CTG ACC CCG GAG CAG TCC GCC GTG TAC TTC TGC GGC AAG GAG GAC 360
106  Leu Thr Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp 120
361  GAC TTC TCT GGC TAC GAC GCC CTC CCG TAT TGG GGC CAG GGC ACC 405
121  Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Glu Gly Thr 135
406  CTG GTG ACC GTG TCC GCC GAG GCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAG 450
136  Leu Val Thr Val Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His 150
451  ACA TCC CCA CGG TGC CCA GCA CCG GAG TCC CTG GGC GGA CCA TCA 495
151  Thr Cys Pro Pro Cys His Ala TCC Glu Phe Asn Glu Gly Tyr Ser 165
496  GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAG ACT CTC ATG ATC TCC 540
166  Val Thr Asn Thr Pro Pro Lys Ser Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg 210
541  GGC ACC CCG GAG GTC ACC GGC TGC GTG GTC GAG GGC AAG CAG GAA 585
181  Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu 195
586  GAC CCG GAG GTC CAG TCC AAC GGC GTG CTG GAT GGC CAG GAG GTG 630
196  Asp Pro Glu Val Glu Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 210
631  CAT AAT GGC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACC 675
211  His Asp Ala Lys Thr Lys Pro Asp Glu Glu Glu Thr Asn Ser Thr 720
676  TAC CCG GTC GTC ACC CTC ACC CTC CTG CAG CAG GAG TGC GTG 765
226  Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Asp Arg His Glu Asp Trp Leu 780
241  AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG 765
241  Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Leu Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro 785
766  TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GGC AAG GGC CAG CCG CCA 810
256  Ser Ser His Glu Lys Thr His Ser Lys Lys Ala Val Glu Glu Pro Arg 270
811  GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG GGC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC 855
271  Glu Pro Glu Val Tyr Thr Lys Pro Phe Ser Glu Glu Glu Met Thr 285
856  AAG AAC CAG GTC AGC CTC ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCG 900
286  Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 300
901  AGC GAC ATC CCG GTG GAG TGG GAG AAC AAT GGC CAG CCG GAG AAC 945
301  Ser Asp His Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Glu Glu Pro Glu Asn 315
946  AAC TAC AAG ACC CCG CCG GTC CTG GAG TCC GAG GGC TCC TTC 990
316  Asn Tyr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 1005
991  TTC CTC TAC ACC AGC CTC ACC GTC AAG AGC AGC TGG CAG GAG 1035
331  Phe Ser Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 1050
1036  GGC AAT GTC TTC TCA TGG TCC CTC ATC CAT GAG GGT CTC CAG AAC 1080
346  Gly Asp Val Ser Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 360
1081  CAC TAC ACA CAG AGC CTC CTC CTC CTC CTC CTC CTC CTC CTC CTC 1122
361  His Thr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys End

```

Figure 6

【図 7】

```

1  ATG TCC GTG CCT ACC CAG GTG CTG GGA CTG CTG CTG CTG TGG CTG 45
1  Met Ser Val Pro Thr Glu Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu 15
46  ACC GAC GCC AGA TGC GAG ACT CAG ATG ACC CAG TCC CCC TCC TCC 90
16  Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile Glu Met Thr Glu Ser Pro Ser Ser 30
91  CTG TCT GGC TCC GTG GGC CAG GGC GTG ACC ATC ACC TGT AAG ACC 135
31  Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr 45
136  AAC GAG AAC ATC TAC TCC AAC CTG GGC TCC TAT CAG CAG AAG GAC 180
46  Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Asn Ala Trp Tyr Glu Glu Lys Asp 60
181  GGC AAG TCC CCG CAG CAG CTC ATC TAC GGC GGC ACC CAG CTC GTG 225
61  Gly Lys Ser Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val 75
226  GAG GGC GTC CCC TCT AGA TGC TCC GGC TGC GGC TCT GGC ACC CAG 270
76  Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu 90
271  TAC TCC CTG ACC ATC AGC TCC CTG CAG CCG GAG GAC TTC GGC AAC 315
91  Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Gly Asn 105
316  TAC TAC TGC CAG CAC TTC TGG GGC ACC CCG TGT ACC TTC GGC GGA 360
106  Tyr Tyr Cys Glu His Phe Trp Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 120
361  GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAG CGG GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA 405
121  Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys 135
406  ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCG GAG TTC CTC GGC GGA 450
136  Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Glu Phe Thr Glu Phe Leu Gly 150
451  CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCG CCA AAA CCC AAG GAG ACT CTC ATC 495
151  Pro Ser Val Phe Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr 165
496  ATC TCC CCG ACC CCG GAG GTC CAG GGC TGC GTC GTG GAG GGC AAG 540
166  His Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 190
541  CAG GAA CAC CCC GAG GTC CAG TCC AAC TGC TAC CTG GAT GGC GTG 585
181  Glu Glu Asp Pro Glu Val Glu Phe Asn Trp Tyr Val Asp Lys Thr 195
586  GAG CTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC 630
196  Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Glu Phe Asn 210
631  AGC AGC TAC CCG GTC GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTC CAG CAG GAG 675
211  Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp 720
676  TGC GTC AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG TGC AAC TCC AAC AAA 765
226  Thr Leu Ser Gly Lys Glu Thr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Thr 780
721  CCG CCG TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GGC AAA GGC CAG 765
241  Leu Pro Ser Ser His Glu Lys Thr His Ser Lys Thr Lys Glu Glu 785
766  CCC CCA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG 810
256  Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu 820
811  ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC GTC ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC 855
271  Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Tyr Leu Val Lys Gly Phe 285
856  TAC CCC AGC GAC ATC GGC GTG GAG TGC GAG AGC AAT GGC CAG CCG 900
286  Tyr Pro Ser Asp His Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Glu Glu Thr 300
901  GAG AAC AAC TAC AAG ACC AGC CCG CCG GTC GTC GAG TCC CAG GGC 945
301  Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Lys Glu Glu 315
946  CCG TTC TTC CTC TAC AAG AGC CTC ACC GTC GAG AAG AGC AAG TGG 990
316  Ser Phe Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser 1005
991  CAG GAG GAG AAT GTC TTC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC TCC 1035
331  Glu Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu 345
1036  CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC CTC CTC CTC CTC CTC CTC 1080
346  His Asn His Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 360
1081  TGA 1083
361  End

```

Figure 7

【図 11】

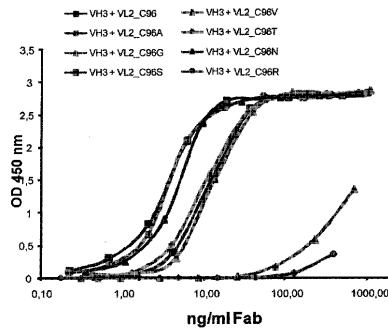
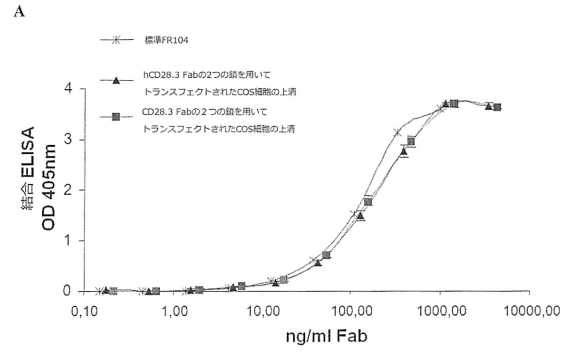
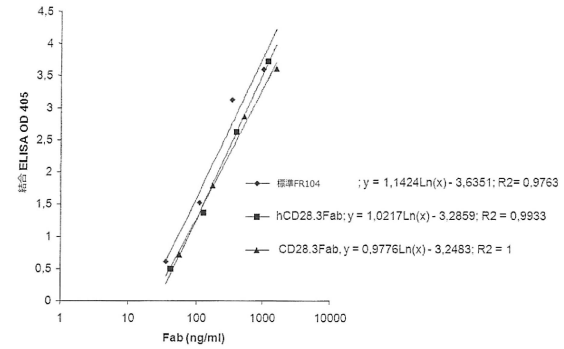


Figure 11

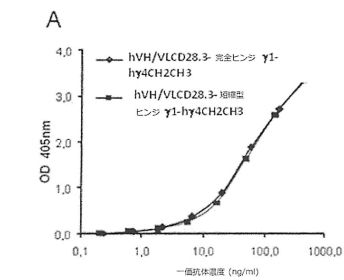
【図 3】



B



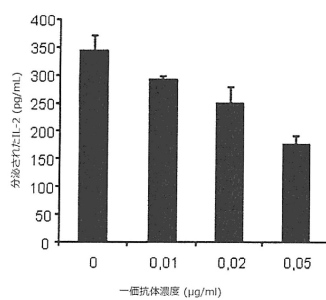
【図 8】



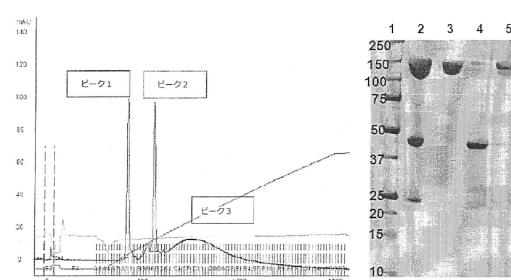
B

抗体	形式	R ²	ACS0 (ng/ml)
hVH/VLCD28.3- 完全ヒンジ γ1-hy4CH2-CH3	$Y=0.834 \ln(x)-1.58$	0.996	51.3
hVH/VLCD28.3- 短鎖型ヒンジ γ1-hy4CH2-CH3	$Y=0.872 \ln(x)-1.759$	1	53.1

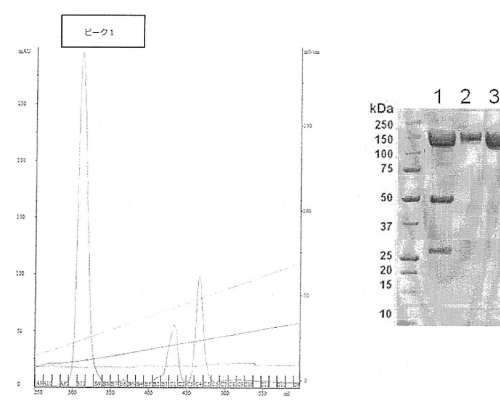
【図 9】



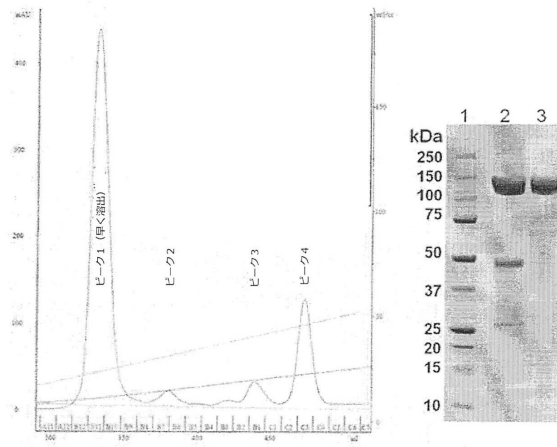
【図 10】



【図 12】



【図 13】



【配列表】

0005992340000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 37/08 (2006.01) A 6 1 P 37/08
 A 6 1 P 29/00 (2006.01) A 6 1 P 29/00

(73)特許権者 591100596

アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル
 フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(74)代理人 100159385

弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407

弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(72)発明者 マリー, カロリーヌ

フランス、エフ - 4 4 6 8 0 サント パザンヌ、リュ ド ヴェルドレ 1 0

(72)発明者 ポワリエ, ニコラ

フランス、エフ - 4 4 2 0 0 ナント、リュ ド ラ トゥール ドヴェルニュ 1

(72)発明者 ヴァンホーフ, ベルナール

フランス、エフ - 4 4 4 0 0 ルゼ、リュ アンリ パルビュッス 7 2 ビス

審査官 星 浩臣

(56)参考文献 特表 2 0 0 4 - 5 1 6 0 3 4 (J P , A)

特表 2 0 0 9 - 5 1 2 4 5 3 (J P , A)

特表 2 0 0 6 - 5 2 4 9 8 6 (J P , A)

特表 2 0 0 4 - 5 1 5 2 4 3 (J P , A)

特表 2 0 1 2 - 5 1 4 9 9 7 (J P , A)

J. Exp. Med., 1993, Vol. 177, No. 1, pp. 165-173

J. W. Saldanha, "Chapter 6: Molecular Engineering I: Humanization", Handbook of Therapeutic Antibodies, 2007, pp. 119-144

KASHMIRI S V S, SDR GRAFTING--A NEW APPROACH TO ANTIBODY HUMANIZATION, METHODS : A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, 米国, ACADEMIC PRESS INC, 2 0 0 5 年 5 月 1 日, V36 N1, P25-34

Am. J. Transplant., 2012, Vol. 12, No. 7, pp. 1682-1690

Am. J. Transplant., 2012, Vol. 12, No. 10, pp. 2630-2640

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 2 8 - 1 6 / 3 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

D W P I (T h o m s o n I n n o v a t i o n)