

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7558949号
(P7558949)

(45)発行日 令和6年10月1日(2024.10.1)

(24)登録日 令和6年9月20日(2024.9.20)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13 Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
請求項の数 14 (全100頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-537082(P2021-537082)	(73)特許権者	519331109
(86)(22)出願日	令和1年12月27日(2019.12.27)		ギガジェン，インコーポレイティッド
(65)公表番号	特表2022-516071(P2022-516071 A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(43)公表日	令和4年2月24日(2022.2.24)		7 0 , サン カルロス， ショアウェイ
(86)国際出願番号	PCT/US2019/068820	(74)代理人	100078282
(87)国際公開番号	WO2020/140084		弁理士 山本 秀策
(87)国際公開日	令和2年7月2日(2020.7.2)	(74)代理人	100113413
審査請求日	令和4年12月26日(2022.12.26)		弁理士 森下 夏樹
(31)優先権主張番号	62/785,659	(74)代理人	100181674
(32)優先日	平成30年12月27日(2018.12.27)		弁理士 飯田 貴敏
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641
微生物の受託番号	ATCC PTA-125509		弁理士 石川 大輔
	ATCC PTA-125510	(74)代理人	230113332
	最終頁に続く		弁護士 山本 健策
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 C T L A - 4 結合タンパク質およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（C T L A - 4）に特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質（A B P）であって、C D R 1 - L、C D R 2 - L、C D R 3 - L、C D R 1 - H、C D R 2 - HおよびC D R 3 - Hを含み、

前記C D R 1 - Lが、配列番号1 0 1 4からなり、前記C D R 2 - Lが、配列番号2 0 1 4からなり、前記C D R 3 - Lが、配列番号3 0 1 4からなり、前記C D R 1 - Hが、配列番号4 0 1 4からなり、前記C D R 2 - Hが、配列番号5 0 1 4からなり、前記C D R 3 - Hが、配列番号6 0 1 4からなるか；または

前記C D R 1 - Lが、配列番号1 0 0 7からなり、前記C D R 2 - Lが、配列番号2 0 0 7からなり、前記C D R 3 - Lが、配列番号3 0 0 7からなり、前記C D R 1 - Hが、配列番号4 0 0 7からなり、前記C D R 2 - Hが、配列番号5 0 0 7からなり、前記C D R 3 - Hが、配列番号6 0 0 7からなるか；または

前記C D R 1 - Lが、配列番号1 0 1 0からなり、前記C D R 2 - Lが、配列番号2 0 1 0からなり、前記C D R 3 - Lが、配列番号3 0 1 0からなり、前記C D R 1 - Hが、配列番号4 0 1 0からなり、前記C D R 2 - Hが、配列番号5 0 1 0からなり、前記C D R 3 - Hが、配列番号6 0 1 0からなるか；または

前記C D R 1 - Lが、配列番号1 0 1 2からなり、前記C D R 2 - Lが、配列番号2 0 1 2からなり、前記C D R 3 - Lが、配列番号3 0 1 2からなり、前記C D R 1 - Hが、配列番号4 0 1 2からなり、前記C D R 2 - Hが、配列番号5 0 1 2からなり、前記C D

R 3 - H が、配列番号 6 0 1 2 からなるか；または

前記 C D R 1 - L が、配列番号 1 0 1 3 からなり、前記 C D R 2 - L が、配列番号 2 0 1 3 からなり、前記 C D R 3 - L が、配列番号 3 0 1 3 からなり、前記 C D R 1 - H が、配列番号 4 0 1 3 からなり、前記 C D R 2 - H が、配列番号 5 0 1 3 からなり、前記 C D R 3 - H が、配列番号 6 0 1 3 からなり、

前記 A B P が、抗体またはその抗原結合断片である、A B P。

【請求項 2】

可変軽鎖 (V_L)、ならびに、可変重鎖 (V_H) を含む、請求項 1 に記載の A B P であつて、

前記 V_L が配列番号 1 4 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 1 4 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含むか、

10

前記 V_L が配列番号 7 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 0 7 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含むか、

前記 V_L が配列番号 1 0 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 1 0 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含むか、

前記 V_L が配列番号 1 2 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 1 2 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含むか、あるいは、

前記 V_L が配列番号 1 3 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 1 3 の配列と少なくとも 9 7 % 同一の配列を含む、

A B P。

20

【請求項 3】

配列番号 1 4 の配列を含む可変軽鎖 (V_L)、ならびに、配列番号 1 1 4 の配列を含む可変重鎖 (V_H)、

配列番号 7 の配列を含む可変軽鎖 (V_L)、ならびに、配列番号 1 0 7 の配列を含む可変重鎖 (V_H)、

配列番号 1 0 の配列を含む可変軽鎖 (V_L)、ならびに、配列番号 1 1 0 の配列を含む可変重鎖 (V_H)、

配列番号 1 2 の配列を含む可変軽鎖 (V_L)、ならびに、配列番号 1 1 2 の配列を含む可変重鎖 (V_H)、あるいは、

配列番号 1 3 の配列を含む可変軽鎖 (V_L)、ならびに、配列番号 1 1 3 の配列を含む可変重鎖 (V_H)

30

を含む、請求項 1 に記載の A B P。

【請求項 4】

前記 V_L および前記 V_H が、同族対であり、ここで、

前記 V_L が配列番号 1 4 の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 1 4 の配列を含むか、

前記 V_L が配列番号 7 の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 0 7 の配列を含むか、

前記 V_L が配列番号 1 0 の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 1 0 の配列を含むか、

40

前記 V_L が配列番号 1 2 の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 1 2 の配列を含むか、あるいは、

前記 V_L が配列番号 1 3 の配列を含み、そして、前記 V_H が配列番号 1 1 3 の配列を含む、

請求項 2 に記載の A B P。

【請求項 5】

s c F v または全長モノクローナル抗体または免疫グロブリン定常領域を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の A B P。

【請求項 6】

表面プラズモン共鳴により測定して、5 0 0 n M 未満の K_D でヒト C T L A - 4 に結合

50

する、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の A B P。

【請求項 7】

25 n M 未満の K_D で細胞表面上のヒト C T L A - 4 と結合する、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の A B P。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の A B P と賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 9】

がんの処置における使用のための、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の A B P を含む組成物または請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記処置において 1 つまたは複数の追加の治療剤が使用される、請求項 9 に記載の組成物または請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の A B P をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の単離されたポリヌクレオチドまたは請求項 12 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 14】

ヒト C T L A - 4 に特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質 (A B P) を産生する方法であって、

請求項 13 に記載の宿主細胞において前記 A B P を発現させること、および前記 A B P を単離することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願の相互参照

本出願は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、2018年12月27日に出願した米国仮特許出願第62/785,659号の優先権および利益を主張する。

【0002】

2. 配列表

本出願は、E F S - W e b 経由で提出した11998の配列に関する配列表を含み、この配列表は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2019年12月20日に作成した前記 A S C I I コピーは、G G N - 010WO__S L . t x t という名であり、サイズは1,927,908バイトである。

【0003】

3. 分野

C T L A - 4 に対する結合特異性を有する抗原結合タンパク質 (A B P)、ならびに医薬組成物、診断組成物、およびキットを含めた、そのような A B P を含む組成物が、本明細書で提供される。C T L A - 4 A B P を作製する方法、ならびに C T L A - 4 A B P を、例えば治療目的、診断目的および研究目的で、使用する方法も、提供される。

【背景技術】

【0004】

4. 背景

細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 および C D 152 (表面抗原分類 152) としても公知である、C T L A - 4 は、T 細胞炎症活性を抑制する細胞表面受容体である。C T L A - 4 は、調節性 T 細胞 (T r e g) により構成的に発現され、刺激された T 細胞において上方調節される。樹状細胞 (D C) などの抗原提示細胞 (A P C) にも発現される

10

20

30

40

50

CD80およびCD86は、CTLA-4の主要リガンドである。CTLA-4とそのリガンドとの相互作用は、T細胞炎症活性を抑制することによる免疫応答の下方調節および自己寛容の促進に極めて重要である。この活性は、免疫系ががん細胞を死滅させるのを防止するばかりでなく、自己免疫疾患も防止する。

【0005】

CTLA-4は、活性化T細胞により発現され、阻害シグナルをT細胞に伝達する、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。CTLA-4は、CD28よりも大きい親和性および結合力でCD80およびCD86に結合し、このことにより、ひいてはそのリガンドは、CD28との競争に勝つことができる。CTLA-4は阻害シグナルをT細胞に伝達するが、その一方で、CD28は刺激シグナルを伝達する。CTLA-4は、調節性T細胞(Treg)にも見られ、それらの阻害機能の一因となる。T細胞受容体およびCD28によるT細胞活性化は、CTLA-4の発現増加をもたらす。CTLA-4がT細胞において作用する機序は、まだ多少議論の余地がある。生化学的証拠は、CTLA-4がホスファターゼをT細胞受容体(TCR)に動員し、結果としてシグナルを減弱させることを示唆した。この研究は、その最初の発表以降、未だに文献で確認されていない。つい最近の研究は、CTLA-4が、抗原提示細胞の膜からB7-1およびB7-2を捕捉して除去し、ひいてはこれらをCD28の誘発に利用できなくすることにより、*in vivo*で機能し得ることを示唆している。

10

【0006】

CTLA-4のバリエーションは、インスリン依存性糖尿病、グレーブス病、橋本甲状腺炎、セリアック病、全身性エリテマトーデス、甲状腺関連眼窩症、原発性胆汁性肝硬変、および他の自己免疫疾患と関連付けられている。CD80およびCD86に対するCTLA-4の比較的高い結合親和性のため、CTLA-4は、自己免疫疾患の潜在的な治療法となっている。CTLA-4および抗体(CTLA-4-Ig)の可溶性融合タンパク質は、関節リウマチの臨床試験に使用されている。

20

【0007】

腫瘍細胞は、Tregの上方調節を含む様々な機序によって抗腫瘍免疫応答を抑制する。最近、CTLA-4阻害剤は、CTLA-4のそのリガンドとの結合に拮抗し、それによって免疫系を活性化して腫瘍を攻撃することが示された。CTLA-4抗体は、腫瘍微小環境に特異的なTregの抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を誘導し、ひいては腫瘍に対する免疫寛容を低下させるためにも、使用されている。このように、CTLA-4抗体は、いくつかの種類のがんを処置するために使用されているが、効果はまちまちである。

30

【0008】

したがって、がんおよび自己免疫疾患を含む様々な疾患の処置、診断および研究に使用することができるCTLA-4 ABPを開発する必要がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

5. 概要

40

CTLA-4に対する結合特異性を有する新規ABP、およびそのようなABPを使用する方法が、本明細書で提供される。CTLA-4は、ヒトCTLA-4(配列番号7001)またはヒトCTLA-4の断片である。

【0010】

ABPは、抗体を含むことができる。一部の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗体は、キメラ抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ヒト抗体である。一部の実施形態では、ABPは、抗体断片を含む。一部の実施形態では、ABPは、代替足場を含む。一部の実施形態では、ABPは、単鎖可変断片(scFv)を含む。

【0011】

50

本明細書で提供される A B P は、C T L A - 4 の阻害または活性化に関連する様々な生物学的効果を誘導することができる。一部の実施形態では、本明細書で提供される A B P は、C T L A - 4 とそのリガンドとの結合を防止する。一部の実施形態では、本明細書で提供される A B P は、T r e g によるエフェクター T 細胞の阻害を防止する。一部の実施形態では、A B P は、例えば、N K 細胞により発現される C D 1 6 の A B P F c ドメインとの結合により媒介される、A D C C および / または A D C P により、腫瘍微小環境における T r e g もしくは他の C T L A - 4 発現細胞を直接死滅させるか、またはそれらの殺滅を媒介する。一部の実施形態では、A B P は、調節性 T 細胞によるエフェクター T 細胞の抑制を、T r e g を直接死滅させることにより阻害する。一部の実施形態では、組織は、腫瘍である。一部の実施形態では、A B P は、C T L A - 4 を活性化し、その結果、T r e g の増幅および活性化をもたらす。

10

【 0 0 1 2 】

A B P を含む医薬組成物の 1 つまたは複数と医薬組成物の使用のための指示とを含むキットも提供される。

【 0 0 1 3 】

本明細書で提供される A B P をコードする単離されたポリヌクレオチドおよびそれらの部分も提供される。

【 0 0 1 4 】

そのようなポリヌクレオチドを含むベクターも提供される。

【 0 0 1 5 】

そのようなポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞、およびそのようなベクターを含む組換え宿主細胞も、提供される。

20

【 0 0 1 6 】

本明細書で提供されるポリヌクレオチド、ベクターまたは宿主細胞を使用して A B P を産生する方法も提供される。

【 0 0 1 7 】

A B P と薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物も提供される。

【 0 0 1 8 】

それを必要とする対象における疾患または状態を処置または予防する方法であって、本明細書で提供される A B P のまたはそのような A B P を含む医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む方法も提供される。一部の態様では、疾患または状態は、がんまたは自己免疫疾患である。一部の態様では、疾患または状態は、ウイルスまたは細菌感染症である。一部の態様では、方法は、1 つまたは複数の追加の治療剤を投与するステップをさらに含む。一部の態様では、追加の治療剤は、免疫刺激剤である。

30

【 0 0 1 9 】

より具体的には、本開示は、ヒト細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4) に特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質 (A B P) であって、(a) 配列番号 3 0 0 1 ~ 3 0 2 8 から選択される配列を有する C D R 3 - L、および配列番号 6 0 0 1 ~ 6 0 2 8 から選択される配列を有する C D R 3 - H ; または (b) 配列番号 9 9 8 4 ~ 1 0 4 7 9 から選択される配列を有する C D R 3 - L、および配列番号 1 1 4 7 2 ~ 1 1 9 6 7 から選択される配列を有する C D R 3 - H ; または (c) A T C C 受託番号 P T A - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの C D 3 - L の配列を有する C D R 3 - L、および A T C C 受託番号 P T A - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの C D 3 - L の配列を有する C D R 3 - L を含む、単離された抗原結合タンパク質 (A B P) を提供する。一部の実施形態では、C D R 3 - L および C D R 3 - H は、同族対である。

40

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、A B P は、(a) 配列番号 1 0 0 1 ~ 1 0 2 8 から選択される配列を有する C D R 1 - L ; および配列番号 2 0 0 1 ~ 2 0 2 8 から選択される配列を有する C D R 2 - L ; および配列番号 4 0 0 1 ~ 4 0 2 8 から選択される配列を有する C D R

50

1 - H ; および配列番号 5 0 0 1 ~ 5 0 2 8 から選択される配列を有する C D R 2 - H ;
 または (b) 配列番号 8 9 9 2 ~ 9 4 8 7 から選択される配列を有する C D R 1 - L ; お
 よび配列番号 9 4 8 8 ~ 9 9 8 3 から選択される配列を有する C D R 2 - L ; および配列
 番号 1 0 4 8 0 ~ 1 0 9 7 5 から選択される配列を有する C D R 1 - H ; および配列番号
 1 0 9 7 6 ~ 1 1 4 7 1 から選択される配列を有する C D R 2 - H ; または (c) A T C C
 C 受託番号 P T A - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか
 1 つの C D R 1 - L から選択される配列を有する C D R 1 - L ; および A T C C 受託番号
 P T A - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの C D
 R 2 - L から選択される配列を有する C D R 2 - L ; および A T C C 受託番号 P T A - 1
 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの C D R 1 - H か
 ら選択される配列を有する C D R 1 - H ; および A T C C 受託番号 P T A - 1 2 5 5 1 2
 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの C D R 2 - H から選択され
 る配列を有する C D R 2 - H を含む。

10

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、A B P は、C D R 1 - L、C D R 2 - L、C D R 3 - L、C D R
 1 - H、C D R 2 - H および C D R 3 - H を含み、C D R 1 - L は、配列番号 1 0 0 1 か
 らなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 0 1 からなり、C D R 3 - L は、配列番号 3 0 0
 1 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0 0 1 からなり、C D R 2 - H は、配列番号 5
 0 0 1 からなり、C D R 3 - H は、配列番号 6 0 0 1 からなるか ; または C D R 1 - L は
 、配列番号 1 0 0 2 からなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 0 2 からなり、C D R 3 -
 L は、配列番号 3 0 0 2 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0 0 2 からなり、C D R
 2 - H は、配列番号 5 0 0 2 からなり、C D R 3 - H は、配列番号 6 0 0 2 からなるか ;
 または C D R 1 - L は、配列番号 1 0 0 3 からなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 0 3
 からなり、C D R 3 - L は、配列番号 3 0 0 3 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0
 0 3 からなり、C D R 2 - H は、配列番号 5 0 0 3 からなり、C D R 3 - H は、配列番号
 6 0 0 3 からなるか ; または C D R 1 - L は、配列番号 1 0 0 4 からなり、C D R 2 - L
 は、配列番号 2 0 0 4 からなり、C D R 3 - L は、配列番号 3 0 0 4 からなり、C D R 1
 - H は、配列番号 4 0 0 4 からなり、C D R 2 - H は、配列番号 5 0 0 4 からなり、C D
 R 3 - H は、配列番号 6 0 0 4 からなるか ; または C D R 1 - L は、配列番号 1 0 0 5 か
 らなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 0 5 からなり、C D R 3 - L は、配列番号 3 0 0
 5 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0 0 5 からなり、C D R 2 - H は、配列番号 5
 0 0 5 からなり、C D R 3 - H は、配列番号 6 0 0 5 からなるか ; または C D R 1 - L は
 、配列番号 1 0 0 6 からなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 0 6 からなり、C D R 3 -
 L は、配列番号 3 0 0 6 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0 0 6 からなり、C D R
 2 - H は、配列番号 5 0 0 6 からなり、C D R 3 - H は、配列番号 6 0 0 6 からなるか ;
 または C D R 1 - L は、配列番号 1 0 0 7 からなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 0 7
 からなり、C D R 3 - L は、配列番号 3 0 0 7 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0
 0 7 からなり、C D R 2 - H は、配列番号 5 0 0 7 からなり、C D R 3 - H は、配列番号
 6 0 0 7 からなるか ; または C D R 1 - L は、配列番号 1 0 0 8 からなり、C D R 2 - L
 は、配列番号 2 0 0 8 からなり、C D R 3 - L は、配列番号 3 0 0 8 からなり、C D R 1
 - H は、配列番号 4 0 0 8 からなり、C D R 2 - H は、配列番号 5 0 0 8 からなり、C D
 R 3 - H は、配列番号 6 0 0 8 からなるか ; または C D R 1 - L は、配列番号 1 0 0 9 か
 らなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 0 9 からなり、C D R 3 - L は、配列番号 3 0 0
 9 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0 0 9 からなり、C D R 2 - H は、配列番号 5
 0 0 9 からなり、C D R 3 - H は、配列番号 6 0 0 9 からなるか ; または C D R 1 - L は
 、配列番号 1 0 1 0 からなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 1 0 からなり、C D R 3 -
 L は、配列番号 3 0 1 0 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0 1 0 からなり、C D R
 2 - H は、配列番号 5 0 1 0 からなり、C D R 3 - H は、配列番号 6 0 1 0 からなるか ;
 または C D R 1 - L は、配列番号 1 0 1 1 からなり、C D R 2 - L は、配列番号 2 0 1 1
 からなり、C D R 3 - L は、配列番号 3 0 1 1 からなり、C D R 1 - H は、配列番号 4 0

20

30

40

50

50

またはCDR1-Lは、配列番号1027からなり、CDR2-Lは、配列番号2027からなり、CDR3-Lは、配列番号3027からなり、CDR1-Hは、配列番号4027からなり、CDR2-Hは、配列番号5027からなり、CDR3-Hは、配列番号6027からなるか；またはCDR1-Lは、配列番号1028からなり、CDR2-Lは、配列番号2028からなり、CDR3-Lは、配列番号3028からなり、CDR1-Hは、配列番号4028からなり、CDR2-Hは、配列番号5028からなり、CDR3-Hは、配列番号6028からなる。

【0022】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号1～28から選択される配列と少なくとも97%同一の配列を含む可変軽鎖(V_L)、および配列番号101～128から選択される配列と少なくとも97%同一の配列を含む可変重鎖(V_H)；または配列番号8000～8495から選択される配列と少なくとも97%同一の配列を含む可変軽鎖(V_L)、および配列番号8496～8991から選択される配列と少なくとも97%同一の配列を含む可変重鎖(V_H)；またはATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか1つのV_L配列と少なくとも97%同一の配列を含む可変軽鎖(V_L)、およびATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか1つのV_H配列と少なくとも97%同一の配列を含む可変重鎖(V_H)を含む。一部の実施形態では、V_LおよびV_Hは、同族対である。

【0023】

一部の実施形態では、ABPは、配列番号1～28から選択される配列を含む可変軽鎖(V_L)、および配列番号101～128から選択される配列を含む可変重鎖(V_H)；または配列番号8000～8495から選択される配列を含む可変軽鎖(V_L)、および配列番号8496～8991から選択される配列を含む可変重鎖(V_H)；またはATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか1つのV_L配列を含む可変軽鎖(V_L)、およびATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか1つのV_H配列を含む可変重鎖(V_H)を含む。一部の実施形態では、V_LおよびV_Hは、同族対である。

【0024】

一部の実施形態では、ABPは、scFvまたは全長モノクローナル抗体を含む。一部の実施形態では、ABPは、免疫グロブリン定常領域を含む。

【0025】

一部の実施形態では、ABPは、表面プラズモン共鳴により測定して、500nM未満のK_DでヒトCTLA-4に結合する。一部の実施形態では、ABPは、表面プラズモン共鳴により測定して、200nM未満のK_DでヒトCTLA-4に結合する。一部の実施形態では、ABPは、表面プラズモン共鳴により測定して、25nM未満のK_DでヒトCTLA-4に結合する。一部の実施形態では、ABPは、25nM未満のK_Dで細胞表面上のヒトCTLA-4と結合する。

【0026】

本開示の別の態様は、疾患を処置する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書で開示されるABPのまたは本明細書で開示される医薬組成物の有効量を投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、疾患は、がん、AIDS、アルツハイマー病およびウイルスまたは細菌感染症からなる群から選択される。一部の実施形態では、方法は、1つまたは複数の追加の治療剤を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、追加の治療剤は、CTLA-4阻害剤、TIGIT阻害剤、化学療法剤、免疫刺激剤、放射線、サイトカイン、サイトカインをコードするポリヌクレオチド、およびこれらの組合せから選択される。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

ヒト細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)に特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質(ABP)であって、

10

20

30

40

50

(a) 配列番号 3001 ~ 3028 から選択される配列を有する CDR3 - L、および配列番号 6001 ~ 6028 から選択される配列を有する CDR3 - H；または

(b) 配列番号 9984 ~ 10479 から選択される配列を有する CDR3 - L、および配列番号 11472 ~ 11967 から選択される配列を有する CDR3 - H；または

(c) ATCC 受託番号 PTA - 125512 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの CDR3 - L の配列を有する CDR3 - L、および ATCC 受託番号 PTA - 125512 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの CDR3 - L の配列を有する CDR3 - L

を含む、単離された抗原結合タンパク質 (ABP)。

(項目 2)

前記 CDR3 - L および前記 CDR3 - H が、同族対である、項目 1 に記載の ABP。

(項目 3)

(a) 配列番号 1001 ~ 1028 から選択される配列を有する CDR1 - L；および配列番号 2001 ~ 2028 から選択される配列を有する CDR2 - L；および配列番号 4001 ~ 4028 から選択される配列を有する CDR1 - H；および配列番号 5001 ~ 5028 から選択される配列を有する CDR2 - H；または

(b) 配列番号 8992 ~ 9487 から選択される配列を有する CDR1 - L；および配列番号 9488 ~ 9983 から選択される配列を有する CDR2 - L；および配列番号 10480 ~ 10975 から選択される配列を有する CDR1 - H；および配列番号 10976 ~ 11471 から選択される配列を有する CDR2 - H；または

(c) ATCC 受託番号 PTA - 125512 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの CDR1 - L から選択される配列を有する CDR1 - L；および ATCC 受託番号 PTA - 125512 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの CDR2 - L から選択される配列を有する CDR2 - L；および ATCC 受託番号 PTA - 125512 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの CDR1 - H から選択される配列を有する CDR1 - H；および ATCC 受託番号 PTA - 125512 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか 1 つの CDR2 - H から選択される配列を有する CDR2 - H

を含む、項目 1 に記載の ABP。

(項目 4)

CDR1 - L、CDR2 - L、CDR3 - L、CDR1 - H、CDR2 - H および CDR3 - H を含み、

前記 CDR1 - L が、配列番号 1001 からなり、前記 CDR2 - L が、配列番号 2001 からなり、前記 CDR3 - L が、配列番号 3001 からなり、前記 CDR1 - H が、配列番号 4001 からなり、前記 CDR2 - H が、配列番号 5001 からなり、前記 CDR3 - H が、配列番号 6001 からなるか；または

前記 CDR1 - L が、配列番号 1002 からなり、CDR2 - L が、配列番号 2002 からなり、前記 CDR3 - L が、配列番号 3002 からなり、前記 CDR1 - H が、配列番号 4002 からなり、前記 CDR2 - H が、配列番号 5002 からなり、前記 CDR3 - H が、配列番号 6002 からなるか；または

前記 CDR1 - L が、配列番号 1003 からなり、前記 CDR2 - L が、配列番号 2003 からなり、前記 CDR3 - L が、配列番号 3003 からなり、前記 CDR1 - H が、配列番号 4003 からなり、前記 CDR2 - H が、配列番号 5003 からなり、前記 CDR3 - H が、配列番号 6003 からなるか；または

前記 CDR1 - L が、配列番号 1004 からなり、前記 CDR2 - L が、配列番号 2004 からなり、前記 CDR3 - L が、配列番号 3004 からなり、前記 CDR1 - H が、配列番号 4004 からなり、前記 CDR2 - H が、配列番号 5004 からなり、前記 CDR3 - H が、配列番号 6004 からなるか；または

前記 CDR1 - L が、配列番号 1005 からなり、前記 CDR2 - L が、配列番号 2005 からなり、前記 CDR3 - L が、配列番号 3005 からなり、前記 CDR1 - H が、

10

20

30

40

50

配列番号 8000 ~ 8495 から選択される配列と少なくとも 97% 同一の配列を含む可変軽鎖 (VL)、および配列番号 8496 ~ 8991 から選択される配列と少なくとも

50

97%同一の配列を含む可変重鎖 (V_H) ; または

A T C C 受託番号 P T A - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか1つの V_L 配列と少なくとも97%同一の配列を含む可変軽鎖 (V_L)、および A T C C 受託番号 P T A - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか1つの V_H 配列と少なくとも97%同一の配列を含む可変重鎖 (V_H) を含む、項目1に記載の A B P。

(項目6)

前記 V_L および前記 V_H が、同族対である、項目5に記載の A B P。

(項目7)

配列番号1~28から選択される配列を含む可変軽鎖 (V_L)、および配列番号101~128から選択される配列を含む可変重鎖 (V_H) ; または

配列番号8000~8495から選択される配列を含む可変軽鎖 (V_L)、および配列番号8496~8991から選択される配列を含む可変重鎖 (V_H) ; または

A T C C 受託番号 P T A - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか1つの V_L 配列を含む可変軽鎖 (V_L)、および A T C C 受託番号 P T A - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託されたライブラリー内のクローンのいずれか1つの V_H 配列を含む可変重鎖 (V_H)

を含む、項目1に記載の A B P。

(項目8)

前記 V_L および前記 V_H が、同族対である、項目7に記載の A B P。

(項目9)

s c F v または全長モノクローナル抗体を含む、項目1から8のいずれかに記載の A B P。

(項目10)

免疫グロブリン定常領域を含む、項目1から8のいずれかに記載の A B P。

(項目11)

表面プラズモン共鳴により測定して、500 nM未満の K_D でヒト C T L A - 4 に結合する、前記項目のいずれかに記載の A B P。

(項目12)

表面プラズモン共鳴により測定して、200 nM未満の K_D でヒト C T L A - 4 に結合する、項目11に記載の A B P。

(項目13)

表面プラズモン共鳴により測定して、25 nM未満の K_D でヒト C T L A - 4 に結合する、項目12に記載の A B P。

(項目14)

25 nM未満の K_D で細胞表面上のヒト C T L A - 4 と結合する、項目1から13のいずれかに記載の A B P。

(項目15)

項目1から14のいずれかに記載の A B P と賦形剤とを含む、医薬組成物。

(項目16)

疾患を処置する方法であって、

それを必要とする対象に、項目1から14のいずれかに記載の A B P または項目15に記載の医薬組成物の有効量を投与するステップを含む、方法。

(項目17)

前記疾患が、がん、A I D S、アルツハイマー病およびウイルスまたは細菌感染症からなる群から選択される、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記対象に1つまたは複数の追加の治療剤を投与するステップをさらに含む、項目16から17のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 9)

前記追加の治療剤が、C T L A - 4 阻害剤、T I G I T 阻害剤、化学療法剤、免疫刺激剤、放射線、サイトカイン、サイトカインをコードするポリヌクレオチド、およびこれらの組合せから選択される、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

項目 1 から 1 0 のいずれかに記載の A B P をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 2 1)

項目 2 0 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター。

(項目 2 2)

項目 2 0 に記載の単離されたポリヌクレオチドまたは項目 2 1 に記載のベクターを含む宿主細胞。

(項目 2 3)

ヒト C T L A - 4 に特異的に結合する単離された抗原結合タンパク質 (A B P) を產生する方法であって、

項目 2 2 に記載の宿主細胞において前記 A B P を発現させること、および前記 A B P を単離することを含む方法。

6 . 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 7 】

【図 1】図 1 は、完全ヒトマウスから単離された B 細胞から s c F v ライブラリーを生成し、抗原に対して高親和性を有する抗体を発現する B 細胞を選択する方法をまとめた。図 1 は、出現した順に、それぞれ、配列番号 1 1 9 7 1 ~ 1 1 9 9 8 を開示する。

【 0 0 2 8 】

【図 2】図 2 は、s c F v 増幅手順を例示する。第一に、I g K C 領域、I g G C 領域、および全ての V 領域を対象とするプライマーの混合物を使用して、I g K と I g H を別々に増幅させる。第二に、V - H および C - K プライマーは、I g K と I g H との融合生成物であるオーバーラップ伸長アンプリコンの形成をもたらす相補性領域を含有する。相補性領域は、G l y - S e r リッチ s c F v リンカー配列をコードする D N A 配列を含む。第三に、セミネステッド P C R は、I l l u m i n a シークエンシングまたは酵母ディスプレイのためのアダプターを付加するために実施される。

【 0 0 2 9 】

【図 3】図 3 は、これらのエピトープピンにおいて選別されるモノクローナル抗体に関する概略図を含む。

【 0 0 3 0 】

【図 4】図 4 は、M C 3 8 腫瘍を保有する h C T L A - 4 K I マウスの組織病理学的染色からのプロットを含む。プロットは、右腎からの H & E 染色、免疫グロブリン (I g) 染色、および C 3 染色のスコアを示す。i p i はイピリムマブであり、C T L A 4 . A 1 4 . 2 a は、マウスの I g G 2 a 骨格上にクローニングされた抗体 A 1 4 である。

【 0 0 3 1 】

【図 5】図 5 は、M C 3 8 腫瘍を保有する処置した h C T L A 4 K I マウスのアルカリホスファターゼレベルを示すプロットを含む。I P I はイピリムマブであり、C T L A 4 . A 1 4 . 2 a はマウスの I g G 2 a 骨格上にクローニングされた抗体 A 1 4 である。U / L は、1 リットル当たりのユニットである。

【 0 0 3 2 】

【図 6】図 6 は、示された処置後の、腫瘍内調節性 T 細胞 (T r e g) 細胞および腫瘍内ナチュラルキラー (N K) 細胞のパーセンテージに関するプロットを含む。

【 0 0 3 3 】

【図 7】図 7 は、示された処置を受けている h C T L A 4 マウスの体重の変化を示すプロットを含む。I p i はイピリムマブであり、C T L A 4 . A 1 4 . 2 a は、マウスの I g

10

20

30

40

50

G 2 a 骨格上にクローニングされた抗体 A 1 4 である。エラーバーは平均 ± 標準誤差を表す。

【 0 0 3 4 】

【図 8】図 8 は、対照、I p i および抗 C T L A 4 処置の影響を示された細胞集団のパーセンテージで示すプロットを含む。I p i はイピリムマブであり、C T L A 4 . A 1 4 . 2 a は、マウスの I g G 2 a 骨格上にクローニングされた抗体 A 1 4 である。

【 0 0 3 5 】

【図 9】図 9 は、対照、I p i および抗 C T L A 4 処置の影響を示された細胞集団のパーセンテージで示すプロットを含む。I p i はイピリムマブであり、C T L A 4 . A 1 4 . 2 a は、マウスの I g G 2 a 骨格上にクローニングされた抗体 A 1 4 である。

10

【 0 0 3 6 】

【図 1 0】図 1 0 は、対照、I p i および抗 C T L A 4 処置の影響を樹状細胞 (D C) および活性化樹状細胞 (C D 8 6 +) のパーセンテージで示すプロットを含む。I p i はイピリムマブであり、C T L A 4 . A 1 4 . 2 a は、マウスの I g G 2 a 骨格上にクローニングされた抗体 A 1 4 である。

【 0 0 3 7 】

【図 1 1】図 1 1 は、0 . 3 m g / k g の示された抗 C T L A 4 で処置した後の平均腫瘍体積を示すプロットを含む。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 8 】

20

7 . 詳細な説明

7 . 1 . 定義

本明細書中で別段の定義がない限り、本開示に関連して使用される科学および専門用語は、当業者により一般に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、単数形の用語は、複数形のものを含むものとし、複数形の用語は、単数形のものを含むものとする。一般に、本明細書に記載の細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、ならびに本明細書に記載の細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションの技術は、当技術分野において周知の、一般に使用されているものである。本開示の方法および技術は、別段の指示がない限り、一般に、当技術分野において周知の従来の方

30

【 0 0 3 9 】

下記の用語は、別段の指示がない限り、下記の意味を有すると解されるものとする：

【 0 0 4 0 】

用語「C T L A - 4」、「C T L A - 4 タンパク質」、および「C T L A - 4 抗原」は、ヒト C T L A - 4、または細胞により天然に発現される、もしくは c t l a 4 遺伝子を

50

トランスフェクトした細胞により発現される、ヒト C T L A - 4 の任意のバリエーション（例えば、スプライスバリエーションおよび対立遺伝子バリエーション）、アイソフォームおよび種ホモログを指すために、本明細書では同義的に使用される。一部の態様では、C T L A - 4 タンパク質は、霊長類（例えば、サルもしくはヒト）、げっ歯類（例えば、マウスもしくはラット）、イヌ、ラクダ、ネコ、ウシ、ヤギ、ウマまたはヒツジにより天然に発現される C T L A - 4 タンパク質である。一部の態様では、C T L A - 4 タンパク質は、ヒト C T L A - 4（h C T L A - 4；配列番号 7 0 0 1）である。

【0041】

用語「免疫グロブリン」は、1 対の軽（L）鎖および 1 対の重（H）鎖である、2 対のポリペプチド鎖を一般に含む、構造的に関連しているタンパク質のクラスを指す。「無傷免疫グロブリン」では、これらの 4 本の鎖全てがジスルフィド結合により相互接続されている。免疫グロブリンの構造は、十分に特徴付けられている。例えば、Paul, Fundamental Immunology 7th ed., Ch. 5 (2013) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA を参照されたい。手短に述べると、各重鎖は、重鎖可変領域（V_H）および重鎖定常領域（C_H）を概して含む。重鎖定常領域は、C_{H1}、C_{H2} および C_{H3} と略記される、3 つのドメインを概して含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（V_L）および軽鎖定常領域を概して含む。軽鎖定常領域は、C_L と略記される、1 つのドメインを概して含む。

【0042】

用語「抗原結合タンパク質」（A B P）は、抗原またはエピトープと特異的に結合する 1 つまたは複数の抗原結合ドメインを含むタンパク質を指す。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、天然に存在する抗体のものと同様の特異性および親和性で抗原またはエピトープに結合する。一部の実施形態では、A B P は、抗体を含む。一部の実施形態では、A B P は、抗体からなる。一部の実施形態では、A B P は、抗体から本質的になる。一部の実施形態では、A B P は、代替足場を含む。一部の実施形態では、A B P は、代替足場からなる。一部の実施形態では、A B P は、代替足場から本質的になる。一部の実施形態では、A B P は、抗体断片を含む。一部の実施形態では、A B P は、抗体断片からなる。一部の実施形態では、A B P は、抗体断片から本質的になる。「C T L A - 4 A B P」、「抗 C T L A - 4 A B P」、または「C T L A - 4 特異的 A B P」は、抗原 C T L A - 4 と特異的に結合する、本明細書で提供されるような、A B P である。一部の実施形態では、A B P は、C T L A - 4 の細胞外ドメインに結合する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される C T L A - 4 A B P は、異なる種からの C T L A - 4 タンパク質間またはそれらの間で保存される、C T L A - 4 のエピトープと結合する。

【0043】

用語「抗体」は、本明細書ではその最も広い意味で使用され、抗原またはエピトープと特異的に結合する 1 つまたは複数の抗原結合ドメインを含むある特定のタイプの免疫グロブリン分子を含む。抗体は、具体的には、無傷抗体（例えば、無傷免疫グロブリン）、抗体断片、および多重特異性抗体を含む。抗原結合ドメインの一例は、V_H-V_L 二量体により形成される抗原結合ドメインである。抗体は、1 つのタイプの A B P である。

【0044】

用語「代替足場」は、抗原またはエピトープと特異的に結合する 1 つまたは複数の抗原結合ドメインを生成するように 1 つまたは複数の領域を多様化することができる分子を指す。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、天然に存在する抗体のものと同様の特異性および親和性で、抗原またはエピトープに結合する。例示的な代替足場としては、フィブロネクチンに由来するもの（例えば、A d n e c t i n s（商標））、 α -サンドイッチに由来するもの（例えば、i M a b）、リボカリンに由来するもの（例えば、A n t i c a l i n s（登録商標））、E E T I - I I / A G R P に由来するもの、B P T I / L A C I - D 1 / I T I - D 2 に由来するもの（例えば、クニツドメイン）、チオレドキシンペプチドアプタマーに由来するもの、プロテイン A に由来するもの（例えば、A f f i b o d y（登録商標））、アンキリンリピートに由来するもの（例えば、D A R P i n

10

20

30

40

50

)、ガンマ - B - クリスタリン/ユビキチンに由来するもの(例えば、アフィリン)、CTL D₃に由来するもの(例えば、テトラネクチン)、フィノマーに由来するもの、および(LDL R - A分子)に由来するもの(例えば、アビマー)が挙げられる。代替足場のさらなる情報は、Binz et al., Nat. Biotechnol., 2005 23:1257-1268; Skerra, Current Opin. in Biotech., 2007 18:295-304; およびSilacci et al., J. Biol. Chem., 2014, 289:14392-14398において提供されており、これらの参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。代替足場は、1つのタイプのA B Pである。

【0045】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原またはエピトープと特異的に結合することができるA B Pの部分の意味する。

10

【0046】

用語「全長抗体」、「無傷抗体」、および「全抗体」は、天然に存在する抗体構造と実質的に同様の構造を有する抗体であって、F c領域を含む重鎖を有する抗体を指すために、本明細書では同義的に使用される。

【0047】

用語「F c領域」は、天然に存在する抗体では、F c受容体とおよび補体系のある特定のタンパク質と相互作用する、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を意味する。様々な免疫グロブリンのF c領域およびそこに含有されているグリコシル化部位の構造は、当技術分野において公知である。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Schroeder and Cavacini, J. Allergy Clin. Immunol., 2010, 125:S41-52を参照されたい。F c領域は、天然に存在するF c領域であってもよく、または本開示の他の箇所に記載されるように改変されたF c領域であってもよい。

20

【0048】

V_HおよびV_L領域は、より保存される領域が散在する、超可変性の領域(「相補性決定領域(CDR)」とも呼ばれる「超可変領域(HVR)」)にさらに細分することができる。より保存される領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。V_HおよびV_L各々は、3つのCDRと4つのFRを一般に含み、これらは次の順序で配置されている(N末端からC末端へ): FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4。CDRは、抗原結合に関与し、抗体の抗原特異性および結合親和性に影響を及ぼす。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991) Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MDを参照されたい。

30

【0049】

いずれの脊椎動物種からの軽鎖も、その定常ドメインの配列に基づいて、カッパ()およびラムダ()と呼ばれる、2つのタイプの一方に指定され得る。

【0050】

いずれの脊椎動物種からの重鎖も、Ig A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg Mという5つの異なるクラス(またはアイソタイプ)のうちの1つに指定され得る。これらのクラスは、それぞれ、 、 、 およびμとも表記される。Ig GおよびIg Aクラスは、配列および機能の違いに基づいてサブクラスにさらに分けられる。ヒトは、次のサブクラスを発現する: Ig G1、Ig G2、Ig G3、Ig G4、Ig A1およびIg A2。

40

【0051】

CDRのアミノ酸配列境界を、当業者は、多数の公知番号付けスキームのいずれかを使用して決定することができ、そのような番号付けスキームには、Kabat et al., 上掲(「K a b a t」番号付けスキーム); Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948(「C h o t h i a」番号付けスキーム); MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745(「C o n t a c t」番号付けスキーム); Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77(「I M G T」番号付けスキーム); およびHonegge and Plueckthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70(「A H

50

o」番号付けスキーム)により記載されたものが含まれ、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0052】

表1は、KabatおよびChothiaスキームにより同定されたCDR1-L(V_L のCDR1)、CDR2-L(V_L のCDR2)、CDR3-L(V_L のCDR3)、CDR1-H(V_H のCDR1)、CDR2-H(V_H のCDR2)およびCDR3-H(V_H のCDR3)の位置を提供するものである。CDR1-Hについては、Kabat番号付けスキームとChothia番号付けスキームの両方を使用して残基番号付けが提供されている。

【0053】

CDRは、例えば、www.bioinf.org.uk/abs/abnum/で入手可能であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Abhinandan and Martin, Immunology, 2008, 45:3832-3839に記載されている、Abnumなどの、抗体番号付けソフトウェアを使用して指定され得る。

【表1】

表1 KabatおよびChothia番号付けスキームによるCDR中の残基		
CDR	Kabat	Chothia
CDR1-L	24-34	24-34
CDR2-L	50-56	50-56
CDR3-L	89-97	89-97
CDR1-H (Kabat番号付け)	31-35B	26-32または34*
CDR1-H (Chothia番号付け)	31-35	26-32
CDR2-H	50-65	52-56
CDR3-H	95-102	95-102

*Kabat番号付け規定を使用して番号付けされたときのCDR1-HのC末端は、CDRの長さに依存して32～34の間で異なる。

【0054】

「EU番号付けスキーム」は、一般に、抗体重鎖定常領域中の残基(例えば、Kabat et al., 上掲で報告されているような)に言及する際に使用される。

【0055】

「抗体断片」は、無傷抗体の一部、例えば、無傷抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片は、例えば、Fv断片、Fab断片、F(ab')₂断片、Fab'断片、scFv(sFv)断片、およびscFv-Fc断片を含む。

【0056】

「Fv」断片は、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの非共有結合で連結された二量体を含む。

【0057】

「Fab」断片は、重鎖および軽鎖可変ドメインに加えて、軽鎖の定常ドメイン、および重鎖の第1の定常ドメイン(C_{H1})を含む。Fab断片は、例えば、組換え法により、または全長抗体のパパイン消化により、調製することができる。

【0058】

「F(ab')₂」断片は、ジスルフィド結合により連結された、ヒンジ領域付近にある、2つのFab'断片を含有する。F(ab')₂断片は、例えば、組換え法により、または無傷抗体のペプシン消化により、調製することができる。F(ab')断片は、例えば、メルカプトエタノールでの処置により、解離させることができる。

【0059】

「単鎖Fv」または「sFv」または「scFv」抗体断片は、単一ポリペプチド鎖内

10

20

30

40

50

に V_H ドメインおよび V_L ドメインを含む。 V_H および V_L は、一般に、ペプチドリinkerにより連結されている。Plueckthun A. (1994)を参照されたい。一部の実施形態では、リンカーは、 $(GGGS)_n$ (配列番号 11968) である。一部の実施形態では、 $n = 1, 2, 3, 4, 5$ または 6 。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Antibodies from Escherichia coli. In Rosenberg M. & Moore G.P. (Eds.), The Pharmacology of Monoclonal Antibodies vol. 113 (pp. 269-315). Springer-Verlag, New Yorkを参照されたい。

【0060】

「ScFv - Fc」断片は、Fcドメインに結合しているscFvを含む。例えば、Fcドメインは、scFvのC末端に結合していることがある。scFv内の可変ドメインの配向に依存する V_H または V_L (すなわち、 $V_H - V_L$ または $V_L - V_H$) の後に、Fcドメインが続くことがある。当技術分野において公知のまたは本明細書に記載の任意の好適なFcドメインを使用することができる。一部の場合には、Fcドメインは、IgG4 Fcドメインを含む。

10

【0061】

用語「単ドメイン抗体」は、抗体の1つの可変ドメインが、他の可変ドメインが存在しない抗原と特異的に結合する、分子を指す。単ドメイン抗体およびその断片は、Arabi Ghahroudi et al., FEBS Letters, 1998, 414:521-526およびMuyldermans et al., Trends in Biochem.Sci., 2001, 26:230-245に記載されており、これらの参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0062】

「単一特異性ABP」は、単一のエピトープと特異的に結合する結合部位を含むABPである。単一特異性ABPの例は、二価だが、各抗原結合ドメインにおける同じエピトープを認識する、天然に存在するIgG分子である。結合特性は、あらゆる好適な結合価で存在し得る。

【0063】

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団からの抗体を指す。実質的に均一な抗体の集団は、モノクローナル抗体の産生中に通常生じ得るバリエーションを除いて、実質的に同様であるおよび同じエピトープに結合する抗体を含む。そのようなバリエーションは、一般に、ほんの少量でのみ存在する。モノクローナル抗体は、概して、複数の抗体からの単一の抗体の選択を含むプロセスにより得られる。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、酵母クローン、細菌クローンまたは他の組換えDNAクロンのプールなどの、複数のクローンからのユニーククロンの選択であり得る。選択された抗体をさらに改造して、例えば、標的に対する親和性を向上させること(「親和性成熟」)、抗体をヒト化すること、細胞培養におけるその産生を改善すること、および/または対象におけるその免疫原性を低下させることができる。

30

【0064】

用語「キメラ抗体」は、重鎖および/または軽鎖の一部分が特定の供給源または種に由来するが、その重鎖および/または軽鎖の残部が異なる供給源または種に由来する、抗体を指す。

40

【0065】

非ヒト抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体に由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。一般に、ヒト化抗体は、1つまたは複数のCDRからの残基が非ヒト抗体(ドナー抗体)の1つまたは複数のCDRからの残基により置換されている、ヒト抗体(レシピエント抗体)である。ドナー抗体は、所望の特異性、親和性または生物学的効果を有するマウス、ラット、ウサギ、ニワトリまたは非ヒト霊長類抗体などの、任意の好適な非ヒト抗体であり得る。一部の事例では、レシピエント抗体の選択されたフレームワーク領域残基は、ドナー抗体からの対応するフレームワーク領域残基により置換されている。ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基も含み得る。そのような改変は、抗体機能をさらに洗練するために行われ得る。さらなる詳細については、Jones et

50

al., Nature, 1986, 321:522-525 ; Riechmann et al., Nature, 1988, 332:323-329 ; および Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992, 2:593-596 を参照されたく、これらの参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 6 】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞により産生される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列、またはヒト抗体レパートリーもしくはヒト抗体をコードしている配列（例えば、ヒト供給源から得られたもしくは新規に設計された）を利用する非ヒト供給源に由来するアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する、抗体である。ヒト抗体は、具体的にはヒト化抗体を含まない。一部の実施形態では、げっ歯動物は、それらのげっ歯動物抗体配列をヒト抗体で置き換えるように遺伝子操作される。

10

【 0 0 6 7 】

「単離された A B P 」または「単離された核酸」は、その天然環境の成分から分離および/または回収された、A B P または核酸である。天然環境の成分は、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性物質を含み得る。一部の実施形態では、単離された A B P は、例えばスピニングカップシークエネーターの使用により、N 末端または内部アミノ酸配列の少なくとも 15 残基を得るために十分な程度に精製される。一部の実施形態では、単離された A B P は、クーマシーブルーまたは銀染色剤による検出を用いる還元または非還元条件下でのゲル電気泳動（例えば、S D S - P A G E ）により、均一になるまで精製される。単離された A B P は、A B P の天然環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないので、組換え細胞内の元位置の (in situ) A B P を含む。一部の態様では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 1 つの精製ステップにより調製される。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 80 重量%、85 重量%、90 重量%、95 重量%または 99 重量%に精製される。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 80 体積%、85 体積%、90 体積%、95 体積%または 99 体積%に精製される。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 85 重量%、90 重量%、95 重量%、98 重量%、99 重量% ~ 100 重量% A B P または核酸を含む溶液として提供される。一部の実施形態では、単離された A B P または単離された核酸は、少なくとも 85 体積%、90 体積%、95 体積%、98 体積%、99 体積% ~ 100 体積% A B P または核酸を含む溶液として提供される。

20

30

【 0 0 6 8 】

「親和性」は、分子（例えば、A B P ）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原またはエピトープ）との非共有結合性相互作用の総計の強度を指す。別段の指示がない限り、本明細書で使用される場合、「親和性」は、結合対のメンバー（例えば、A B P および抗原またはエピトープ）間の 1 : 1 相互作用を表す、固有の結合親和性を指す。分子 X のそのパートナー Y に対する親和性を、解離平衡定数 (K_D) により表すことができる。解離平衡定数に寄与する動態成分は、より詳細に下記で説明される。親和性は、本明細書に記載のものを含む、当技術分野で公知の一般的な方法により測定することができる。例えば、表面プラズモン共鳴 (S P R) 技術（例えば、B I A C O R E (登録商標)) またはバイオレイヤー干渉法（例えば、F O R T E B I O (登録商標)) を使用して、親和性を決定することができる。

40

【 0 0 6 9 】

標的分子との A B P の結合に関して、特定の抗原（例えば、ポリペプチド標的）または特定の抗原上のエピトープ「に結合する」、「に特異的に結合すること」、「と特異的に結合する」、「に対して特異的」、「に選択的に結合する」、および「に対して選択的」という用語は、非特異的または非選択的相互作用（例えば、非標的分子との）とは明らかに異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、標的分子との結合を測定し、それを非標的分子との結合と比較することにより、測定することができる。特異的結合は、標的分子上の認識されるエピトープを模倣する対照分子との競合により判定することもできる。その場合、特異的結合は、A B P の標的分子との結合が対照分子により競合的に阻害され

50

る場合に示される。一部の態様では、C T L A - 4 A B P の非標的分子に対する親和性は、C T L A - 4 に対する親和性の約 5 0 % 未満である。一部の態様では、C T L A - 4 A B P の非標的分子に対する親和性は、C T L A - 4 に対する親和性の約 4 0 % 未満である。一部の態様では、C T L A - 4 A B P の非標的分子に対する親和性は、C T L A - 4 に対する親和性の約 3 0 % 未満である。一部の態様では、C T L A - 4 A B P の非標的分子に対する親和性は、C T L A - 4 に対する親和性の約 2 0 % 未満である。一部の態様では、C T L A - 4 A B P の非標的分子に対する親和性は、C T L A - 4 に対する親和性の約 1 0 % 未満である。一部の態様では、C T L A - 4 A B P の非標的分子に対する親和性は、C T L A - 4 に対する親和性の約 1 % 未満である。一部の態様では、C T L A - 4 A B P の非標的分子に対する親和性は、C T L A - 4 に対する親和性の約 0 . 1 % 未満である。

10

【 0 0 7 0 】

用語「 k_d 」(秒^{-1})は、本明細書で使用される場合、特定の A B P - 抗原相互作用の解離速度定数を指す。この値は、 k_{off} 値とも呼ばれる。

【 0 0 7 1 】

用語「 k_a 」($M^{-1} \times \text{秒}^{-1}$)は、本明細書で使用される場合、特定の A B P - 抗原相互作用の会合速度定数を指す。この値は、 k_{on} 値とも呼ばれる。

【 0 0 7 2 】

用語「 K_D 」(M)は、本明細書で使用される場合、特定の A B P - 抗原相互作用の解離平衡定数を指す。 $K_D = k_d / k_a$ 。

20

【 0 0 7 3 】

用語「 K_A 」(M^{-1})は、本明細書で使用される場合、特定の A B P - 抗原相互作用の会合平衡定数を指す。 $K_A = k_a / k_d$ 。

【 0 0 7 4 】

「親和性成熟した」A B P は、変更（複数可）を有さない親 A B P と比較して、A B P のその抗原に対する親和性の改善をもたらす、1 つまたは複数の変更（例えば、1 つまたは複数の C D R または F R における）を有する A B P である。一実施形態では、親和性成熟した A B P は、標的抗原に対してナノモル濃度またはピコモル濃度の親和性を有する。親和性成熟した A B P は、当技術分野において公知の様々な方法を使用して産生され得る。例えば、Marks et al. (その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Bio/Technology, 1992, 10:779-783) は、 V_H ドメインと V_L ドメインのシャフリングによる親和性成熟を記載している。C D R および / またはフレームワーク残基のランダム変異誘発は、例えば、Barbas et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91:3809-3813)、Schier et al., Gene, 1995, 169:147-155; Yelton et al., J. Immunol., 1995, 155:1994-2004、Jackson et al., J. Immunol., 1995, 154:3310-3319、および Hawkins et al., J. Mol. Biol., 1992, 226:889-896 により記載されており、これらの参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 0 0 7 5 】

「イムノコンジュゲート」は、1 つまたは複数の異種分子とコンジュゲートしている A B P である。

40

【 0 0 7 6 】

「エフェクター機能」は、抗体の F c 領域により媒介される生物活性を指し、これらの活性は、抗体アイソタイプによって異なり得る。抗体エフェクター機能の例としては、補体依存性細胞傷害 (C D C) を活性化するための C 1 q 結合、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) および抗体依存性細胞ファゴサイトーシス (A D C P) を活性化するための F c 受容体結合が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

2 つまたはそれより多くの A B P に関連して本明細書で使用される場合、「と競合する」または「と交差競合する」という用語は、2 つまたはそれより多くの A B P が、抗原（例えば、C T L A - 4）との結合について競合することを示す。1 つの例示的アッセイで

50

は、C T L A - 4 で表面を被覆し、それを第 1 の C T L A - 4 A B P と接触させ、その後、第 2 の C T L A - 4 A B P を添加する。別の例示的アッセイでは、第 1 の C T L A - 4 A B P で表面を被覆し、それを C T L A - 4 と接触させ、次いで、第 2 の C T L A - 4 A B P を添加する。第 1 の C T L A - 4 A B P の存在が、どちらかのアッセイにおいて第 2 の C T L A - 4 A B P の結合を低減させる場合には、これらの A B P は競合する。「と競合する」という用語は、1 つの A B P が別の A B P の結合を低減させるが、逆の順序で A B P が添加されたときには競合が観察されない、A B P の組合せも含む。しかし、一部の実施形態では、第 1 および第 2 の A B P は、それらが添加される順序に関係なく、互いの結合を阻害する。一部の実施形態では、1 つの A B P は、別の A B P のその抗原への結合を少なくとも 25 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % 低減させる。当業者は、競合アッセイで使用される抗体の濃度を C T L A - 4 に対する A B P の親和性および A B P の結合価に基づいて選択することができる。この定義に記載のアッセイは、説明のためのものであり、当業者は、任意の好適なアッセイを利用して、抗体が互いに競合するかどうかを判定することができる。好適なアッセイは、Cox et al., "Immunoassay Methods," in Assay Guidance Manual [Internet], Updated December 24, 2014 (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/; accessed September 29, 2015); Silman et al., Cytometry, 2001, 44:30-37; および Finco et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 54:351-358 に記載されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0078】

用語「エピトープ」は、A B P と特異的に結合する抗原の部分を意味する。エピトープは、多くの場合、表面露出アミノ酸残基および/または糖側鎖からなり、特異的三次元構造特性はもちろん特異的電荷特性も有し得る。立体構造エピトープと非立体構造エピトープは、前者の立体構造エピトープとの結合が変性溶媒の存在下で失われることがあるが、後者の非立体構造エピトープとの結合がそうではないことで、区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基と、結合に直接関与しない他のアミノ酸残基とを含み得る。A B P が結合するエピトープは、例えば、異なる点変異を有する C T L A - 4 バリエーションとのまたはキメラ C T L A - 4 バリエーションとの A B P 結合の試験などの、公知のエピトープ決定技術を使用して、決定することができる。

【0079】

ポリペプチド配列と参照配列との「同一性」パーセントは、配列をアラインさせ、最大配列同一性パーセントを達成するために必要に応じてギャップを導入した後、参照配列中のアミノ酸残基と同一であるポリペプチド配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当技術分野における技能の範囲内である様々な方法で、例えば、B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N、M E G A L I G N (D N A S T A R)、C L U S T A L W、C L U S T A L O M E G A または M U S C L E ソフトウェアなどの公開されているコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインさせるための適切なパラメーターを決定することができる。

【0080】

「保存的置換」または「保存的アミノ酸置換」は、あるアミノ酸の化学的にまたは機能的に類似したアミノ酸での置換を指す。類似したアミノ酸をもたらす保存的置換表は、当技術分野において周知である。例として、表 2 ~ 4 で提供されるアミノ酸の群は、一部の実施形態では、互いに保存的置換とみなされる。

10

20

30

40

【表 2】

表2:ある特定の実施形態での互いに保存的置換とみなされるアミノ酸の選択群。	
酸性残基	DおよびE
塩基性残基	K、R、およびH
親水性非荷電残基	S、T、N、およびQ
脂肪族非荷電残基	G、A、V、L、およびI
非極性非荷電残基	C、M、およびP
芳香族残基	F、Y、およびW

10

【表 3】

表3:ある特定の実施形態での互いに保存的置換とみなされるアミノ酸の追加の選択群。	
第1群	A、S、およびT
第2群	DおよびE
第3群	NおよびQ
第4群	RおよびK
第5群	I、L、およびM
第6群	F、Y、およびW

20

【表 4】

表4:ある特定の実施形態での互いに保存的置換とみなされるアミノ酸のさらなる選択群。	
A群	AおよびG
B群	DおよびE
C群	NおよびQ
D群	R、K、およびH
E群	I、L、M、V
F群	F、Y、およびW
G群	SおよびT
H群	CおよびM

30

【0081】

追加の保存的置換は、例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties 2nd ed. (1993) W. H. Freeman & Co., New York, NYにおいて見出すことができる。親 A B P 中のアミノ酸残基の1つまたは複数の保存的置換を行うことにより生成される A B P は、「保存的に改変されたバリエーション」と呼ばれる。

【0082】

用語「処置すること」（およびその変形形態、例えば「処置する」または「処置」）は、それを必要とする対象における疾患または状態の自然な経過を変更する目的での臨床的介入を指す。処置は、発病予防のために行われることもあり、臨床病理学的検査の過程で行われることもある。処置の望ましい効果としては、疾患の発生もしくは再発を防止すること、症状を軽減すること、疾患の任意の直接的もしくは間接的病理学的帰結を和らげること、転移を防止すること、疾患進行速度を低下させること、病状を改善または緩和すること、および寛解、または予後改善が挙げられる。

40

【0083】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」または「有効量」という用語は、対象に投与されたときに疾患または障害を処置するのに有効である、本明細書で提供される A B P または医薬組成物の量を指す。

【0084】

50

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、哺乳動物対象を意味する。例示的な対象としては、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ラクダ、ヤギ、ウサギおよびヒツジが挙げられる。ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。一部の実施形態では、対象は、本明細書で提供されるＡＢＰで処置することができる疾患または状態を有する。一部の態様では、疾患または状態は、がんである。一部の態様では、疾患または状態は、ウイルス感染症である。

【００８５】

用語「添付文書」は、治療用または診断用製品（例えば、キット）の市販のパッケージ内に通例含まれている指示であって、そのような治療用または診断用製品の使用に関する適応症、使用法、投与量、投与、併用療法、禁忌および／または警告についての情報を含む指示を指すために使用される。

10

【００８６】

用語「細胞傷害剤」は、本明細書で使用される場合、細胞の機能を阻害もしくは防止するおよび／または細胞死もしくは破壊を引き起こす物質を指す。

【００８７】

「化学療法剤」は、がんの処置に有用な化学化合物を指す。化学療法剤は、がんの成長を促進することができるホルモンの効果を調節、低下、遮断または阻害するように作用する、「抗ホルモン剤」または「内分泌療法薬」を含む。

【００８８】

用語「細胞増殖抑制剤」は、*in vitro*または*in vivo*のどちらかで細胞の成長を抑止する、化合物または組成物を指す。一部の実施形態では、細胞増殖抑制剤は、Ｓ期の細胞のパーセンテージを低下させる薬剤である。一部の実施形態では、細胞増殖抑制剤は、Ｓ期の細胞のパーセンテージを少なくとも約２０％、少なくとも約４０％、少なくとも約６０％、または少なくとも約８０％低下させる。

20

【００８９】

用語「腫瘍」は、あらゆる新生物細胞成長および増殖を悪性であるか良性であるかを問わずに指し、ならびにあらゆる前がん性およびがん性細胞および組織を指す。用語「がん」、「がん性の」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、および「腫瘍」は、本明細書で言及される場合、相互排他的ではない。用語「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」は、ある程度の異常細胞増殖を伴う障害を指す。一部の実施形態では、細胞増殖性障害は、がんである。

30

【００９０】

用語「医薬組成物」は、含有する活性成分の生物活性が対象の処置に有効であることを可能にするような形態である調製物であって、対象にとって許容できないほど毒性である追加の成分を含有しない調製物を指す。

【００９１】

用語「モジュレートする」および「モジュレーション」は、述べられている可変要素（*elicited variable*）を低減させることもしくは阻害することまたは、代替的に、活性化することもしくは増加させることを指す。

【００９２】

用語「増加させる」および「活性化する」は、述べられている可変要素の１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍またはそれより大きな増加を指す。

40

【００９３】

用語「低下させる」および「阻害する」は、述べられている可変要素の１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％の、２分の１、３分の１、４分の１、５分の１、１０分の１、２０分の１、５０分の１、１００分の１への、またはそれより大きな減少を指す。

【００９４】

50

用語「刺激する (agonize)」は、受容体の活性化に関連する生物学的応答を誘導するための受容体シグナル伝達の活性化を指す。「アゴニスト」は、受容体と結合してそれを刺激する実体である。

【0095】

用語「拮抗する」は、受容体の活性化に関連する生物学的応答を阻害するための受容体シグナル伝達の阻害を指す。「アンタゴニスト」は、受容体と結合してそれに拮抗する実体である。

【0096】

用語「エフェクターT細胞」は、ヘルパーT (すなわち、 $CD4^+$) 細胞、および細胞傷害性 (すなわち、 $CD8^+$) T細胞を含む。 $CD4^+$ エフェクターT細胞は、B細胞の形質細胞およびメモリーB細胞への成熟、ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む、いくつかの免疫学的プロセスの進展に寄与する。 $CD8^+$ エフェクターT細胞は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊する。エフェクターT細胞に関するさらなる情報については、その全体が参照により本明細書に組み込まれるSeder and Ahmed, Nature Immunol., 2003, 4:835-842を参照されたい。

10

【0097】

用語「調節性T細胞」は、例えばエフェクターT細胞を抑制することにより、免疫学的寛容を調節する細胞を含む。一部の態様では、調節性T細胞は、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 表現型を有する。一部の態様では、調節性T細胞は、 $CD8^+CD25^+$ 表現型を有する。調節性T細胞に関するさらなる情報については、その全体が参照により本明細書に組み込まれるNocentini et al., Br. J. Pharmacol., 2012, 165:2089-2099を参照されたい。

20

【0098】

用語「樹状細胞」は、ナイーブT細胞を活性化することができ、B細胞の成長および分化を刺激することができる、プロフェッショナル抗原提示細胞を指す。

【0099】

ポリペプチド (例えば、抗体) の「バリエーション」は、天然ポリペプチド配列と比べて1つまたは複数のアミノ酸残基がアミノ酸配列に挿入されている、アミノ酸配列から欠失している、および/またはアミノ酸配列に置換されている、アミノ酸配列を含み、天然ポリペプチドと本質的に同じ生物活性を保持する。ポリペプチドの生物活性は、当技術分野における標準的技術を使用して測定することができる (例えば、バリエーションが抗体である場合、その活性を本明細書に記載の結合アッセイにより試験することができる)。本開示のバリエーションは、断片、アナログ、組換えポリペプチド、合成ポリペプチド、および/または融合タンパク質を含む。

30

【0100】

ポリペプチドの「誘導体」は、例えば、別の化学的部分、例えばポリエチレングリコール、アルブミン (例えば、ヒト血清アルブミン) など、とのコンジュゲーション、リン酸化、およびグリコシル化によって、化学的に改変されているポリペプチド (例えば、抗体) である。別段の指示がない限り、用語「抗体」は、2本の全長重鎖と2本の全長軽鎖とを含む抗体に加えて、その誘導体、バリエーション、断片およびムテインを含み、これらの例は、下に記載される。

40

【0101】

ヌクレオチド配列は、調節配列がヌクレオチド配列の発現 (例えば、発現のレベル、タイミングまたは位置) に影響を与える場合、調節配列に「作動可能に連結」されている。「調節配列」は、それが作動可能に連結されている核酸の発現 (例えば、発現のレベル、タイミングまたは位置) に影響を与える、核酸である。調節配列は、例えば、調節される核酸に直接その効果を発揮することができ、または1つもしくは複数の分子 (例えば、調節配列および/もしくは核酸と結合するポリペプチド) の作用によってその効果を発揮することができる。調節配列の例としては、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント (例えば、ポリアデニル化シグナル) が挙げられる。調節配列のさらなる例

50

は、例えば、Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CAおよびBaron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06に記載されている。

【0102】

「宿主細胞」は、核酸、例えば本開示の核酸を発現させるために使用することができる細胞である。宿主細胞は、原核生物、例えば、*E. coli*であってもよく、または真核生物、例えば、単細胞真核生物（例えば、酵母もしくは他の真菌）、植物細胞（例えば、タバコもしくはトマト植物細胞）、動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、もしくは昆虫細胞）もしくはハイブリドーマであってもよい。宿主細胞の例としては、CS-9細胞、サル腎細胞のCOS-7系(ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175を参照されたい)、L細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞もしくはそれらの誘導株、例えば、無血清培地で成長するVeggie CHOおよび関連細胞系(Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31を参照されたい)、HeLa細胞、BHK(ATCC CRL 10)細胞系、アフリカミドリザル腎細胞系CV1に由来するCV1/EBNA細胞系(ATCC CCL 70) (Mc Mahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821を参照されたい)、ヒト胎児由来腎細胞、例えば、293、293 EBNAもしくはMSR 293、ヒト上皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換霊長類細胞系、正常二倍体細胞、初代組織、初代外植片の*in vitro*培養から得られる細胞株、HL-60、U937、HakまたはJurkat細胞が挙げられる。典型的には、宿主細胞は、ポリペプチドをコードする核酸で形質転換することができるまたはそのような核酸をトランスフェクトすることができる培養細胞であり、したがって、そのような核酸は、宿主細胞において発現され得る。

【0103】

句「組換え宿主細胞」は、発現させるべき核酸で形質転換されたまたはそのような核酸がトランスフェクトされた宿主細胞を示すために使用され得る。宿主細胞は、核酸を含むが、調節配列が宿主細胞に導入され、その結果、調節配列が核酸と作動可能に連結されない限り、その核酸を所望のレベルで発現しない細胞でもあり得る。用語宿主細胞が特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことは、理解されよう。例えば変異または環境の影響によって、ある特定の改変が後の世代で生じる可能性があるため、そのような子孫は、実際には親細胞と同一でない可能性があるが、それでもやはり、本明細書で使用されるこの用語の範囲内に含まれる。

7.2. 他の解釈規定

【0104】

本明細書で述べられている範囲は、述べられているエンドポイントを含む、範囲内の値の全てについての簡略表記であると解される。例えば、1~50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50からなる群からの任意の数、数の組合せまたは部分的範囲を含むと解される。

【0105】

別段の指示がない限り、1つまたは複数の立体中心を有する化合物への言及は、その化合物の各々の立体異性体、およびその化合物の立体異性体の全ての組合せを意図している。

7.3. 核酸

【0106】

一態様において、本開示は、単離された核酸分子を提供する。核酸は、例えば、抗原結合タンパク質の全てまたは一部、例えば、本開示の抗体の一方もしくは両方の鎖、またはその断片、誘導體、ムテインもしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチド；ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定、分析、変異または増幅するためのハイブリ

ダイゼーションプローブ、PCRプライマーまたはシーケンシングプライマーとしての使用に十分なポリヌクレオチド；ポリヌクレオチドの発現を阻害するためのアンチセンス核酸；および前述のものの相補配列を含む。核酸は、いずれの長さであってもよい。核酸は、例えば、長さ5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1,000、1,500、3,000、5,000ヌクレオチドもしくはそれを超える長さであってもよく、および/または1つもしくは複数の追加の配列、例えば調節配列を含むこともあり、および/またはより大きい核酸、例えばベクター、の一部であってもよい。核酸は、一本鎖状または二本鎖状であり得、RNAおよび/もしくはDNAヌクレオチド、ならびにそれらの人工バリエーション（例えば、ペプチド核酸）を含むこともある。

10

【0107】

抗体ポリペプチド（例えば、重鎖もしくは軽鎖、可変ドメインのみ、もしくは全長）をコードする核酸は、CTLA-4で免疫したマウスのB細胞から単離することができる。核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの従来の手順により単離することができる。

【0108】

重鎖および軽鎖可変領域の可変領域をコードする核酸配列が本明細書で示される。遺伝コードの縮重に起因して、本明細書で開示されるポリペプチド配列の各々が、多数の他の核酸配列によりコードされることは、当業者には理解される。本開示は、本開示の各々の抗原結合タンパク質をコードする各々の縮重ヌクレオチド配列を提供する。

20

【0109】

本開示は、特定のハイブリダイゼーション条件下で他の核酸（例えば、CTLA-4遺伝子のいずれかについてのヌクレオチド配列を含む核酸）とハイブリダイズする核酸をさらに提供する。核酸をハイブリダイズさせる方法は、当技術分野において周知である。例えば、Curr. Prot. in Mol. Biol., John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6を参照されたい。本明細書で定義される場合、中等度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）、0.5% SDS、1.0 mM EDTA（pH 8.0）を含有する、予洗溶液；約50%ホルムアミド、6×SSCのハイブリダイゼーションバッファー、および55のハイブリダイゼーション温度（または他の同様のハイブリダイゼーション溶液、例えば約50%ホルムアミドを含有するもの、と42のハイブリダイゼーション温度）；ならびに0.5×SSC、0.1% SDS中、60の洗浄条件を使用する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、6×SSC中、45でハイブリダイズし、その後、0.1×SSC、0.2% SDS中、68で1回または複数回洗浄する。さらに、当業者は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増加または減少させるように、その結果、互いと少なくとも65、70、75、80、85、90、95、98または99%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸が、概して、互いにハイブリダイズした状態を維持するように、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件を操作することができる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本パラメーター、および好適な条件を考案するためのガイダンスは、例えば、Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; および Curr. Prot. in Mol. Biol. 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4)により示されており、これらのことを、当業者は、例えばDNAの長さおよび/または塩基組成に基づいて容易に決定することができる。

30

40

【0110】

変異により核酸に変化を導入し、それによって、核酸がコードするポリペプチド（例えば、抗原結合タンパク質）のアミノ酸配列の変化をもたらすことができる。当技術分野において公知の任意の技術を使用して変異を導入することができる。一実施形態では、例えば部位特異的変異誘発プロトコールを使用して、1つまたは複数の特定のアミノ酸残基を

50

変化させる。別の実施形態では、例えばランダム変異誘発プロトコルを使用して、1つまたは複数のランダムに選択された残基を変化させる。どのように行ったとしても、変異体ポリペプチドを発現させ、所望の特性（例えば、C T L A - 4 との結合）についてスクリーニングすることができる。

【0111】

変異を、核酸に、核酸がコードするポリペプチドの生物活性を有意に変えることなく導入することができる。例えば、非必須アミノ酸残基に対するアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換を行うことができる。一実施形態では、C T L A - 4 またはその所望の断片、バリエーションもしくは誘導体について本明細書で提供されるヌクレオチド配列を、C T L A - 4 について2つまたはそれより多くの配列が異なる残基であることが本明細書で示されるアミノ酸残基の1つまたは複数の欠失または置換を含むアミノ酸配列をコードするように、変異させる。あるいは、核酸がコードするポリペプチドの生物活性（例えば、C T L A - 4 の結合）を選択的に変化させる1つまたは複数の変異を、核酸に導入することができる。例えば、変異は、生物活性を量的にまたは質的に変化させることができる。量的変化の例としては、活性の増加、低減または消失が挙げられる。質的变化の例としては、抗原結合タンパク質の抗原特異性の変化が挙げられる。

10

【0112】

別の態様では、本開示は、本開示の核酸配列の検出のためのプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとしての使用に好適である核酸分子を提供する。本開示の核酸分子は、本開示の全長ポリペプチドをコードする核酸配列の一部分、例えば、プローブもしくはプライマーとして使用することができる断片、または本開示のポリペプチドの活性部分（例えば、C T L A - 4 結合部分）をコードする断片のみを含むこともある。

20

【0113】

本開示の核酸の配列に基づくプローブを使用して、本開示のポリペプチドをコードする核酸または類似の核酸、例えば転写物を検出することができる。プローブは、標識基、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子を含むことができる。そのようなプローブを使用して、ポリペプチドを発現する細胞を同定することができる。

7. 4. 発現ベクター

【0114】

本開示は、本開示のポリペプチドまたはその一部分をコードする核酸を含むベクターを提供する。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター、非エピソード哺乳動物ベクター、および発現ベクター、例えば組換え発現ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0115】

本開示の別の態様では、本開示の核酸分子およびポリヌクレオチドを含有する発現ベクターも提供され、そのようなベクターで形質転換された宿主細胞、およびポリペプチドを産生する方法も提供される。用語「発現ベクター」は、ポリヌクレオチド配列からポリペプチドを発現させるためのプラスミド、ファージ、ウイルスまたはベクターを指す。ポリペプチドの発現のためのベクターは、ベクター伝播（vector propagation）のためにおよびクロニングされた挿入断片の発現のために必要な配列を最小限で含有する。発現ベクターは、（1）遺伝子発現において調節的役割を果たす遺伝子エレメント（単数または複数）、例えば、プロモーターまたはエンハンサーと、（2）mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される、ポリペプチドおよびタンパク質をコードする配列と、（3）適切な転写開始および終結配列との集合体を含む、転写単位を含む。これらの配列は、選択マーカーをさらに含むこともある。宿主細胞における発現に好適なベクターは、容易に入手可能であり、核酸分子は、標準的な組換えDNA技術を使用してベクターに挿入される。そのようなベクターは、特定の組織において機能するプロモーター、および標的ヒトまたは動物細胞におけるポリペプチドの発現のためのウイルスベクターを含むことができる。

40

【0116】

本開示の組換え発現ベクターは、本開示の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に好適

50

な形態で含むことができる。組換え発現ベクターは、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択される1つまたは複数の調節配列であって、発現される核酸配列に作動可能に連結されている配列を含む。調節配列は、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指令するもの（例えば、SV40初期遺伝子エンハンサー、ラウス肉腫ウイルスプロモーターおよびサイトメガロウイルスプロモーター）、ある特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指令するもの（例えば、組織特異的調節配列、Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287、Maniatis et al., 1987, Science 236:1237を参照されたい）、および特定の処置または状態に応答してヌクレオチド配列の誘導性発現を指令するもの（例えば、哺乳動物細胞におけるメタロチオンイン（metallothionin）プロモーター、ならびに真核細胞系と原核細胞系の両方におけるtet応答性および/もしくはストレプトマイシン応答性プロモーター（同文献を参照されたい）を含む。発現ベクターの設計が、形質転換すべき宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現レベルなどのような因子に依存し得ることは、当業者には理解される。本開示の発現ベクターを宿主細胞に導入して、それによって、本明細書に記載の核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド、例えば融合タンパク質またはペプチドなど、を産生することができる。

【0117】

一部の実施形態では、発現ベクターは、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTLA-4結合クローンのライブラリーのクローンのうちの1つから精製された発現ベクターである。一部の実施形態では、発現ベクターは、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTLA-4結合クローンのライブラリーから精製されたクローンのうちの1つにおける発現ベクターの1つの遺伝子改変により生成される。一部の実施形態では、発現ベクターは、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTLA-4結合クローンのライブラリーのクローンのうちの1つについての重鎖および軽鎖の変領域配列を使用することにより生成される。

【0118】

本開示は、ポリペプチドを作製する方法をさらに提供する。様々な他の発現/宿主系を利用することができる。ベクターDNAを従来の形質転換またはトランスフェクション技術によって原核細胞または真核細胞系に導入することができる。これらの系としては、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、E. coli）などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）がトランスフェクトされたもしくは細菌発現ベクター（TiもしくはpBR322プラスミド）で形質転換された植物細胞系；または動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。組換えタンパク質産生に有用な哺乳動物細胞としては、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系、もしくはそれらの派生株、例えば、Veggie CHO、および無血清培地で成長する関連細胞系（Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31を参照されたい）またはDHFRが欠損しているCHO株DX-B11（Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20を参照されたい）、COS細胞、例えばサル腎細胞のCOS-7系（ATCC CRL 1651）（Gluzman et al., 1981, Cell 23:175を参照されたい）、W138、BHK、HepG2、3T3（ATCC CCL 163）、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、L細胞、C127細胞、BHK（ATCC CRL 10）細胞系、アフリカミドリザル腎細胞系CV1に由来するCV1/EBNA細胞系（ATCC CCL 70）（McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821を参照されたい）、ヒト胎児由来腎細胞、例えば、293、293 EBNAもしくはMSR 293、ヒト上皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換霊長類細胞系、正常二倍体細胞、初代組織、初代外植片のin vitro培養から得られる細胞株、HL-60、U937、HakまたはJurkat細胞が挙げられるが、これらに限

10

20

30

40

50

定されない。哺乳動物発現は、分泌または可溶性ポリペプチドの産生を可能にし、これらのポリペプチドを成長培地から回収することができる。

【0119】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術次第で、ほんの一部の細胞のみが、外来DNAをそれらのゲノムに取り入れることができることは、公知である。これらの組込み体を同定および選択するために、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質に対する耐性について）をコードする遺伝子が、一般に、目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。所望の発現カセットばかりでなく選択可能なマーカーも含有するベクターでそのような細胞を形質転換すると、これらの細胞を、強化培地において、例えば、強化培地を選択培地に切り替える前に、成長させることができる。選択可能なマーカーは、導入された配列を首尾よく発現する細胞の成長および回収を可能にするように設計される。安定に形質転換された細胞の耐性凝集塊（resistant clump）を、利用する細胞系に適している組織培養技術を使用して増殖させることができる。組換えタンパク質の発現についての概要は、Methods of Enzymology, v. 185, Goeddel, D.V., ed., Academic Press (1990)において見出すことができる。好ましい選択可能なマーカーとしては、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートなどの、薬物に対する耐性を付与するものが挙げられる。導入された核酸が安定にトランスフェクトされた細胞は、数ある中でも特に、薬物選択（例えば、選択可能なマーカー遺伝子が組み込まれた細胞は生き残るが、他の細胞は死滅する）により同定することができる。

【0120】

形質転換細胞を、ポリペプチドの発現を促進する条件下で培養し、ポリペプチドを従来のタンパク質精製手順（上記で定義した通り）により回収することができる。1つのそのような精製手順は、例えば、CTLA-4の全てまたは一部分（例えば、細胞外ドメイン）が結合したマトリックスを用いる、親和性クロマトグラフィーの使用を含む。本明細書における使用が企図されるポリペプチドは、内因性夾雑物質が実質的にない、実質的に均一な組換え哺乳動物抗CTLA-4抗体ポリペプチドを含む。

【0121】

一部の場合、例えば、原核細胞系を使用する発現の場合には、本開示の発現されるポリペプチドを、生物活性になるように、「再び折り畳み」、酸化して適切な三次元構造にし、ジスルフィド結合を生成する必要がある。再折り畳みは、当技術分野において周知の多数の手順を使用して果たすことができる。そのような方法は、例えば、可溶化されたポリペプチドを、カオトロピック剤の存在下で、通常は7より高いpHに曝露することを含む。カオトロープの選択は、封入体可溶化に使用される選択と同様であるが、カオトロープは、より低い濃度で概して使用される。例示的なカオトロピック剤は、グアニジンおよび尿素である。ほとんどの場合、再折り畳み/酸化溶液は、システイン架橋の形成のためにジスルフィドシャフリングが起こることを可能にする特定のレドックス電位を生じさせるために、還元剤とその酸化形態も特定の比率で含有する。一般に使用される一部のレドックス対としては、システイン/シスタミン、グルタチオン/ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオトレイトールDTT/ジチアンDTT、および2-メルカプトエタノール（bME）/ジチオ-bMEが挙げられる。多くの事例では、再折り畳みの効率を上昇させるために共溶媒が使用され得る。一般に使用される共溶媒としては、グリセロール、様々な分子量のポリエチレングリコール、およびアルギニンが挙げられる。

【0122】

加えて、従来の技術に従って溶液中または固体支持体上でポリペプチドを合成することができる。様々な自動合成装置が市販されており、公知のプロトコールに従ってそれらを使用することができる。例えば、Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d.Ed., Pierce Chemical Co. (1984); Tam et al., J Am Chem Soc, 105:6442, (1983); Merrifield, Science 232:341-347 (1986); Barany and Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press,

10

20

30

40

50

New York, 1-284 ; Barany et al., Int J Pep Protein Res, 30:705-739 (1987)を参照されたい。

【 0 1 2 3 】

本開示のポリペプチドおよびタンパク質は、当業者に周知のタンパク質生成技術に従って精製することができる。これらの技術は、あるレベルでの、タンパク質性および非タンパク質性画分の粗分画を含む。ペプチドポリペプチドを他のタンパク質から分離した後、クロマトグラフィーおよび電気泳動技術を使用して目的のペプチドまたはポリペプチドをさらに精製して、部分的精製または完全精製（または均一に至る精製）を達成することができる。用語「精製されたポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、他の成分から単離可能な組成物であって、ポリペプチドがその天然に得ることができる状態と比較して任意の程度に精製されている組成物を指すように意図されている。したがって、精製されたポリペプチドは、それが天然に存在する環境から分離されているポリペプチドも指す。一般に、「精製された」は、分画に供されて様々な他の成分が除去されたポリペプチド組成物であって、その発現された生物活性を実質的に保持する組成物を指す。用語「実質的に精製された」が使用される場合、この表記は、ポリペプチドまたはペプチドが、組成物の主要成分を形成する、例えば、組成物中のタンパク質の約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、約 85 %、約 90 % またはそれより多くを構成する、ペプチドまたはポリペプチド組成物を指す。

10

【 0 1 2 4 】

精製における使用に好適な様々な技術が当業者には周知である。これらの技術は、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体（免疫沈降法）などでのまたは熱変性による沈殿、その後の遠心分離；クロマトグラフィー、例えば、親和性クロマトグラフィー（プロテインAカラム）、イオン交換、ゲル濾過、逆相、ヒドロキシルアパタイト、疎水性相互作用クロマトグラフィー、等電点電気泳動、ゲル電気泳動、ならびにこれらの技術の組合せを含む。当技術分野において一般に公知であるように、様々な精製ステップを行う順序を変えてもよく、またはある特定のステップを省いてもよく、それでもなお、実質的に精製されたポリペプチドの調製に好適な方法をもたらす可能性があると考えられる。例示的な精製ステップは、下記の実施例で提供される。

20

【 0 1 2 5 】

ポリペプチドの精製度を定量するための様々な方法は、本開示に鑑みれば当業者には公知である。これらの方法は、例えば、活性画分の比結合活性を決定すること、またはSDS/PAGE分析により画分中のペプチドまたはポリペプチドの量を評価することを含む。ポリペプチド画分の純度の好ましい評価方法は、画分の結合活性を計算すること、それを最初の抽出物の結合活性と比較すること、およびひいては、本明細書では「精製倍数」により評価される精製度を計算することである。結合活性の量を表すために使用される実際の単位は、精製を追跡するために選択される特定のアッセイ技術、およびポリペプチドまたはペプチドが検出可能な結合活性を示すか否かに、もちろん、依存する。

30

7.5. 抗体

【 0 1 2 6 】

CTL A - 4 抗体は、ヘパリンHPカラムを使用し、塩勾配を使用する、宿主細胞培養流体の濾過上清の溶出によって、抗体をコードする遺伝子がトランスフェクトされた宿主細胞から精製することができる。

40

【 0 1 2 7 】

Fab断片は、V_L、V_H、C_LおよびC_{H1}ドメインを有する、一価断片であり；F(ab')₂断片は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を有する二価断片であり；Fd断片は、V_HおよびC_{H1}ドメインを有し；Fv断片は、抗体の単一アームのV_LおよびV_Hドメインを有し；dAb断片は、V_Hドメイン、V_Lドメイン、またはV_HまたはV_Lドメインの抗原結合性断片を有する（米国特許第6,846,634号、同第6,696,245号、米国特許出願公開第05/0202512号、同第04/0202995号、同第04/0038291号、同第04/0009507号、

50

同第 0 3 / 0 0 3 9 9 5 8 号、Ward et al., Nature 341:544-546, 1989)。

【 0 1 2 8 】

特定の軽鎖および重鎖可変領域ドメインのポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、下記で説明される。軽鎖および重鎖を含む抗体は、軽鎖可変ドメインの名称と重鎖可変ドメインの名称を組み合わせることにより表記される。例えば、「L 4 H 7」は、L 4 の軽鎖可変ドメイン（配列番号 4 の配列を含む）と H 7 の重鎖可変ドメイン（配列番号 1 0 7 の配列を含む）とを含む抗体を示す。軽鎖可変配列は、配列番号 1 ~ 2 8 で提供され、重鎖可変配列は、配列番号 1 0 1 ~ 1 2 8 で提供される。

【 0 1 2 9 】

他の実施形態では、抗体は、特異的重鎖または軽鎖を含むことができるが、相補的軽鎖および重鎖可変ドメインは、不特定のままである。詳細には、本明細書におけるある特定の実施形態は、特定の軽鎖または重鎖によって特定の抗原（例えば、CTLA-4）に結合する抗体であって、したがって、相補的重鎖または軽鎖が、無差別であっても、またはさらには無関係であってもよいが、例えばコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより、それらを決定することができる、抗体を含む。Portolano et al., J. Immunol. V. 150 (3), pp. 880-887 (1993); Clackson et al., Nature v. 352 pp. 624-628 (1991); Adler et al., A natively paired antibody library yields drug leads with higher sensitivity and specificity than a randomly paired antibody library, MAbs (2018)); Adler et al., Rare, high-affinity mouse anti-CTLA-4 antibodies that function in checkpoint blockade, discovered using microfluidics and molecular genomics, MAbs (2017)。

【 0 1 3 0 】

天然に存在する免疫グロブリン鎖は、相補性決定領域または C D R とも呼ばれる、3 つの超可変領域によって結合された比較的保存されるフレームワーク領域（F R）の同じ一般構造を示す。軽鎖および重鎖両方が、N 末端から C 末端へ、ドメイン F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3 および F R 4 を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no.91-3242, 1991における Kabat et al. の定義に従う。

【 0 1 3 1 】

「完全ヒト抗体」とも呼ばれる、「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する 1 つまたは複数の可変および定常領域を有する全ての抗体を含む。一実施形態では、可変および定常ドメインの全ては、ヒト免疫グロブリン配列（完全ヒト抗体）に由来する。これらの抗体は、ヒト重鎖および / または軽鎖コード遺伝子に由来する抗体を発現するように遺伝子改変されるマウスの目的の抗原での免疫による方法を含む、様々な方法で調製することができ、これらの方法の例は、下に記載される。

【 0 1 3 2 】

ヒト化抗体は、1 つまたは複数のアミノ酸置換、欠失および / または付加の点で非ヒト種に由来する抗体の配列とは異なる配列を有し、したがって、ヒト化抗体は、それがヒト対象に投与されたとき、非ヒト種抗体と比較して、免疫応答を誘導する可能性が低く、および / またはさほど激しくない免疫応答を誘導する。一実施形態では、非ヒト種抗体の重鎖および / または軽鎖のフレームワークおよび定常ドメイン内のある特定のアミノ酸を、ヒト化抗体を産生するように変異させる。別の実施形態では、ヒト抗体からの定常ドメイン（複数可）を非ヒト種の可変ドメイン（複数可）に融合させる。別の実施形態では、非ヒト抗体の 1 つまたは複数の C D R 配列内の 1 つまたは複数のアミノ酸残基を、それがヒト対象に投与されたとき、非ヒト抗体の推定免疫原性を低下させるように変化させ、変化させるアミノ酸残基は、抗体のその抗原との免疫特異的結合にとって重要でないか、または加えられるアミノ酸配列に対する変化は、保存的变化であり、したがって、ヒト化抗体の抗原との結合は、非ヒト抗体の抗原との結合よりも有意に悪くはない。ヒト化抗体を作製する方法の例は、米国特許第 6 , 0 5 4 , 2 9 7 号、同第 5 , 8 8 6 , 1 5 2 号および

10

20

30

40

50

同第5, 877, 293号において見出すことができる。

【0133】

用語「キメラ抗体」は、1つの抗体からの1つまたは複数の領域と1つまたは複数の他の抗体からの1つまたは複数の領域とを含有する、抗体を指す。一実施形態では、CDRの1つまたは複数の、ヒト抗CTLA-4抗体に由来する。別の実施形態では、CDRの全てがヒト抗CTLA-4抗体に由来する。別の実施形態では、1つより多くのヒト抗CTLA-4抗体からのCDRが、キメラ抗体では、混合されており、マッチしている。例えば、キメラ抗体は、第1のヒト抗CTLA-4抗体の軽鎖からのCDR1と、第2のヒト抗CTLA-4抗体の軽鎖からのCDR2およびCDR3と、第3の抗CTLA-4抗体からの重鎖からのCDRとを含むことがある。さらに、フレームワーク領域は、同じ抗CTLA-4抗体のうちの1つに由来することもあり、ヒト抗体などの1つもしくは複数の異なる抗体に由来することもあり、またはヒト化抗体に由来することもある。キメラ抗体の一例では、重鎖および/または軽鎖の一部は、特定の種からのまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体と同一であるか、相同であるか、またはそのような抗体に由来するが、鎖の残部は、別の種からのまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体と同一であるか、相同であるか、またはそのような抗体に由来する。所望の生物活性(すなわち、CTLA-4に特異的に結合する能力)を示すそのような抗体の断片も含まれる。

10

【0134】

抗体の断片またはアナログを、当業者は、本明細書の教示に従って、および当技術分野において周知の技術を使用して、容易に調製することができる。断片またはアナログの好ましいアミノおよびカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界付近に存在する。構造ドメインおよび機能的ドメインは、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データを公的または専有の配列データベースと比較することにより、同定することができる。コンピュータによる比較方法を使用して、構造および/または機能が分かっている他のタンパク質中に存在する配列モチーフまたは予測タンパク質立体構造ドメインを同定することができる。折り重なって公知の三次元構造になるタンパク質配列を同定する方法も公知である。例えば、Bowie et al., 1991, Science 253:164を参照されたい。

20

【0135】

抗体に由来する抗原結合性断片は、例えば、抗体のタンパク質分解性加水分解、例えば、従来の方法による全抗体のペプシンまたはパイン消化により、得ることができる。例として、 $F(ab')_2$ と呼ばれる5S断片を得るためのペプシンでの抗体の酵素的切断により、抗体断片を生じさせることができる。チオール還元剤を使用してこの断片をさらに切断して、3.5S Fab'一価断片を生じさせることができる。必要に応じて、ジスルフィド結合の切断の結果として生じるスルフヒドリル基に対してブロッキング基を使用して、切断反応を行うことができる。代替方法として、パインを使用する酵素的消化は、2つの一価Fab断片とFc断片とを直接生じさせる。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4,331,647号、Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., in Methods in Enzymology 1:422 (Academic Press 1967)により;およびAndrews, S.M. and Titus, J.A. in Current Protocols in Immunology (Coligan J.E., et al., eds), John Wiley & Sons, New York (2003), pages 2.8.1 2.8.10 and 2.10A.1 2.10A.5により記載されている。抗体を切断するための、例えば、重鎖を分離して一価軽重鎖断片(Fd)を形成し、さらに断片を切断するための、他の方法、または他の酵素的、化学的もしくは遺伝学的技術も、それらの断片が、無傷抗体により認識される抗原に結合する限り、使用することができる。

30

40

【0136】

抗体断片は、いずれの合成タンパク質または遺伝子操作されたタンパク質であってもよい。例えば、抗体断片は、軽鎖可変領域からなる単離された断片;重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片;軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリinkerにより接続され

50

ている、組換え単鎖ポリペプチド分子 (s c F v タンパク質) を含む。

【 0 1 3 7 】

抗体断片のもう1つの形態は、抗体の1つまたは複数の相補性決定領域 (C D R) を含むペプチドである。C D R (「最小認識単位」または「超可変領域」とも呼ばれる) を分子に共有結合であるいは非共有結合で組み込んで、その分子を抗原結合タンパク質にすることができる。C D R は、目的のC D R をコードするポリヌクレオチドを構築することにより得ることができる。そのようなポリヌクレオチドは、例えば、抗体産生細胞のm R N A を鋳型として使用して、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して可変領域を合成することにより、調製される (例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995); およびWard et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al., (eds.), page 137 (Wiley Liss, Inc. 1995)を参照されたい)。

10

【 0 1 3 8 】

したがって、一実施形態では、結合剤は、本明細書に記載の少なくとも1つのC D R を含む。結合剤は、本明細書に記載の少なくとも2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのC D R を含むこともある。結合剤は、本明細書に記載の抗体の少なくとも1つの可変領域ドメインをさらに含むことがある。可変領域ドメインは、いずれのサイズまたはアミノ酸組成のものであってもよく、本明細書に具体的に記載される、および1つまたは複数のフレームワーク配列と隣接しているまたはインフレームである、ヒトC T L A - 4 との結合に参与する少なくとも1つのC D R 配列、例えば、C D R 1 - H、C D R 2 - H、C D R 3 - H、C D R 1 - L、C D R 2 - L およびC D R 3 - L を一般に含む。一般に、可変 (V) 領域ドメインは、免疫グロブリン重 (V _H) 鎖および / または軽 (V _L) 鎖可変ドメインのいずれの好適な配置であってもよい。したがって、例えば、V 領域ドメインは、一価であることがあり、下記で説明されるように 1×10^{-7} M またはそれ未満に少なくとも等しい親和性でヒトC T L A - 4 に独立して結合することができる、V _H またはV _L ドメインであることがある。あるいは、V 領域ドメインは、二価であることがあり、V _H V _H、V _H V _L、またはV _L V _L 二量体を含有することがある。V 領域二量体は、非共有結合で会合していることがある、少なくとも1本のV _H および少なくとも1本のV _L 鎖 (本明細書では以降F v と呼ばれる) を含む。必要に応じて、これらの鎖を、直接、例えば2つの可変ドメイン間のジスルフィド結合によって、あるいはリンカー、例えばペプチドリナーを介して、共有結合でカップリングさせて、単鎖F v (s c F v) を形成することができる。

20

30

【 0 1 3 9 】

可変領域ドメインは、いずれの天然に存在する可変ドメインまたはその操作されたバージョンであってもよい。操作されたバージョンとは、組換えD N A 操作技術を使用して作出された可変領域ドメインを意味する。そのような操作されたバージョンは、例えば、特異的抗体可変領域から、特異的抗体のアミノ酸配列におけるまたはそのようなアミノ酸配列への、挿入、欠失または変化により、作出されたものを含む。特定の例としては、第1の抗体からの少なくとも1つのC D R および必要に応じて1つまたは複数のフレームワークアミノ酸と、第2の抗体からの可変領域ドメインの残部とを含有する、操作された可変領域ドメインを含む。

40

【 0 1 4 0 】

可変領域ドメインを、少なくとも1つの他の抗体またはその断片のC末端側のアミノ酸に共有結合させることができる。したがって、例えば、可変領域ドメインに存在するV _H ドメインを、免疫グロブリンC H 1 ドメインまたはその断片に連結させることができる。同様に、V _L ドメインをC K ドメインまたはその断片に連結させることができる。このように、例えば、抗体は、抗原結合性ドメインが、会合V _H およびV _L ドメインを含有し、

50

これらのドメインのC末端がCH1およびCKドメインにそれぞれ共有結合で連結されている、Fab断片であり得る。CH1ドメインをさらなるアミノ酸で伸長させて、例えば、Fab'断片に見られるようなヒンジ領域もしくはヒンジ領域ドメインの一部を得ることができ、または抗体CH2およびCH3ドメインなどのさらなるドメインを得ることができる。

【0141】

本明細書中で説明されるように、抗体は、これらのCDRの少なくとも1つを含む。例えば、1つまたは複数のCDRを、既知抗体フレームワーク領域(IgG1、IgG2など)に組み込むことができ、または好適なビヒクルとコンジュゲートさせてその半減期を延ばすことができる。好適なビヒクルとしては、Fc、ポリエチレングリコール(PEG)、アルブミン、トランスフェリンなどが挙げられるが、それらに限定されない。これらおよび他の好適なビヒクルは、当技術分野において公知である。そのようなコンジュゲートCDRペプチドは、単量体形態、二量体形態、三量体形態または他の形態であり得る。一実施形態では、1つまたは複数の水溶性ポリマーが、結合剤の1カ所または複数ヶ所の特異的位置に、例えばアミノ末端に、結合される。

【0142】

別の例では、抗体(すなわち、CTLA-4抗体)からの個々のVLまたはVH鎖を使用して、同じ特異性を有する、抗原結合性断片(またはFab)を形成することができる他のVHまたはVL鎖について、検索することができる。したがって、VHおよびVL鎖Ig遺伝子のランダムな組合せをバクテリオファージライブラリー(例えば、fdまたはラムダファージ)において抗原結合性断片として発現させることができる。例えば、抗原結合特異的VLまたはVH鎖ライブラリーとそれぞれ組み合わせた親VLまたはVH鎖ライブラリーを利用することにより、コンビナトリアルライブラリーを生成することができる。次いで、コンビナトリアルライブラリーを、従来の技術により、例えば、放射性標識されたプローブ(例えば、放射性標識されたCTLA-4)を使用することにより、スクリーニングすることができる。例えば、Portolano et al., J. Immunol. V. 150 (3) p. 880-887 (1993)を参照されたい。

【0143】

ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖を含む二価抗体であって、各ポリペプチド鎖が、リンカーにより結合されたVHおよびVLドメインを含み、このリンカーが、短すぎて同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を生じさせることができず、結果として、各ドメインによる別のポリペプチド鎖上の相補ドメインとの対合を可能にする、二価抗体である(例えば、Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48、およびPoljak et al., 1994, Structure 2:1121-23を参照されたい)。ダイアボディの2本のポリペプチド鎖が同一である場合には、それらの鎖の対合の結果として生じるダイアボディは、2つの同一の抗原結合部位を有する。異なる配列を有するポリペプチド鎖を使用して、2つの異なる抗原結合部位を有するダイアボディを作製することができる。同様に、トリアボディおよびテトラボディは、3本および4本のポリペプチド鎖をそれぞれ含む抗体であって、同じであってもよく、または異なってもよい、3つまたは4つの抗原結合部位をそれぞれ形成する抗体である。

【0144】

フィブロネクチンポリペプチドモノボディを含む、抗体ポリペプチドが、米国特許第6,703,199号においても開示されている。単鎖ポリペプチドである他の抗体ポリペプチドが、米国特許公開第2005/0238646号において開示されている。

【0145】

ある特定の実施形態では、抗体は、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、またはポリプロピレングリコールを含むがこれらに限定されない、結合している1つまたは複数の水溶性ポリマーを含む。例えば、米国特許第4,640,835号、同第4,496,689号、同第4,301,144号、同第4,670,417号、同第4,791,192号および同第4,179,337号を参照されたい。ある特定の実施

10

20

30

40

50

形態では、誘導結合剤 (derivative binding agent) は、モノメトキシ - ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、もしくは他の炭水化物に基づくポリマー、ポリ - (N - ビニルピロリドン) - ポリエチレングリコール、プロビレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール) およびポリビニルアルコールのうちの 1 つまたは複数、ならびにこのようなポリマーの混合物を含む。ある特定の実施形態では、1 つまたは複数の水溶性ポリマーは、1 つまたは複数の側鎖にランダムに結合される。ある特定の実施形態では、PEG は、抗体などの結合剤の治療能を向上させるように作用することができる。ある特定のそのような方法は、例えば、あらゆる目的でこれにより参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6, 133, 426 号において論じられている。

10

7. 6. 抗原結合タンパク質

【0146】

一態様では、本開示は、CTLA - 4 と結合する抗原結合タンパク質 (例えば、抗体、抗体断片、抗体誘導体、抗体ムテイン、および抗体バリエーション) を提供する。

【0147】

抗原結合タンパク質は、例えば、天然に存在する免疫グロブリンの構造を有し得る。「免疫グロブリン」は、四量体分子である。天然に存在する免疫グロブリンでは、各四量体は、ポリペプチド鎖の 2 つの同一な対から構成され、それぞれの対は、1 つの「軽」鎖 (約 25 kDa) と 1 つの「重」鎖 (約 50 ~ 70 kDa) を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約 100 から 110 またはそれより多いアミノ酸の変換領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、カッパ軽鎖とラムダ軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンとして分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれ、IgM、IgD、IgG、IgA、および IgE として定義する。軽鎖および重鎖内では、可変領域および定常領域が約 12 個またはそれより多いアミノ酸の「J」領域によって接合し、重鎖はさらに約 10 個のアミノ酸の「D」領域も含む。一般に、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (参照により全ての目的でその全体が組み込まれる) を参照されたい。各軽鎖 / 重鎖の対の変換領域は、無傷免疫グロブリンが 2 つの結合部位を有するように、抗体結合部位を形成する。

20

【0148】

本開示に従って、抗原結合タンパク質は、CTLA - 4 の生物活性を阻害する抗原結合タンパク質を含む。

30

【0149】

様々な抗原結合タンパク質は、CTLA - 4 の様々なドメインと結合するかまたは様々な作用機序によって作用し得る。とりわけ本明細書で示されるように、ドメイン領域は、別段に示されていなければ、群を含むように設計される。例えば、アミノ酸 4 ~ 12 は、9 個のアミノ酸: 位置 4、および 12 のアミノ酸、ならびに配列中に介在する 7 個のアミノ酸を指す。他の例としては、CTLA - 4 のそのリガンドとの結合を阻害する抗原結合タンパク質が挙げられる。抗原結合タンパク質は、本開示において使用を見出す CTLA - 4 に誘導される活性を完全に阻害する必要はなく、むしろ、CTLA - 4 の特定の活性を低下させる抗原結合タンパク質も同様に使用が企図される。(特定の疾患を処置する際に、CTLA - 4 と結合する抗原結合タンパク質に関する特定の作用機序についての本明細書における議論は例示のみであって、本明細書に提示される方法はそれによって拘束されない。)

40

【0150】

別の態様では、本開示は、A1LC - A28LC からなる群から選択される軽鎖可変領域または A1HC - A28HC からなる群から選択される重鎖可変領域、ならびにその断片、誘導体、ムテイン、およびバリエーションを含む抗原結合タンパク質を提供する。このような抗原結合タンパク質は、名称「LxHy」(式中、これらが以下の配列において標識されているように、「x」は軽鎖可変領域の番号に相当し、「y」は重鎖可変領域の番号

50

に相当する)を使用して示すことができる。すなわち、例えば、「A 1 H C」は、配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を示し、「A 1 L C」は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を示す、などである。より一般的に言えば、「L 2 H 1」は、L 2 (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および H 1 (配列番号 1 0 1) のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む抗原結合タンパク質を指す。明確化のために、1 つの群のうちの少なくとも 2 つのメンバーによって示される全ての範囲は、その範囲のメンバーの末端の間およびそれを含む群の全てのメンバーを含む。よって、範囲 A 1 ~ A 2 8 の群は、A 1 から A 2 8 の間の全てのメンバー、ならびにメンバー A 1 および A 2 8 自体を含む。範囲 A 4 ~ A 6 の群は、メンバー A 4、A 5、および A 6 を含む、などである。

10

【0 1 5 1】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、ATCC 受託番号 PTA - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託された CTLA - 4 結合クローンのライブラリー内のクローンのうちの 1 つと同一の重鎖配列と軽鎖配列の両方の可変 (V (D) J) 領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、ATCC 受託番号 PTA - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託された CTLA - 4 結合クローンのライブラリー内のクローンのうちの 1 つと同一の重鎖配列または軽鎖配列のいずれかの可変 (V (D) J) 領域を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、ATCC 受託番号 PTA - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託された CTLA - 4 結合クローンのライブラリー内のクローンのうちの 1 つにおいて、発現ベクターから発現される。

20

【0 1 5 2】

抗原結合部位の一部を生成する CDR (下線を付す) の位置も以下に示されるが、フレームワーク領域 (FR) は、これらの可変ドメイン配列の介在セグメントである。軽鎖可変領域と重鎖可変領域の両方において、3 つの CDR (CDR 1 ~ 3) と 4 つの FR (FR 1 ~ 4) が存在する。各軽鎖および重鎖の CDR 領域も、抗体型 (A 1、A 2、A 3 など) によって群分けされる。本開示の抗原結合タンパク質は、例えば、L 1 H 1 (抗体 A 1)、L 2 H 2 (抗体 A 2)、L 3 H 3 (抗体 A 3)、L 4 H 4 (抗体 A 4)、L 5 H 5 (抗体 A 5)、L 6 H 6 (抗体 A 6)、L 7 H 7 (抗体 A 7)、L 8 H 8 (抗体 A 8)、L 9 H 9 (抗体 A 9)、L 1 0 H 1 0 (抗体 A 1 0)、L 1 1 H 1 1 (抗体 A 1 1)、L 1 2 H 1 2 (抗体 A 1 2)、L 1 3 H 1 3 (抗体 A 1 3)、・・・および L 2 8 H 2 8 (抗体 A 2 8) からなる組合せの群から選択される軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの組合せを有する抗原結合タンパク質を含む。

30

【0 1 5 3】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、ATCC 受託番号 PTA - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託された CTLA - 4 結合クローンのライブラリー内のクローンのうちの 1 つと同一の全部で 6 つの CDR 配列 (3 つの軽鎖の CDR および 3 つの重鎖の CDR) を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、ATCC 受託番号 PTA - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託された CTLA - 4 結合クローンのライブラリー内のクローンのうちの 1 つと同一の 6 つの CDR 配列のうちの 3 つ (3 つの軽鎖の CDR または 3 つの重鎖の CDR) を含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、ATCC 受託番号 PTA - 1 2 5 5 1 2 の下で寄託された CTLA - 4 結合クローンのライブラリー内のクローンのうちの 1 つと同一の 6 つの CDR 配列のうちの 1、2、3、4、または 5 つを含む。

40

【0 1 5 4】

一実施形態では、本開示は、L 1 から L 2 8 からなる群から選択される軽鎖可変ドメインの配列と、1 5、1 4、1 3、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 つの残基のみで異なるアミノ酸の配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗原結合タンパク質であって、このような配列の差異のそれぞれが、独立して、1 つのアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換のいずれかである、抗原結合タンパク質を提供する。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、L 1 ~ L 2 8 からなる群から選択される軽鎖可変ドメインの配列と少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7

50

%、98%、または99%同一であるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、L1～L28（L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、・・・およびL28を含む）からなる群から選択される軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、L1～L28からなる群から選択される軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補体に対して適度にストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、L1～L28からなる群から選択される軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補体に対して適度にストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、L1～L28の軽鎖ポリヌクレオチドの相補体に対して適度にストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸の配列を含む。

10

【0155】

一実施形態では、本開示は、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTL A-4結合クローンのライブラリーのクローンのうちの1つによってコードされる軽鎖可変ドメインの配列から、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1つの残基のみで異なるアミノ酸の配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗原結合タンパク質であって、このような配列の差異のそれぞれが、独立して、1つのアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換のいずれかである、抗原結合タンパク質を提供する。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTL A-4結合クローンのライブラリーのクローンのうちの1つによってコードされる軽鎖可変ドメインの配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTL A-4結合クローンのライブラリーのクローンのうちの1つについてのヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸の配列を含む。

20

30

【0156】

別の実施形態では、本開示は、H1～H28からなる群から選択される重鎖可変ドメインの配列と、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1つの残基のみで異なるアミノ酸の配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗原結合タンパク質であって、このような配列の差異のそれぞれが、独立して、1つのアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換のいずれかである、抗原結合タンパク質を提供する。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、H1～H28からなる群から選択される重鎖可変ドメインの配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、H1～H28からなる群から選択される重鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、H1～H28からなる群から選択される重鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補体に対して適度にストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、H1～H28からなる群から選択される重鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチドの相補体に対して適度にストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、本明細書

40

50

で開示される重鎖ポリヌクレオチドの相補体に対して適度にストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸の配列を含む。

【0157】

一実施形態では、本開示は、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTL A-4結合クローンのライブラリーのクローンのうちの1つによってコードされる重鎖可変ドメインの配列と、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1つの残基のみで異なるアミノ酸の配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗原結合タンパク質であって、このような配列の差異のそれぞれが、独立して、1つのアミノ酸残基の欠失、挿入、または置換のいずれかである、抗原結合タンパク質を提供する。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTL A-4結合クローンのライブラリーのクローンのうちの1つによってコードされる重鎖可変ドメインの配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸の配列を含む。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、ATCC受託番号PTA-125512の下で寄託されたCTL A-4結合クローンのライブラリーのクローンの1つについてのヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸の配列を含む。

10

【0158】

本開示の抗原結合タンパク質の特定の実施形態は、本明細書において参照されるCDRおよび/またはFRのうちの1つまたは複数のアミノ酸配列に対して同一である1つまたは複数のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記に例示された軽鎖CDR1配列を含む。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記に例示された軽鎖CDR2配列を含む。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記に例示された軽鎖CDR3配列を含む。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記に例示された重鎖CDR1配列を含む。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記に例示された重鎖CDR2配列を含む。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記に例示された重鎖CDR3配列を含む。

20

【0159】

一実施形態では、本開示は、上記に示されるCDR配列と、5、4、3、2、または1個以下のアミノ酸残基で異なる1つまたは複数のCDR配列を含む抗原結合タンパク質を提供する。

30

【0160】

一部の実施形態では、抗原結合タンパク質のCDR1配列の少なくとも1つは、表5に示されるA1~A28、CDR1-L1から28、またはCDR1-H1から28からのCDR1配列である。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質のCDR2配列の少なくとも1つは、表5に示されるA1~A28、CDR2-L1から28、またはCDR2-H1から28からのCDR2配列である。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質のCDR3配列の少なくとも1つは、表5に示されるA1~A28、CDR3-L1から28、またはCDR3-H1から28からのCDR3配列である。

40

【0161】

別の実施形態では、抗原結合タンパク質の軽鎖CDR3配列は、表5に示されるA1~A28またはCDR3-L1から28からの軽鎖CDR3配列であり、抗原結合タンパク質の重鎖CDR3配列は、表5に示されるA1~A28またはCDR-H1から28からの重鎖配列である。

【0162】

別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、それぞれ独立して、A1~A23のCDR配列と6、5、4、3、2、1、または0個の単一のアミノ酸の付加、置換、および/または欠失で異なる1、2、3、4、または5個のCDR配列を含み、抗原結合タンパク質は、それぞれ独立して、CDR配列と6、5、4、3、2、1、または0個の単一のアミ

50

ノ酸の付加、置換、および/または欠失で異なる1、2、3、4、または5個のCDR配列をさらに含む。一部の実施形態では、抗原結合タンパク質は、A1～A28のCDR配列に対して、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性をそれぞれ有する1、2、3、4、または5個のCDR配列を含む。

【0163】

A1～A28のヌクレオチド配列、またはA1～A28のアミノ酸配列は、例えば、ランダム変異誘発または部位特異的変異誘発（例えば、オリゴヌクレオチド指定部位特異的変異誘発）によって変更され、変異していないポリヌクレオチドと比較して、1つまたは複数の特定のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入を含む変更されたポリヌクレオチドを作出することができる。このような変更を作製するための技法の例は、Walder et al., 1986, Gene 42:133; Bauer et al. 1985, Gene 37:73; Craik, BioTechniques, January 1985, 12-19; Smith et al., 1981, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press; ならびに米国特許第4,518,584号および同第4,737,462号に記載される。これらおよび他の方法を使用して、例えば、所望の特性、例えば親和性、結合活性、もしくはCTLA-4に対する特異性の増加、*in vivo*もしくは*in vitro*での活性もしくは安定性の増加、または誘導化していない抗体と比較して低下した*in vivo*での副作用を有する抗CTLA-4抗体の誘導体を作製することができる。

【0164】

本開示の範囲内の抗CTLA-4抗体の他の誘導体は、抗CTLA-4抗体、またはその断片の他のタンパク質またはポリペプチドとの、抗CTLA-4抗体ポリペプチドのN末端またはC末端に融合した異種ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質の発現などによる、共有結合または集合コンジュゲートを含む。例えば、コンジュゲートしたペプチドは、異種シグナル（またはリーダー）ポリペプチド、例えば、酵母アルファ因子リーダー、またはエピトープタグなどのペプチドであってもよい。抗原結合タンパク質を含有する融合タンパク質は、抗原結合タンパク質（例えば、ポリ-His）の精製または同定を容易にするために付加されたペプチドを含んでもよい。抗原結合タンパク質は、Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988、および米国特許第5,011,912号に記載されるFLAGペプチドAsp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK)（配列番号7002）に連結されていてもよい。FLAGペプチドは、抗原性が高く、特異的モノクローナル抗体(mAb)が可逆的に結合するエピトープをもたらし、発現した組み換えタンパク質の迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。FLAGペプチドが所与のポリペプチドに融合する、融合タンパク質を調製するのに有用な試薬は市販されている(Sigma, St. Louis, MO)。

【0165】

1つの好適なFcポリペプチドは、PCT出願WO93/10151（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されており、ヒトIgG1抗体のFc領域の未変性C末端に対するN末端ヒンジ領域から伸長する一本鎖ポリペプチドである。別の有用なFcポリペプチドは、米国特許第5,457,035号およびBaum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001に記載されるFcムテインである。このムテインのアミノ酸配列は、アミノ酸19がLeuからAlaに変化し、アミノ酸20がLeuからGluに変化し、かつアミノ酸22がGlyからAlaに変化したことを除いて、WO93/10151において示された未変性Fc配列のものと同一である。ムテインは、Fc受容体に対する親和性の低下を示す。

【0166】

他の実施形態では、抗CTLA-4抗体の重鎖および/または軽鎖の可変部分は、抗体の重鎖および/または軽鎖の可変部分の代わりに使用できる。

【0167】

1つまたは複数の抗原結合タンパク質を含有するオリゴマーは、CTLA-4アンタゴ

10

20

30

40

50

ニストまたはアゴニストとして用いられてもよい。オリゴマーは、共有結合により連結したかまたは非共有結合により連結した二量体、三量体、またはそれより高次のオリゴマーの形態であってもよい。2つまたはそれより多い抗原結合タンパク質を含むオリゴマーの使用が企図され、1つの例はホモ二量体である。他のオリゴマーとしては、ヘテロ二量体、ホモ三量体、ヘテロ三量体、ホモ四量体、ヘテロ四量体などが挙げられる。

【0168】

一実施形態は、抗原結合タンパク質に融合したペプチド部分間の共有結合または非共有結合による相互作用を介して接合した複数の抗原結合タンパク質を含むオリゴマーを対象とする。このようなペプチドは、ペプチドリンカー（スペーサー）、またはオリゴマー化を促進する特性を有するペプチドであってもよい。ロイシンジッパーおよび抗体に由来するある特定のポリペプチドは、以下により詳細に記載されるように、それに結合した抗原結合タンパク質のオリゴマー化を促進することができるペプチドに含まれる。

10

【0169】

特定の実施形態では、オリゴマーは、2つから4つの抗原結合タンパク質を含む。オリゴマーの抗原結合タンパク質は、上記の形態のいずれかなどのいずれかの形態、例えばバリエーションまたは断片であってもよい。好ましくは、オリゴマーは、C T L A - 4 結合活性を有する抗原結合タンパク質を含む。

【0170】

一実施形態では、オリゴマーは、免疫グロブリンに由来するポリペプチドを使用して調製される。抗体由来のポリペプチドの様々な部分（F c ドメインを含む）に融合したある特定の異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の調製について、例えば、Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; および Hollenbaugh et al., 1992 Curr. Prots in Immunol., Suppl. 4, pages 10.19.1 - 10.19.11に記載されている。

20

【0171】

本開示の一実施形態は、抗 C T L A - 4 抗体の C T L A - 4 結合断片を抗体の F c 領域に融合させることによって作出される2つの融合タンパク質を含む二量体を対象とする。二量体は、例えば、融合タンパク質をコードする遺伝子融合物を、組換え発現ベクターにより形質転換された宿主細胞において遺伝子融合物を発現する適切な発現ベクター中に挿入し、発現された融合タンパク質を類似する抗体分子にアセンブルさせ、その際に、鎖間ジスルフィド結合が F c 部分の間に形成され、二量体を生じることによって作製することができる。

30

【0172】

あるいは、オリゴマーは、ペプチドリンカー（スペーサーペプチド）を有するかまたは有さない、複数の抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質である。好適なペプチドリンカーの中に、米国特許第4,751,180号および同第4,935,233号に記載されるものがある。

【0173】

オリゴマー抗原結合タンパク質を調製するための別の方法は、ロイシンジッパーの使用に關与する。ロイシンジッパードメインは、それらが見出されるタンパク質のオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、いくつかのDNA結合タンパク質において当初は同定され（Landschulz et al., 1988, Science 240:1759）、以来、種々の異なるタンパク質において見出されてきた。公知のロイシンジッパーの中で、二量体化または三量体化する天然に存在するペプチドおよびその誘導体が存在する。可溶性オリゴマータンパク質を産生するために好適なロイシンジッパードメインの例は、P C T 出願 W O 9 4 / 1 0 3 0 8 に記載されており、肺表面タンパク質 D (S P D) 由来のロイシンジッパーは、Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191に記載され、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。それに融合した異種タンパク質の安定した三量体化を可能にする改変されたロイシンジッパーの使用は、Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78に記載される。1つのアプローチでは、ロイシンジッパーペ

40

50

プチドに融合した抗 C T L A - 4 抗体断片または誘導体を含む組換え融合タンパク質は、好適な宿主細胞において発現され、形成する可溶性オリゴマー抗 C T L A - 4 抗体断片または誘導体は、培養上清から回収される。

【 0 1 7 4 】

一態様では、本開示は、C T L A - 4 のそのリガンドとの結合を妨害する抗原結合タンパク質を提供する。このような抗原結合タンパク質は、C T L A - 4、またはその断片、バリエーションもしくは誘導体に対して作製され、C T L A - 4 のそのリガンドとの結合を妨害する能力について、従来のアッセイでスクリーニングすることができる。好適なアッセイの例は、C T L A - 4 リガンドの C T L A - 4 を発現する細胞との結合を阻害する能力について抗原結合タンパク質を試験するか、または C T L A - 4 リガンドの細胞表面 C T L A - 4 との結合から生じる生体応答もしくは細胞応答を低下させる能力について抗原結合タンパク質を試験するアッセイである。例えば、抗体は、固定化された抗体表面 (C T L A - 4) に結合するそれらの能力によってスクリーニングすることができる。C T L A - 4 のリガンドとの結合を遮断する抗原結合タンパク質は、がんを含むがこれらに限定されないいずれかの C T L A - 4 に関連する状態を処置する際に用いることができる。実施形態では、トランスジェニックマウスの免疫に関与する手順によって生じたヒト抗 C T L A - 4 モノクローナル抗体は、このような状態を処置する際に用いられる。

10

【 0 1 7 5 】

本開示の抗原結合タンパク質の抗原結合性断片は、従来の技法によって產生することができる。このような断片の例としては、F a b および F (a b ')₂ 断片が挙げられるがこれらに限定されない。遺伝子操作技法によって產生される抗体断片および誘導体も企図される。

20

【 0 1 7 6 】

追加の実施形態としては、キメラ抗体、例えば、非ヒト (例えば、マウス) モノクローナル抗体のヒト化バージョンが挙げられる。このようなヒト化抗体は、公知の技法によって調製することができ、抗体がヒトに投与された場合に、免疫原性の低下という利点をもたらす。一実施形態では、ヒト化モノクローナル抗体は、マウス抗体の可変ドメイン (またはその抗原結合部位の全てもしくは一部) およびヒト抗体に由来する定常ドメインを含む。あるいは、ヒト化抗体断片は、マウスモノクローナル抗体の抗原結合部位およびヒト抗体に由来する可変ドメイン断片 (抗原結合部位を欠如する) を含んでもよい。キメラおよびさらに操作されたモノクローナル抗体の產生のための手順は、Riechmann et al., 1988, Nature 332:323、Liu et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439、Larrick et al., 1989, Bio/Technology 7:934、および Winter et al., 1993, TIPS 14:139 に記載されたものを含む。一実施形態では、キメラ抗体は、C D R 移植抗体である。抗体をヒト化するための技法は、例えば、米国特許第 5,869,619 号、同第 5,225,539 号、同第 5,821,337 号、同第 5,859,205 号、同第 6,881,557 号、Padlan et al., 1995, FASEB J. 9:133-39、および Tamura et al., 2000, J. Immunol. 164:1432-41 において議論されている。

30

【 0 1 7 7 】

手順は、非ヒト動物において、ヒト抗体または部分的ヒト抗体を生成するために開発されてきた。例えば、様々な手段によって 1 つまたは複数の内因性免疫グロブリン遺伝子が不活性化されたマウスが調製されている。ヒト免疫グロブリン遺伝子がマウスに導入され、不活性化されたマウス遺伝子を置き換える。動物において產生された抗体は、動物に導入されたヒト遺伝子物質によってコードされたヒト免疫グロブリンポリペプチド鎖を組み込む。一実施形態では、トランスジェニックマウスなどの非ヒト動物は、C T L A - 4 ポリペプチドを対象とする抗体が動物において生成されるように、C T L A - 4 ポリペプチドで免疫する。

40

【 0 1 7 8 】

好適な免疫原の一例は、以下の配列：配列番号 7 0 0 1 を有するタンパク質またはそのタンパク質の他の免疫原性断片の細胞外ドメインを含むポリペプチドなどの可溶性ヒト C

50

T L A - 4である。ヒトまたは部分的ヒト抗体の産生のための技法およびその産生のためのトランスジェニック動物の使用の例は、米国特許第5,814,318号、同第5,569,825号、および同第5,545,806号、Davis et al., 2003, Production of human antibodies from transgenic mice in Lo, ed. Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press, NJ:191-200、Kellermann et al., 2002, Curr Opin Biotechnol. 13:593-97、Russel et al., 2000, Infect Immun. 68:1820-26、Gallo et al., 2000, Eur J Immun. 30:534-40、Davis et al., 1999, Cancer Metastasis Rev. 18:421-25、Green, 1999, J Immunol Methods. 231:11-23、Jakobovits, 1998, Advanced Drug Delivery Reviews 31:33-42、Green et al., 1998, J Exp Med. 188:483-95、Jakobovits A, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs. 7:607-14、Tsuda et al., 1997, Genomics. 42:413-21、Mendez et al., 1997, Nat Genet. 15:146-56、Jakobovits, 1994, Curr Biol. 4:761-63、Arbones et al., 1994, Immunity. 1:247-60、Green et al., 1994, Nat Genet. 7:13-21、Jakobovits et al., 1993, Nature. 362:255-58、Jakobovits et al., 1993, Proc Natl Acad Sci U S A 90:2551-55、Chen, J., M. Trounstine, F. W. Alt, F. Young, C. Kurahara, J. Loring, D. Huszar. Inter'l Immunol. 5(1993): 647-656、Choi et al., 1993, Nature Genetics 4: 117-23、Fishwild et al., 1996, Nature Biotech. 14: 845-51、Harding et al., 1995, Annals of the New York Academy of Sciences、Lonberg et al., 1994, Nature 368: 856-59、Lonberg, 1994, Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies in Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101、Lonberg et al., 1995, Internal Review of Immunology 13: 65-93、Neuberger, 1996, Nature Biotechnology 14: 826、Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-95、Taylor et al., 1994, Inter'l Immunol. 6: 579-91、Tomizuka et al., 1997, Nature Genetics 16: 133-43、Tomizuka et al., 2000, Pro. Nat'l Acad. Sci. USA 97: 722-27、Tuailon et al., 1993, Pro.Nat'l Acad.Sci. USA 90: 3720-24、およびTuailon et al., 1994, J.Immunol. 152: 2912-20に記載される。

【0179】

本開示の抗原結合タンパク質（例えば、抗体、抗体断片、および抗体誘導体）は、当技術分野で公知のいずれかの定常領域を含んでもよい。軽鎖定常領域は、例えば、カッパまたはラムダ型軽鎖定常領域、例えば、ヒトカッパまたはラムダ型軽鎖定常領域であってもよい。重鎖定常領域は、例えば、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、またはミュー型重鎖定常領域、例えば、ヒトアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、またはミュー型重鎖定常領域であってもよい。一実施形態では、軽鎖または重鎖定常領域は、天然に存在する定常領域の断片、誘導体、バリエーション、またはムテインである。

【0180】

目的の抗体からの様々なサブクラスまたはアイソタイプの抗体を誘導するための技法、すなわちサブクラススイッチングが公知である。よって、IgG抗体は、例えば、IgM抗体に由来してもよく、逆もまた同様である。このような技法は、所与の抗体（親抗体）の抗原結合特性を有する新たな抗体の調製を可能にするが、親抗体のものと異なる抗体のアイソタイプまたはサブクラスと関連する生物学的特性も示す。組換えDNA技法が用いられてもよい。特定の抗体ポリペプチドをコードするクローニングされたDNA、例えば、所望のアイソタイプの抗体の定常ドメインをコードするDNAは、このような手順で用いることができる。Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16も参照されたい。

【0181】

一実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質は、A1～A28のいずれかのIgG1重鎖ドメイン（H1～H28）またはA1～A28のいずれかのIgG1重鎖ドメイン（

H 1 ~ H 2 8) の断片を含む。別の実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質は、A 1 ~ A 2 8 のカップ軽鎖定常鎖領域 (L 1 ~ L 2 8) 、または A 1 ~ A 2 8 のカップ軽鎖定常領域 (L 1 ~ L 2 8) の断片を含む。別の実施形態では、本開示の抗原結合タンパク質は、A 1 ~ A 2 8 の I g G 1 重鎖ドメイン (L 1 ~ L 2 8) 、またはその断片および A 1 ~ A 2 8 のカップ軽鎖ドメイン (L 1 ~ L 2 8) 、またはその断片を含む。

【 0 1 8 2 】

したがって、本開示の抗原結合タンパク質としては、例えば、所望のアイソタイプ (例えば、I g A、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g E、および I g D) およびその F a b または F (a b ')₂ 断片を有する可変ドメインの組合せ L 1 H 1、L 2 H 2、L 3 H 3、L 4 H 4、L 5 H 5、L 6 H 6、L 7 H 7、L 8 H 8、L 9 H 9、L 1 0 H 1 0、L 1 1 H 1 1、L 1 2 H 1 2、L 1 3 H 1 3、・・・および L 2 8 H 2 8 を含むものが挙げられる。さらに、I g G 4 が望ましい場合、点変異 (C P S C P (配列番号 1 1 9 6 9) C P P C P (配列番号 1 1 9 7 0)) を、参照により本明細書に組み込まれる Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407 に記載されるヒンジ領域に導入し、I g G 4 抗体における不均一性をもたらし得る H 鎖内ジスルフィド結合を形成する傾向を和らげることも望ましい場合もある。

【 0 1 8 3 】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ またはそれより低い K_{off} を有する。別の実施形態では、 K_{off} は、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ またはそれより低い。別の実施形態では、 K_{off} は、L 1 H 1、L 2 H 2、L 3 H 3、L 4 H 4、L 5 H 5、L 6 H 6、・・・および L 2 8 H 2 8 からなる組合せの群から選択される軽鎖および重鎖可変ドメイン配列の組合せを有する抗体と実質的に同一である。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、L 1 H 1、L 2 H 2、L 3 H 3、L 4 H 4、L 5 H 5、L 6 H 6、・・・および L 2 3 H 2 8 からなる組合せの群から選択される軽鎖および重鎖可変ドメイン配列の組合せを有する抗体からの 1 つまたは複数の C D R を含む抗体と実質的に同一の K_{off} を有する C T L A - 4 と結合する。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記に例示されるアミノ酸配列のうちの 1 つを含む抗体と実質的に同一の K_{off} を有する C T L A - 4 と結合する。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記に例示されるアミノ酸配列のうちの 1 つを含む抗体からの 1 つまたは複数の C D R を含む抗体と実質的に同一の K_{off} を有する C T L A - 4 と結合する。

【 0 1 8 4 】

一態様では、本開示は、本開示の抗 C T L A - 4 抗体の抗原結合性断片を提供する。このような断片は、抗体由来の配列から全体的になってもよく、または追加の配列を含んでもよい。抗原結合性断片の例としては、F a b、F (a b ')₂、単鎖抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、およびドメイン抗体が挙げられる。他の例は、Lunde et al., 2002, Biochem. Soc. Trans. 30:500-06 に提示されている。

【 0 1 8 5 】

単鎖抗体 (s c F v) は、重鎖および軽鎖可変ドメイン (F v 領域) 断片をアミノ酸架橋 (短いペプチドリinker、例えば、アミノ酸残基の合成配列) によって連結し、単一のポリペプチド鎖をもたらしことによって形成することができる。このような単鎖 F v (s c F v) は、2 つの可変ドメインポリペプチド (V_L および V_H) をコードする D N A 間に、ペプチドリinker をコードする D N A を融合させることによって調製されている。得られたポリペプチドは、2 つの可変ドメイン間のフレキシブルリンカーの長さに応じて、それら自体において折り返し、抗原結合モノマーを形成することができるか、または多量体 (例えば、二量体、三量体、または四量体) を形成することができる (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423 ; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108、Bird et al., 1988, Science 242:423-26 および Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83)。様々な V_L および V_H を含むポリペプチドを組み合わせることによって、様々なエピトープと結合する多量体 s c F v を形成することができる (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40)。単鎖抗体の産生

のために開発された技法としては、米国特許第 4, 946, 778 号、Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544; de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87に記載のものが挙げられる。可変ドメインの組合せ L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、・・・、および L28H28 を含む scFv は、本開示に包含される。

7.7. モノクローナル抗体

【0186】

別の態様では、本開示は、CTLA-4 と結合するモノクローナル抗体を提供する。本開示のモノクローナル抗体は、種々の公知の技法を使用して生成することができる。一般に、特異的抗原と結合するモノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって得ることができる（例えば、Kohler et al., Nature 256:495, 1975; Coligan et al.(eds.), Current Protocols in Immunology, 1:2.5.12.6.7(John Wiley & Sons 1991); 米国特許第 RE32, 011 号、同第 4, 902, 614 号、同第 4, 543, 439 号、および同第 4, 411, 993 号; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, and Bechtol(eds.)(1980); および Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane(eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988); Pickslley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al.(eds.), page 93(Oxford University Press 1995)を参照されたい)。抗体断片は、タンパク質分解による消化、または必要に応じてタンパク質分解による消化（例えば、パインまたはペプシンを使用する）の後のジスルフィド結合およびアルキル化の緩やかな低減などのいずれかの好適な標準的技法を使用して、そこから誘導することができる。あるいは、このような断片は、本明細書に記載される組換え遺伝子操作技法によって生成されてもよい。

【0187】

モノクローナル抗体は、例えば、当技術分野で公知のように、トランスジェニックまたはノックアウトを含む動物、例えばラット、ハムスター、ウサギ、または好ましくはマウスに、当技術分野で公知であり、本明細書に記載の方法に従って、ヒト CTLA-4 [配列番号 7001 の配列] またはその断片を含む免疫原を注射することによって得ることができる。特異的抗体産生の存在は、最初の注射後および/またはブースター注射後に、血清試料を得て、当技術分野で公知であり、本明細書に記載のいくつかの免疫検出方法のいずれか 1 つを使用して、ヒト CTLA-4 またはペプチドと結合する抗体の存在を検出することによって、モニターすることができる。所望の抗体を産生する動物から、B リンパ球を得るために、リンパ系細胞、最も一般的には、脾臓またはリンパ節由来の細胞が取り出される。次いで、B リンパ球を、薬物で感作した骨髓腫細胞融合パートナー、好ましくは、免疫した動物と同一遺伝子であり、必要に応じて他の所望の特性（例えば、内因性 Ig 遺伝子産物、例えば、P3X63-Ag 8.653 (ATCC 番号 CRL 1580); NSO、SP20 を発現することができないこと) を有するものと融合させて、不死の真核細胞系であるハイブリドーマを生成する。

【0188】

リンパ球（例えば、脾臓）細胞および骨髓腫細胞を、膜融合促進剤、例えば、ポリエチレングリコールまたは非イオン性界面活性剤と数分間組み合わせ、次いで、ハイブリドーマ細胞の成長を支持するが、融合していない骨髓腫細胞の成長は支持しない選択培地に、低密度で蒔く。好ましい選択培地は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）である。十分な時間の後に、通常約 1 から 2 週間、細胞のコロニーを観察する。単一のコロニーを単離し、細胞によって産生された抗体を、当技術分野で公知であり、本明細書に記載の種々のイムノアッセイのいずれか 1 つを使用して、ヒト CTLA-4 に対する結合活性について試験することができる。ハイブリドーマをクローニングし（例えば、限

界希釈クローニングまたは軟寒天ブランク単離によって)、C T L A - 4 に対して特異的な抗体を産生する陽性クローンを選択し、培養する。ハイブリドーマ培養物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養物の上清から単離されてもよい。

【 0 1 8 9 】

マウスモノクローナル抗体の産生のための代替方法は、ハイブリドーマ細胞を、同一遺伝子のマウス、例えば、モノクローナル抗体を含有する腹水液の形成を促進するように処置された(例えば、プリスタンでプライミングされた)マウスの腹膜腔に注射することである。モノクローナル抗体は、種々の十分に確立された技法によって、単離および精製することができる。このような単離技法としては、プロテイン A セファロースによる親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる(例えば、Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G(IgG)," in Methods in Molecular Biology, Vol. 10, pages 79-104(The Humana Press, Inc. 1992)を参照されたい)。モノクローナル抗体は、抗体の特定の特性(例えば、重鎖または軽鎖アイソタイプ、結合特異性など)に基づいて選択された適切なリガンドを使用する親和性クロマトグラフィーによって精製することができる。固体支持体上に固定された好適なリガンドの例としては、プロテイン A、プロテイン G、抗定常領域(軽鎖または重鎖)抗体、抗イディオタイプ抗体、および T G F - ベータ結合タンパク質、またはその断片もしくはバリエーションが挙げられる。

【 0 1 9 0 】

モノクローナル抗体は、当技術分野で公知のいずれかの技法を使用して、例えば、免疫スケジュールの完了後に、トランスジェニック動物から回収した脾臓細胞を不死化することによって産生することができる。脾臓細胞は、当技術分野で公知のいずれかの技法を使用して、例えば、脾臓細胞を骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを生成することによって不死化することができる。C T L A - 4 ポリペプチドに結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞系が同定される。このようなハイブリドーマ細胞系、およびこれらによって産生される抗 C T L A - 4 モノクローナル抗体は、本開示に包含される。ハイブリドーマ生成融合手順において使用するための骨髄腫細胞は、好ましくは、非抗体産生性であり、高い融合効率、および所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの成長を支持する特定の選択培地において、骨髄腫細胞が成長することを不可能にする酵素欠損を有する。マウスの融合において使用するための好適な細胞系の例としては、S p - 2 0、P 3 - X 6 3 / A g 8、P 3 - X 6 3 - A g 8 . 6 5 3、N S 1 / 1 . A g 4 1、S p 2 1 0 - A g 1 4、F O、N S O / U、M P C - 1 1、M P C 1 1 - X 4 5 - G T G 1 . 7 および S 1 9 4 / 5 X X 0 B u l が挙げられ; ラットの融合において使用される細胞系の例としては、R 2 1 0 . R C Y 3、Y 3 - A g 1 . 2 . 3、I R 9 8 3 F および 4 B 2 1 0 が挙げられる。細胞融合に有用な他の細胞系は、U - 2 6 6、G M 1 5 0 0 - G R G 2、L I C R - L O N - H M y 2 および U C 7 2 9 - 6 である。ハイブリドーマまたは m A b は、C T L A - 4 に誘導される活性を遮断する能力などの、特定の特性を有する m A b を同定するためにさらにスクリーニングされてもよい。

【 0 1 9 1 】

本開示の抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体であってもよい。C T L A - 4 と特異的に結合する単離された完全ヒト抗体であって、抗原結合タンパク質が、ヒト抗 C T L A - 4 抗体の少なくとも 1 つの i n v i v o 生物活性を有する、単離された完全ヒト抗体が提供される。

7 . 8 . 抗体を生成する方法

【 0 1 9 2 】

完全ヒトモノクローナル抗体は、当業者が精通するいくつかの技法によって生成され得る。このような方法としては、以下に限定されないが、ヒト末梢血細胞(例えば、B リンパ球を含有する)のエプスタインバーウイルス(E B V)形質転換、ヒト B 細胞の i n v i t r o 免疫、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子を保有する免疫化トランスジェニ

10

20

30

40

50

ックマウスからの脾臓細胞の融合、ヒト免疫グロブリンV領域ファージライブラリーからの単離、または当技術分野で公知の、本明細書の開示に基づく他の手順が挙げられる。例えば、完全ヒトモノクローナル抗体は、抗原チャレンジに应答して、特異的ヒト抗体を産生するために操作されたトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスから完全ヒト抗体を得るための方法は、例えば、Green et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg et al., Nature 368:856, 1994; Taylor et al., Int. Immun. 6:579, 1994; 米国特許第5,877,397号; Bruggemann et al., 1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58; Jakobovits et al., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:525-35に記載されている。この技法では、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子座のエLEMENTが、内因性重鎖および軽鎖遺伝子座の標的破壊を含む胚性幹細胞系に由来するマウスの株中に導入される (Bruggemann et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58 (1997)も参照されたい)。例えば、ヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、マウスリンパ組織においてB細胞特異的DNA再編成および超変異を受ける酵母人工染色体上のミニ遺伝子構築物、またはトランス遺伝子座であってもよい。完全ヒトモノクローナル抗体は、その後にCTLA-4に対して特異的なヒト抗体を産生することができるトランスジェニックマウスを免疫することによって得ることができる。本明細書に記載の方法に従って、免疫したトランスジェニックマウスのリンパ系細胞を使用して、ヒト抗体を分泌するハイブリドーマを生成することができる。完全ヒト抗体を含有するポリクローナル血清は、免疫した動物の血液から得ることもできる。

【0193】

本開示のヒト抗体を生成するための別の方法は、EBV形質転換によって、ヒト末梢血細胞を不死化させるステップを含む。例えば、米国特許第4,464,456号を参照されたい。CTLA-4と特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する、このような不死化されたB細胞系(またはリンパ芽球様細胞系)は、本明細書において提供される免疫検出方法、例えば、ELISAによって同定し、次いで、標準的クローニング技法によって単離することができる。抗CTLA-4抗体を産生するリンパ芽球様細胞系の安定性は、当技術分野で公知の方法に従って、形質転換された細胞系をマウス骨髓腫細胞と融合させて、マウス-ヒトハイブリッド細胞系を生成することによって改善することができる(例えば、Glasky et al., Hybridoma 8:377-89(1989)を参照されたい)。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのさらに別の方法は、ヒト脾B細胞をヒトCTLA-4でプライミングし、その後、プライミングされたB細胞をヘテロハイブリッド融合パートナーと融合させることを含む、*in vitro*免疫である。例えば、Boerner et al., 1991 J. Immunol. 147:86-95を参照されたい。

【0194】

ある特定の実施形態では、抗ヒトCTLA-4抗体を産生しているB細胞が選択され、軽鎖および重鎖可変領域は、当技術分野で公知であり(WO 92/02551; 米国特許第5,627,052号; Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48(1996))、本明細書に記載の分子生物学の技法に従って、B細胞からクローニングされる。免疫した動物由来のB細胞は、CTLA-4と特異的に結合する抗体を産生している細胞を選択することによって、脾臓、リンパ節、または末梢血試料から単離されてもよい。B細胞は、ヒトから、例えば、末梢血試料から単離されてもよい。

【0195】

例えば、プラーク形成、蛍光活性化細胞選別、*in vitro*での刺激と、その後の特異的抗体の検出などによる、所望の特異性を有する抗体を産生している単一のB細胞を検出するための方法は、当技術分野で周知である。特異的抗体を産生するB細胞の選択のための方法は、例えば、ヒトCTLA-4を含有する軟寒天において、B細胞の単一細胞懸濁物を調製するステップを含む。B細胞によって産生される特異的抗体の抗原との結合によって、免疫沈降物として視認することができる複合体の形成がもたらされる。

【0196】

一部の実施形態では、特異的抗体を産生するB細胞は、自然に対合した抗体の同定を可

能にする方法を使用することによって選択される。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Adler et al., A natively paired antibody library yields drug leads with higher sensitivity and specificity than a randomly paired antibody library, MAbs(2018)に記載された方法を用いることができる。本方法は、Adler et al.から採用された、図1にまとめられたマイクロ流体技術、分子ゲノミクス、酵母単鎖可変断片(s c F v)ディスプレイ、蛍光標識細胞分取(FACS)およびディープシーケンシングを組み合わせる。要するに、B細胞は、免疫した動物から単離され、次いでプールされ得る。B細胞は、オリゴdTビーズおよび溶解溶液を用いて液滴に被包され、mRNAが結合したビーズが液滴から精製され、次いで、重鎖および軽鎖Igが自然に対合したs c F vをコードするDNAアンプリコンを生成するOE-RT-PCR増幅ミックスを含む第2のエマルジョン中に注入される。次いで、自然に対合したアンプリコンのライブラリーを、s c F vディスプレイのために酵母中に電気穿孔させる。FACSを使用して、高親和性s c F vを同定する。最後に、抗体のディープシーケンシングを使用して、選別前後のs c F vライブラリーにおける全てのクローンを同定することができる。

【0197】

所望の抗体を産生するB細胞を選択した後で、当技術分野で公知であり、本明細書に記載の方法に従って、DNAまたはmRNAを単離および増幅することによって、特異的抗体遺伝子がクローニングされてもよい。

【0198】

本開示の抗体を得るための方法は、当技術分野で公知の様々なファージディスプレイ技術も採用することができる。例えば、Winter et al., 1994 Annu. Rev. Immunol. 12:433-55; Burton et al., 1994 Adv. Immunol. 57:191-280を参照されたい。ヒトまたはマウスの免疫グロブリン可変領域遺伝子のコンビナトリアルライブラリーは、CTLA-4に結合するタンパク質またはそのバリエーションもしくは断片と特異的に結合するIg断片(Fab、Fv、sFv、またはその多量体)を選択するためにスクリーニングされ得るファージベクターにおいて作出することができる。例えば、米国特許第5,223,409号; Huse et al., 1989 Science 246:1275-81; Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-32(1989); Alting-Mees et al., Strategies in Molecular Biology 3:1-9(1990); Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-66; Hoogenboom et al., 1992 J. Molec. Biol. 227:381-388; Schlebusch et al., 1997 Hybridoma 16:47-52およびこれらにおいて引用される参照文献を参照されたい。例えば、Ig可変領域断片をコードする複数のポリヌクレオチド配列を含有するライブラリーは、ファージコートタンパク質をコードする配列と共にインフレイムで、M13またはそのバリエーションなどの糸状バクテリオファージのゲノム中に挿入されてもよい。融合タンパク質は、コートタンパク質の、軽鎖可変領域ドメインおよび/または重鎖可変領域ドメインとの融合体であってもよい。ある特定の実施形態によれば、免疫グロブリンFab断片は、ファージ粒子上にもディスプレイされ得る(例えば、米国特許第5,698,426号を参照されたい)。

【0199】

マイナーコートタンパク質などの別のタンパク質に融合した抗体断片を使用して、抗原を用いてファージを富化することもできる。次いで、抗原(例えば、CTLA-4)に免疫のあるマウス由来の再編成された重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)のランダムコンビナトリアルライブラリーを使用して、抗体断片の多様なライブラリーがファージの表面にディスプレイされる。これらのライブラリーは、相補的可変ドメイン、および例えば、アフィニティークラムによって精製されたドメインに関してスクリーニングすることができる。Clackson et al., Nature, V. 352 pp. 624-628(1991)を参照されたい。

【0200】

重鎖および軽鎖免疫グロブリンcDNA発現ライブラリーは、例えば、Immuno Zap(商標)(H)およびImmuno Zap(商標)(L)ベクター(Strat

10

20

30

40

50

agene、La Jolla、California)を使用して、ラムダファージにおいて調製されてもよい。簡潔には、mRNAは、B細胞集団から単離され、ImmunoZap(H)およびImmunoZap(L)ベクターにおける重鎖および軽鎖免疫グロブリンcDNA発現ライブラリーを作出するために使用される。これらのベクターは、個々にスクリーニングされても、またはFab断片もしくは抗体を形成するために共発現されてもよい(Huse et al., 上掲を参照されたい; Sastry et al., 上掲も参照されたい)。次に、陽性プラークは、非溶解性プラスミドに変換されて、E. coliからのモノクローナル抗体断片の高レベルでの発現を可能にする。

【0201】

一実施形態では、ハイブリドーマにおいて、目的のモノクローナル抗体を発現する遺伝子の可変領域は、ヌクレオチドプライマーを使用して増幅される。これらのプライマーは、当業者によって合成されてもよく、または市販の供給源から購入されてもよい。(例えば、とりわけ、V_Ha、V_Hb、V_Hc、V_Hd、C_H1、V_LおよびC_L領域に対するプライマーを含むマウスおよびヒトの可変領域に対するプライマーを販売するStratagene(La Jolla、California)を参照されたい)。これらのプライマーを使用して、重鎖または軽鎖可変領域を増幅させ、次いで、それぞれ、ImmunoZAP(商標)HまたはImmunoZAP(商標)L(Stratagene)などのベクター中に挿入されてもよい。次いで、これらのベクターは、発現のために、E. coli、酵母、または哺乳動物ベースの系に、導入されてもよい。V_HおよびV_Lドメインの融合体を含有する多量の単鎖タンパク質は、これらの方法(Bird et al., Science 242:423-426, 1988を参照されたい)を使用して産生されてもよい。

【0202】

本開示による抗体を産生する細胞が、上記免疫および他の技法のいずれかを使用して得られたら、本明細書に記載される標準手順により、そこからDNAまたはmRNAを単離および増幅することによって、特異的抗体の遺伝子をクローニングしてもよい。そこから産生される抗体をシーケンシングして、CDRを同定し、CDRをコードするDNAを、本開示に従って、以前に記載したように操作して、他の抗体を生成する。

【0203】

本開示のCTLA-4結合剤は、好ましくは、本明細書に記載の細胞に基づくアッセイおよび/もしくは本明細書に記載のin vivoアッセイにおいて、CTLA-4の機能をモジュレートし、ならびに/または本明細書に記載のドメインのうちの1つもしくは複数に結合するおよび/もしくは本出願に記載の抗体のうちの1つの結合を交差遮断する(cross-block)および/もしくは本出願に記載の抗体のうちの1つによってCTLA-4に結合することから交差遮断される。したがって、このような結合剤は、本明細書に記載のアッセイを使用して同定することができる。

【0204】

ある特定の実施形態では、抗体は、本明細書において提供されるドメインのうちの1つもしくは複数と結合するならびに/または本明細書に記載の細胞に基づくアッセイおよび/もしくはin vivoアッセイにおいて中和するおよび/もしくは本出願に記載の抗体を交差遮断するおよび/もしくは本出願に記載の抗体のうちの1つによってCTLA-4に結合することから交差遮断される抗体を、最初に同定することによって生成される。次いで、これらの抗体由来のCDR領域を使用して、適切な生体適合性フレームワークに挿入して、CTLA-4結合剤を生成する。結合剤の非CDR部分は、アミノ酸から構成されていてもよく、または非タンパク質分子であってもよい。本明細書に記載のアッセイは、結合剤の特徴付けを可能にする。好ましくは、本開示の結合剤は、本明細書において定義される抗体である。

【0205】

本開示による他の抗体は、本明細書に記載され、当技術分野で公知の従来の免疫および細胞融合手順によって得られてもよい。

【0206】

また、抗体結合部位の中心における相補性決定領域（CDR）の分子進化を使用して、親和性の増加した抗体、例えば、Schier et al., 1996, J. Mol. Biol. 263:551に記載されるc - e r b B - 2に関する親和性の増加を有する抗体を単離している。したがって、このような技法は、CTL A - 4に対する抗体を調製する際に有用である。CTL A - 4を対象とする抗原結合タンパク質を、例えば、in vitroまたはin vivoのいずれかで、CTL A - 4ポリペプチドの存在を検出するアッセイにおいて使用することができる。抗原結合タンパク質は、免疫親和性クロマトグラフィーによってCTL A - 4タンパク質を精製する際に、用いられてもよい。

【0207】

ヒト抗体、部分的ヒト抗体、またはヒト化抗体は、多くの適用、特に、抗体のヒト対象への投与に關与する適用に適しているが、他の種類の抗原結合タンパク質は、ある特定の適用に適している。本開示の非ヒト抗体は、例えば、いずれかの抗体産生動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ロバ、または非ヒト霊長類（例えばサル（例えばカニクイザルまたはアカゲザル）もしくは類人猿（例えばチンパンジー））に由来し得る。特定の種由来の抗体は、例えば、その種の動物を所望の免疫原（例えば、CTL A - 4ポリペプチド）で免疫するかもしれないその種の抗体を生成するための人工的システム（例えば、特定の種の抗体を生成するための細菌またはファージディスプレイに基づくシステム）を使用することによって、またはある種に由来する抗体を、例えば、抗体の定常領域を別の種に由来する定常領域で置き換えることにより、もしくは抗体が、他の種由来の抗体の配列により近似するように、抗体の1もしくは複数のアミノ酸残基を置き換えることにより、別の種由来の抗体へと変換することによって、作製することができる。一実施形態では、抗体は、2つまたはそれより多い異なる種由来の抗体に由来するアミノ酸配列を含むキメラ抗体である。

【0208】

抗原結合タンパク質は、いくつかの従来の技法のいずれかによって、調製され、所望の特性についてスクリーニングされてもよい。一部の技法は、目的の抗原結合タンパク質（例えば、抗CTL A - 4抗体）のポリペプチド鎖（またはその部分）をコードする核酸を単離すること、および組換えDNA技術によって核酸を操作することに関与する。核酸は、目的の別の核酸に融合されてもよく、または、例えば、1つもしくは複数のアミノ酸残基を付加、欠失、もしくは置換して変更されてもよい（例えば、変異誘発または他の従来の技法によって）。さらに、抗原結合タンパク質は、それらを自然に発現する細胞から精製するか（例えば、抗体は、それを産生するハイブリドーマから精製することができる）、または当技術分野で公知のいずれかの技法を使用して、組換え発現系で産生されてもよい。例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al.(eds.), Plenum Press, New York(1980);およびAntibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Land(eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,(1988)を参照されたい。

【0209】

当技術分野で公知のいずれかの発現系を使用して、本開示の組換えポリペプチドを作製することができる。発現系は、上記で包括的に詳述されている。一般に、宿主細胞は、所望のポリペプチドをコードするDNAを含む組換え発現ベクターで形質転換される。用いられてもよい宿主細胞の中には、原核生物、酵母またはより高等な真核生物の細胞がある。原核生物としては、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、E . c o l iまたはB a c i l l iが挙げられる。より高等な真核細胞としては、昆虫細胞および哺乳類起源の確立された細胞系が挙げられる。好適な哺乳類宿主細胞系の例としては、サル腎臓細胞（ATCC CRL 1651）（Gluzman et al., 1981, Cell 23:175）のCOS-7系、L細胞、293細胞、C127細胞、3T3細胞（ATCC CCL 163）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、BHK（ATCC CRL 10）細胞系、およびMcMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821に記載されるアフリカミドリザルの腎臓細胞系CVI（ATCC CCL 70）由来のCVI / EBNA

細胞系が挙げられる。細菌、真菌、酵母、および哺乳類細胞宿主に関して使用するための適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Pouwels et al.(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985)に記載されている。

【0210】

本開示の抗体は、抗体が結合特異性を保持する限り、少なくとも1つのアミノ酸置換を有してもよいことが認識される。したがって、抗体構造の改変は、本開示の範囲内に包含される。これらは、抗体のCTLA-4結合能を破壊しない保存的であっても非保存的であってもよい、アミノ酸置換を含んでもよい。保存的アミノ酸置換は、典型的には、生体系における合成によるよりも化学ペプチド合成によって組み込まれる、天然に存在しないアミノ酸残基を包含し得る。これらは、ペプチド模倣体およびアミノ酸部分の他の逆転または反転形態を含む。保存的アミノ酸置換は、その位置におけるアミノ酸残基の極性または荷電にほとんど影響を及ぼさないかまたは全く影響を及ぼさないような、天然アミノ酸残基の規範的残基による置換に関与してもよい。

10

【0211】

非保存的置換は、1つのクラスのアミノ酸またはアミノ酸模倣体のメンバーの、異なる物理特性（例えば、サイズ、極性、疎水性、荷電）を有する別のクラスに由来するメンバーへの交換にも関与してもよい。このような置換された残基は、非ヒト抗体と相同であるヒト抗体の領域、または分子の非相同領域へと導入されてもよい。

【0212】

さらに、当業者は、各所望のアミノ酸残基において、単一のアミノ酸置換を含有する試験バリエーションを生成することができる。次いで、当業者に公知の活性アッセイを使用して、バリエーションをスクリーニングすることができる。このようなバリエーションを使用して、好適なバリエーションの情報を収集することができる。例えば、特定のアミノ酸残基への変化が、破壊されたか、不必要に低下したか、または好適ではない活性をもたらすことが発見された場合、このような変化を有するバリエーションは避けられてもよい。言い換えれば、このような日常の実験から収集された情報に基づき、当業者は、さらなる置換が、単独でまたは他の変異と組み合わせて回避されるべきアミノ酸を容易に決定することができる。

20

【0213】

当業者は、周知の技法を使用して、本明細書に示されるポリペプチドの好適なバリエーションを決定することができる。ある特定の実施形態では、当業者は、活性に対して重要であると考えられていない領域を標的とすることによって、活性を破壊することなく変化させることができる分子の好適なエリアを同定することができる。ある特定の実施形態では、類似するポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定することができる。ある特定の実施形態では、生物活性または構造にとって重要であり得るエリアさえも、生物活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に有害な影響を及ぼすことなく、保存的アミノ酸置換に供されてもよい。

30

【0214】

さらに、当業者は、活性または構造にとって重要である、類似するポリペプチドにおける残基を同定するための構造-機能研究を精査することができる。このような比較に鑑みて、類似するタンパク質の活性または構造にとって重要であるアミノ酸残基に対応するタンパク質のアミノ酸残基の重要性を予測することができる。当業者は、このような予測される重要なアミノ酸残基に対して化学的に類似するアミノ酸置換を選択してもよい。

40

【0215】

当業者は、類似するポリペプチドの三次元構造に関連するその構造およびアミノ酸配列を解析することもできる。このような情報に鑑みて、当業者は、その三次元構造に関して、抗体のアミノ酸残基のアラインメントを予測することができる。ある特定の実施形態では、タンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基は他の分子との重要な相互作用に関与し得るので、当業者は、このような残基に対して急激な変化が起こらないように選択することができる。

【0216】

50

いくつかの科学論文が、二次構造の予測に貢献している。Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427(1996)、Chou et al., Biochem., 13(2):222-245(1974); Chou et al., Biochem., 113(2):211-222(1974); Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978); Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47:251-276およびChou et al., Biophys. J., 26:367-384(1979)を参照されたい。さらに、二次構造の予測を助長するために、コンピュータープログラムが現在利用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%を超える配列同一性、または40%を超える類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、類似する構造トポロジーを有することが多い。ポリペプチドまたはタンパク質の構造内での潜在的な数の折り畳みを含む、タンパク質構造データベース(PDB)の最近の発展は、二次構造の増強された予測性をもたらしている。Holm et al., Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999)を参照されたい。所与のポリペプチドまたはタンパク質には制限された数の折り畳みが存在し、臨界数の構造が一旦解明されると、構造の予測は、劇的により正確になることが示唆されている(Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997))。

【0217】

二次構造を予測する追加の方法としては、「スレッディング(threading)」(Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87(1997); Sippl et al., Structure, 4(1):15-19(1996))、「プロファイル解析」(Bowie et al., Science, 253:164-170(1991); Gribskov et al., Meth. Enzym., 183:146-159(1990); Gribskov et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358(1987))、および「進化的連結」(Holm、上掲(1999)、およびBrenner、上掲(1997))を参照)が挙げられる。

【0218】

ある特定の実施形態では、抗体のバリエーションは、グリコシル化部位の数および/または種類が、親ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、変更されているグリコシル化バリエーションを含む。ある特定の実施形態では、バリエーションは、天然のタンパク質よりも多いかまたは少ない数のN連結グリコシル化部位を含む。N連結グリコシル化部位は、配列: Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xとして示されたアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であってもよい。この配列を作出するアミノ酸残基の置換によって、N連結炭水化物鎖の付加のための新たな可能な部位がもたらされる。あるいは、この配列を取り除く置換は、既存のN連結炭水化物鎖を除去する。1つまたは複数のN連結グリコシル化部位(典型的には、天然に存在するもの)が除外され、1つまたは複数の新たなN連結部位が作出されるN連結炭水化物鎖の再配列ももたらされる。追加の好ましい抗体バリエーションは、1つまたは複数のシステイン残基が、親アミノ酸配列と比較して、欠失しているかまたは別のアミノ酸(例えば、セリン)に置換されているシステインバリエーションを含む。システインバリエーションは、例えば不溶性封入体の単離後に、抗体が生物学的に活性な立体構造へと再度折り畳まれなければならない場合に有用となり得る。システインバリエーションは、一般に、天然のタンパク質よりも少ないシステイン残基を有し、典型的には、対合していないシステインから生じる相互作用を最小化するために偶数を有する。

【0219】

所望のアミノ酸置換(保存的であるかまたは非保存的であるかにかかわらず)は、このような置換が望まれる時点で、当業者によって決定され得る。ある特定の実施形態では、アミノ酸置換を使用して、本明細書に記載のCTLA-4に対する抗体の重要な残基を同定するか、またはCTLA-4に対する抗体の親和性を増加もしくは低下させることができる。

【0220】

ある特定の実施形態によれば、好ましいアミノ酸置換は、(1)タンパク質分解に対する感受性を低下させる、(2)酸化に対する感受性を低下させる、(3)タンパク質複合

10

20

30

40

50

体を形成するための結合親和性を変更する、(4) 結合親和性を変更する、および/または(4)このようなポリペプチドに関する他の生理化学または機能特性を付与もしくは改変するものである。ある特定の実施形態によれば、単一または複数のアミノ酸置換(ある特定の実施形態では、保存的アミノ酸置換)は、天然に存在する配列においてなされてもよい(ある特定の実施形態では、分子間接触を形成するドメイン(複数可)の外側のポリペプチドの部分)。ある特定の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、典型的には、親配列の構造的特徴を実質的に変化させなくてもよい(例えば、アミノ酸の置き換えは、親配列に存在するヘリックスを切断するか、または親配列を特徴付ける他のタイプの二次構造を破壊する傾向にあるべきではない)。当技術分野で認識されるポリペプチドの二次および三次構造の例は、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる、Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York(1984)); Introduction to Protein Structure(C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y.(1991)); およびThornton et al. Nature 354:105(1991)に記載されている。

10

【0221】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、ポリマー、脂質、または他の部分と化学的に結合していてもよい。

【0222】

結合剤は、生体適合性フレームワーク構造中に組み込まれる、本明細書に記載のCDRの少なくとも1つを含んでもよい。一例では、生体適合性フレームワーク構造は、局在化した表面領域において、抗原(例えば、CDR、可変領域など)と結合するアミノ酸のうちの1つまたは複数の配列をディスプレイすることができる、立体構造として安定な構造支持体、またはフレームワーク、または足場を形成するのに十分であるポリペプチドまたはその部分を含む。このような構造は、天然に存在するポリペプチドもしくはポリペプチド「折り畳み」(構造モチーフ)であってもよく、または天然に存在するポリペプチドもしくは折り畳みに対して、アミノ酸の付加、欠失もしくは置換などの1つもしくは複数の改変を有してもよい。これらの足場は、ヒト、他の哺乳動物、他の脊椎動物、無脊椎動物、植物、細菌またはウイルスなどのいずれかの種の(または2種以上の種の)ポリペプチドに由来し得る。

20

【0223】

典型的には、生体適合性フレームワーク構造は、免疫グロブリンドメイン以外のタンパク質足場または骨格に基づく。例えば、フィブロネクチン、アンキリン、リボカリン、ネオカルジノスタチン(neocarzinostatin)、チトクロムb、CP1ジンクフィンガー、PST1、コイルドコイル、LACI-D1、Zドメインおよびテングミスタットドメインに基づくものを使用することができる(例えば、Nygren and Uhlen, 1997, Curr. Opin. In Struct. Biol., 7, 463-469を参照されたい)。

30

【0224】

ヒト化抗体は、当業者に公知の技法を使用して産生することができる(Zhang, W., et al., Molecular Immunology. 42(12):1445-1451, 2005; Hwang W. et al., Methods. 36(1):35-42, 2005; Dall'Acqua WF, et al., Methods 36(1):43-60, 2005; およびClark, M., Immunology Today. 21(8):397-402, 2000)。

40

【0225】

さらに、当業者は、好適な結合剤が、これらの抗体の部分、例えば、本明細書に具体的に開示されているように、配列番号1001~1028を有するCDR1-L1から28; 配列番号2001~2028を有するCDR2-L1から28; 配列番号3001~3028を有するCDR3-L1から28; 配列番号4001~4028を有するCDR1-H1から28; 配列番号5001~5028を有するCDR2-H1から28; および配列番号6001~6028を有するCDR3-H1から28のうちの1つまたは複数を含むことを認識する。CDR領域の領域の少なくとも1つは、抗体が、置換されていないCDRの結合特異性を保持する限り、ここで提供される配列から、少なくとも1つのアミ

50

ノ酸置換を有してもよい。抗体の非CDR部分は、非タンパク質分子であってもよく、ここで、結合剤は、本明細書に開示される抗体のCTLA-4に対する結合を交差遮断する、および/またはCTLA-4を中和する。抗体の非CDR部分は、抗体が、抗体A1～A28の少なくとも1つによって示されるもののように、競合結合アッセイにおいてヒトCTLA-4ペプチドへの類似する結合パターンを示す、および/またはCTLA-4を中和する非タンパク質分子であってもよい。抗体の非CDR部分は、アミノ酸から構成されていてもよく、ここで、抗体は、組換え結合タンパク質または合成ペプチドであり、組換え結合タンパク質は、本明細書に開示される抗体のCTLA-4との結合を交差遮断する、および/またはCTLA-4を中和する。抗体の非CDR部分は、アミノ酸から構成されていてもよく、ここで、抗体は、組換え抗体であり、組換え抗体は、抗体A1～A28の少なくとも1つによって示されるもののように、ヒトCTLA-4ペプチドエピートプ競合結合アッセイ（本明細書の以下に記載される）においてヒトCTLA-4ペプチドへの類似する結合パターンを示す、および/またはCTLA-4を中和する。

10

【0226】

抗体は、上記のCDR1-H、CDR2-H、CDR3-H、CDR1-L、CDR2-LおよびCDR3-Lのうちの1つまたは複数を含み、抗体は、これらの配列をコードするDNAを含有する宿主細胞からの発現によって得られてもよい。各CDR配列をコードするDNAは、CDRのアミノ酸配列に基づいて決定され、オリゴヌクレオチド合成技法、部位特異的変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技法を適宜使用して、任意の所望の抗体可変領域フレームワークおよび定常領域DNA配列と一緒に合成されてもよい。可変領域フレームワークおよび定常領域をコードするDNAは、GenBank（登録商標）などの遺伝子配列データベースから、当業者に広く利用可能である。

20

【0227】

一旦合成されると、本開示の抗体をコードするDNAまたはその断片は、核酸の切除、ライゲーション、形質転換、およびいくつかの公知の発現ベクターを使用するトランスフェクションのための種々の周知の手順のいずれかに従って、増幅および発現され得る。よって、ある特定の実施形態では、抗体断片の発現は、原核生物宿主、例えば*Escherichia coli*において好ましい場合がある（例えば、Plueckthun et al., 1989 Methods Enzymol. 178:497-515を参照されたい）。ある特定の他の実施形態では、抗体またはその断片の発現は、酵母（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、および*Pichia pastoris*）を含む真核生物宿主細胞、動物細胞（哺乳類細胞を含む）または植物細胞において好ましい場合がある。好適な動物細胞の例としては、以下に限定されないが、骨髓腫細胞（マウスNSO系など）、COS細胞、CHO細胞、またはハイブリドーマ細胞が挙げられる。植物細胞の例としては、タバコ、トウモロコシ、ダイズ、およびコメの細胞が挙げられる。

30

【0228】

抗体の可変および/または定常領域をコードするDNAを含有する1つまたは複数の複製可能な発現ベクターが調製され、適切な細胞系、例えば、非産生骨髓腫細胞系、例えば、抗体の産生が生じるマウスNSO系または細菌、例えば*E. coli*を形質転換するために使用され得る。効率的な転写および翻訳を得るために、各ベクターにおけるDNA配列は、適切な調節配列、特にプロモーターおよび可変ドメイン配列に作動可能に連結されるリーダー配列を含むべきである。このように抗体を産生するための特定の方法は、一般的に周知であり、日常的に使用される。例えば、基礎分子生物学の手順は、Maniatis et al.(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; Maniatis et al, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York,(2001)も参照されたい)に記載されている。DNA配列決定は、Sanger et al.(PNAS 74:5463,(1977))およびAmersham International plc sequencing handbookに記載されているように実施することができ、部位特異的変異誘発は、当技術分野で公知の方法に従って行うことができる（Kramer et al.,

40

50

Nucleic Acids Res. 12:9441,(1984); Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92(1985); Kunkel et al., Methods in Enzymol. 154:367-82(1987); the Anglian Biotechnology Ltd. handbook)。さらに、多数の刊行物には、DNAの操作、発現ベクターの作出、ならびに適切な細胞の形質転換および培養による抗体の調製に好適な技法が記載される (Mountain A and Adair, J R in Biotechnology and Genetic Engineering Reviews(ed. Tombs, M P, 10, Chapter 1, 1992, Intercept, Andover, UK); "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel(ed.), Wiley Interscience, New York)。

【0229】

本開示による抗体の親和性を改善することが望ましい場合、上述のCDRのうちの1つまたは複数を含むことは、CDRを維持すること (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995)、チェーンシャッフリング (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)、E. coli. の変異株の使用 (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 350-368, 1996)、DNAシャッフリング (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997)、ファージディスプレイ (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 7-88, 1996) およびセクシャルPCR (Cramer, et al., Nature, 391, 288-291, 1998) を含むいくつかの親和性成熟プロトコールによって得ることができる。親和性成熟のこれらの方法の全ては、Vaughan et al.(Nature Biotech., 16, 535-539, 1998)によって議論されている。

【0230】

抗体などの一部のタンパク質は、種々の翻訳後修飾を受けることがあることは当業者によって理解される。これらの修飾の種類および程度は、タンパク質を発現するために使用される宿主細胞系および培養条件に応じて変わることが多い。このような修飾は、グリコシル化、メチオニン酸化、ジケトピペリジン形成、アスパラギン酸異性化およびアスパラギンの脱アミド化の変化を含み得る。頻度の高い修飾は、カルボキシペプチダーゼの作用によるカルボキシ末端の塩基性残基 (例えば、リシンまたはアルギニン) の損失である (Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995に記載されているように)。

7.9. 配列

【0231】

抗体A1～A28は、重鎖および軽鎖V(J)Dポリヌクレオチド (本明細書において、それぞれ、L1～L28およびH1～H28とも称される) を含む。抗体A1～A28は、表5に列挙された配列を含む。例えば、抗体A1は、軽鎖L1 (配列番号1) および重鎖H1 (配列番号101) を含む。軽鎖 (L1～L28) および重鎖 (H1～H28) のCDR配列は、特定の配列番号も付される。例えば、L1に関する3つのCDR配列 (CDR1、CDR2およびCDR3) は、それぞれ、CDR1-L1 (配列番号1001)、CDR2-L1 (配列番号2001) およびCDR3-L1 (配列番号3001) であり、H1に関する3つのCDR配列 (CDR1、CDR2およびCDR3) は、CDR1-H1 (配列番号4001)、CDR2-H1 (配列番号5001) およびCDR3-H1 (配列番号6001) である。

10

20

30

40

【表 5 - 1】

表 5		
抗体	軽鎖	重鎖
A1	L1(配列番号 1) L1 は、CDR1-L1(配列番号 1001)、CDR2-L1(配列番号 2001)および CDR3-L1(配列番号 3001)を含む	H1(配列番号 101) H1 は、CDR1-H1(配列番号 4001)、CDR2-H1(配列番号 5001)および CDR3-H1(配列番号 6001)を含む
A2	L2(配列番号 2) L2 は、CDR1-L2(配列番号 1002)、CDR2-L2(配列番号 2002)および CDR3-L2(配列番号 3002)を含む	H2(配列番号 102) H2 は、CDR1-H2(配列番号 4002)、CDR2-H2(配列番号 5002)および CDR3-H2(配列番号 6002)を含む
A3	L3(配列番号 3) L3 は、CDR1-L3(配列番号 1003)、CDR2-L3(配列番号 2003)および CDR3-L3(配列番号 3003)を含む	H3(配列番号 103) H3 は、CDR1-H3(配列番号 4003)、CDR2-H3(配列番号 5003)および CDR3-H3(配列番号 6003)を含む
A4	L4(配列番号 4) L4 は、CDR1-L4(配列番号 1004)、CDR2-L4(配列番号 2004)および CDR3-L4(配列番号 3004)を含む	H4(配列番号 104) H4 は、CDR1-H4(配列番号 4004)、CDR2-H4(配列番号 5004)および CDR3-H4(配列番号 6004)を含む
A5	L5(配列番号 5) L5 は、CDR1-L5(配列番号 1005)、CDR2-L5(配列番号 2005)および CDR3-L5(配列番号 3005)を含む	H5(配列番号 105) H5 は、CDR1-H5(配列番号 4005)、CDR2-H5(配列番号 5005)および CDR3-H5(配列番号 6005)を含む
A6	L6(配列番号 6) L6 は、CDR1-L6(配列番号 1006)、CDR2-L6(配列番号 2006)および CDR3-L6(配列番号 3006)を含む	H6(配列番号 106) H6 は、CDR1-H6(配列番号 4006)、CDR2-H6(配列番号 5006)および CDR3-H6(配列番号 6006)を含む
A7	L7(配列番号 7) L7 は、CDR1-L7(配列番号 1007)、CDR2-L7(配列番号 2007)および CDR3-L7(配列番号 3007)を含む	H7(配列番号 107) H7 は、CDR1-H7(配列番号 4007)、CDR2-H7(配列番号 5007)および CDR3-H7(配列番号 6007)を含む
A8	L8(配列番号 8) L8 は、CDR1-L8(配列番号 1008)、CDR2-L8(配列番号 2008)および CDR3-L8(配列番号 3008)を含む	H8(配列番号 108) H8 は、CDR1-H8(配列番号 4008)、CDR2-H8(配列番号 5008)および CDR3-H8(配列番号 6008)を含む
A9	L9(配列番号 9) L9 は、CDR1-L9(配列番号 1009)、CDR2-L9(配列番号 2009)および CDR3-L9(配列番号 3009)を含む	H9(配列番号 109) H9 は、CDR1-H9(配列番号 4009)、CDR2-H9(配列番号 5009)および CDR3-H9(配列番号 6009)を含む
A10	L10(配列番号 10) L10 は、CDR1-L10(配列番号 1010)、CDR2-L10(配列番号 2010)および CDR3-L10(配列番号 3010)を含む	H10(配列番号 110) H10 は、CDR1-H10(配列番号 4010)、CDR2-H10(配列番号 5010)および CDR3-H10(配列番号 6010)を含む

10

20

30

40

【表 5 - 2】

A11	L11(配列番号 11) L11 は、CDR1-L11(配列番号 1011)、CDR2-L11(配列番号 2011)および CDR3-L11(配列番号 3011)を含む	H11(配列番号 111) H11 は、CDR1-H11(配列番号 4011)、CDR2-H11(配列番号 5011)および CDR3-H11(配列番号 6011)を含む
A12	L12(配列番号 12) L12 は、CDR1-L12(配列番号 1012)、CDR2-L12(配列番号 2012)および CDR3-L12(配列番号 3012)を含む	H12(配列番号 112) H12 は、CDR1-H12(配列番号 4012)、CDR2-H12(配列番号 5012)および CDR3-H12(配列番号 6012)を含む
A13	L13(配列番号 13) L13 は、CDR1-L13(配列番号 1013)、CDR2-L13(配列番号 2013)および CDR3-L13(配列番号 3013)を含む	H13(配列番号 113) H13 は、CDR1-H13(配列番号 4013)、CDR2-H13(配列番号 5013)および CDR3-H13(配列番号 6013)を含む
A14	L14(配列番号 14) L14 は、CDR1-L14(配列番号 1014)、CDR2-L14(配列番号 2014)および CDR3-L14(配列番号 3014)を含む	H14(配列番号 114) H14 は、CDR1-H14(配列番号 4014)、CDR2-H14(配列番号 5014)および CDR3-H14(配列番号 6014)を含む
A15	L15(配列番号 15) L15 は、CDR1-L15(配列番号 1015)、CDR2-L15(配列番号 2015)および CDR3-L15(配列番号 3015)を含む	H15(配列番号 115) H15 は、CDR1-H15(配列番号 4015)、CDR2-H15(配列番号 5015)および CDR3-H15(配列番号 6015)を含む
A16	L16(配列番号 16) L16 は、CDR1-L16(配列番号 1016)、CDR2-L16(配列番号 2016)および CDR3-L16(配列番号 3016)を含む	H16(配列番号 116) H16 は、CDR1-H16(配列番号 4016)、CDR2-H16(配列番号 5016)および CDR3-H16(配列番号 6016)を含む
A17	L17(配列番号 17) L17 は、CDR1-L17(配列番号 1017)、CDR2-L17(配列番号 2017)および CDR3-L17(配列番号 3017)を含む	H17(配列番号 117) H17 は、CDR1-H17(配列番号 4017)、CDR2-H17(配列番号 5017)および CDR3-H17(配列番号 6017)を含む
A18	L18(配列番号 18) L18 は、CDR1-L18(配列番号 1018)、CDR2-L18(配列番号 2018)および CDR3-L18(配列番号 3018)を含む	H18(配列番号 118) H18 は、CDR1-H18(配列番号 4018)、CDR2-H18(配列番号 5018)および CDR3-H18(配列番号 6018)を含む
A19	L19(配列番号 19) L19 は、CDR1-L19(配列番号 1019)、CDR2-L19(配列番号 2019)および CDR3-L19(配列番号 3019)を含む	H19(配列番号 119) H19 は、CDR1-H19(配列番号 4019)、CDR2-H19(配列番号 5019)および CDR3-H19(配列番号 6019)を含む
A20	L20(配列番号 20) L20 は、CDR1-L20(配列番号 1020)、CDR2-L20(配列番号 2020)および CDR3-L20(配列番号 3020)を含む	H20(配列番号 120) H20 は、CDR1-H20(配列番号 4020)、CDR2-H20(配列番号 5020)および CDR3-H20(配列番号 6020)を含む

10

20

30

40

【表 5 - 3】

A21	L21(配列番号 21) L21 は、CDR1-L21(配列番号 1021)、CDR2-L21(配列番号 2021)および CDR3-L21(配列番号 3021)を含む	H21(配列番号 121) H21 は、CDR1-H21(配列番号 4021)、CDR2-H21(配列番号 5021)および CDR3-H21(配列番号 6021)を含む
A22	L22(配列番号 22) L22 は、CDR1-L22(配列番号 1022)、CDR2-L22(配列番号 2022)および CDR3-L22(配列番号 3022)を含む	H22(配列番号 122) H22 は、CDR1-H22(配列番号 4022)、CDR2-H22(配列番号 5022)および CDR3-H22(配列番号 6022)を含む
A23	L23(配列番号 23) L23 は、CDR1-L23(配列番号 1023)、CDR2-L23(配列番号 2023)および CDR3-L23(配列番号 3023)を含む	H23(配列番号 123) H23 は、CDR1-H23(配列番号 4023)、CDR2-H23(配列番号 5023)および CDR3-H23(配列番号 6023)を含む
A24	L24(配列番号 24) L24 は、CDR1-L24(配列番号 1024)、CDR2-L24(配列番号 2024)および CDR3-L24(配列番号 3024)を含む	H24(配列番号 124) H24 は、CDR1-H24(配列番号 4024)、CDR2-H24(配列番号 5024)および CDR3-H24(配列番号 6024)を含む
A25	L25(配列番号 25) L25 は、CDR1-L25(配列番号 1025)、CDR2-L25(配列番号 2025)および CDR3-L25(配列番号 3025)を含む	H25(配列番号 125) H25 は、CDR1-H25(配列番号 4025)、CDR2-H25(配列番号 5025)および CDR3-H25(配列番号 6025)を含む
A26	L26(配列番号 26) L26 は、CDR1-L26(配列番号 1026)、CDR2-L26(配列番号 2026)および CDR3-L26(配列番号 3026)を含む	H26(配列番号 126) H26 は、CDR1-H26(配列番号 4026)、CDR2-H26(配列番号 5026)および CDR3-H26(配列番号 6026)を含む
A27	L27(配列番号 27) L27 は、CDR1-L27(配列番号 1027)、CDR2-L27(配列番号 2027)および CDR3-L27(配列番号 3027)を含む	H27(配列番号 127) H27 は、CDR1-H27(配列番号 4027)、CDR2-H27(配列番号 5027)および CDR3-H27(配列番号 6027)を含む
A28	L28(配列番号 28) L28 は、CDR1-L28(配列番号 1028)、CDR2-L28(配列番号 2028)および CDR3-L28(配列番号 3028)を含む	H28(配列番号 128) H28 は、CDR1-H28(配列番号 4028)、CDR2-H28(配列番号 5028)および CDR3-H28(配列番号 6028)を含む

10

20

30

7 . 1 0 . 医薬組成物

【 0 2 3 2 】

本開示のタンパク質およびポリペプチドを含有する医薬組成物も提供される。このような組成物は、薬学的に許容される材料、および生理学的に許容される製剤材料を含む混合物中に、治療または予防有効量のポリペプチドまたはタンパク質を含む。

40

【 0 2 3 3 】

医薬組成物は、例えば、組成物の pH、容量オスモル濃度、粘度、透明度、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解もしくは放出速度、吸着または浸透を修正、維持または保存するための製剤材料を含有してもよい。

【 0 2 3 4 】

好適な製剤材料としては、以下に限定されないが、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなど）；抗菌剤；酸化防止剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウムなど）；バッファー（ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、他の有機酸など）；増量剤（マンニトールまたはグリシンなど）；キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）など）；錯化

50

剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ - シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキストリンなど）；充填剤；単糖類；二糖類および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンなど）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなど）；着色剤；着香剤および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；防腐剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、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、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素など）；溶媒（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など）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）；懸濁化剤；界面活性剤または湿潤剤（ブルロニック（登録商標）、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80 などのポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパル（tyloxapal）など）；安定性強化剤（スクロースまたはソルビトール）；等張性強化剤（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトール、ソルビトール）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられる。中性の緩衝食塩水または同種の血清アルブミンと混合した食塩水は、適切な希釈剤の例である。適切な工業標準に従って、ベンジルアルコールなどの防腐剤も添加してもよい。組成物は、希釈剤として適切な賦形剤溶液（例えば、スクロース）を使用して、凍結乾燥物として製剤化されてもよい。好適な構成成分は、用いられる投与量および濃度で、レシipientに対して非毒性である。医薬製剤において用いることができる構成成分のさらなる例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed.(1980)and 20th Ed.(2000), Mack Publishing Company, Easton, PAに示されている。

10

20

【0235】

必要に応じて、組成物は、1種または複数種の生理学的に活性な薬剤、例えば、抗血管新生物質、化学療法物質（例えば、カペシタビン、5 - フルオロウラシル、またはドキソルビシン）、鎮痛物質など（これらの非排他的な例は本明細書に提供されている）をさらに含む。様々な特定の実施形態では、組成物は、CTLA - 4 結合タンパク質に加えて、1、2、3、4、5、または6種の生理学的に活性な薬剤を含む。

【0236】

本開示の別の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、中性または塩の形態で製剤化されてもよい。例示的な薬学的に許容される塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基により形成される）が挙げられ、これは、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸と共に形成される。遊離カルボキシル基と共に形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基に由来してもよい。製剤化されると、液剤は、投与製剤と適合する方式で、治療上有効な量で投与される。

30

【0237】

担体は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、バッファー、担体溶液、懸濁液、コロイドなどをさらに含んでもよい。薬学的に活性な物質に対するこのような媒体および剤の使用は、当技術分野で周知である。いずれかの従来の媒体または剤が有効成分と不適合である場合を除いて、治療組成物におけるその使用が企図される。補足的な有効成分が組成物中に導入されてもよい。語句「薬学的に許容される」は、ヒトに投与された場合に、アレルギー反応や同様の有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。

40

【0238】

最適な医薬組成物は、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投与量に応じて、当業者によって決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、上掲を参照されたい。このような組成物は、ポリペプチドの物理的状態、安定性、in

50

v i v o放出量、およびi n v i v oクリアランス量に影響を及ぼし得る。例えば、好適な組成物は、注射用水、非経口投与用の生理学的食塩水溶液であってもよい。

7 . 1 0 . 1 . 薬学的有効成分の含量

【 0 2 3 9 】

典型的な実施形態では、有効成分（すなわち、本開示のタンパク質およびポリペプチド）は、少なくとも0 . 0 1 m g / m l、少なくとも0 . 1 m g / m l、少なくとも0 . 5 m g / m l、または少なくとも1 m g / m lの濃度で、医薬組成物中に存在する。ある特定の実施形態では、有効成分は、少なくとも1 m g / m l、2 m g / m l、3 m g / m l、4 m g / m l、5 m g / m l、1 0 m g / m l、1 5 m g / m l、2 0 m g / m l、または2 5 m g / m lの濃度で、医薬組成物中に存在する。ある特定の実施形態では、有効成分は、少なくとも3 0 m g / m l、3 5 m g / m l、4 0 m g / m l、4 5 m g / m lまたは5 0 m g / m lの濃度で、医薬組成物中に存在する。

10

【 0 2 4 0 】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本開示のタンパク質またはポリペプチドに加えて、1種または複数種の追加の有効成分を含む。1種または複数種の追加の有効成分は、様々なチェックポイント受容体を標的とする薬物、例えばPD - 1阻害剤（例えば、抗PD - 1抗体）またはTIGIT阻害剤（例えば、抗TIGIT抗体）であってもよい。

7 . 1 0 . 2 . 一般的な製剤化

【 0 2 4 1 】

医薬組成物は、液体、油、エマルション、ゲル、コロイド、エアロゾルまたは固体を含む、ヒトまたは動物用の薬に適切な任意の形態であってもよい。

20

【 0 2 4 2 】

医薬組成物は、経腸および非経口投与経路を含む、ヒトまたは動物用の薬に適切な任意の投与経路による投与のために製剤化され得る。

【 0 2 4 3 】

様々な実施形態では、医薬組成物は、吸入による投与のために製剤化される。ある特定のこれらの実施形態では、医薬組成物は、気化器による投与のために製剤化される。ある特定のこれらの実施形態では、医薬組成物は、ネブライザーによる投与のために製剤化される。ある特定のこれらの実施形態では、医薬組成物は、エアロゾライザーによる投与のために製剤化される。

30

【 0 2 4 4 】

様々な実施形態では、医薬組成物は、経口投与、頬側投与、または舌下投与のために製剤化される。

【 0 2 4 5 】

一部の実施形態では、医薬組成物は、静脈内、筋肉内、または皮下投与のために製剤化される。

【 0 2 4 6 】

一部の実施形態では、医薬組成物は、髄腔内または脳室内投与のために製剤化される。

【 0 2 4 7 】

一部の実施形態では、医薬組成物は、局所投与のために製剤化される。

40

7 . 1 0 . 3 . 注射に適合される医薬組成物

【 0 2 4 8 】

静脈内、皮膚もしくは皮下注射、または病気の部位への注射のために有効成分は、パイロジェンフリーであり、好適なpH、等張性および安定性を有する非経口的に許容される水性溶液の形態である。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸加リンゲル注射液などの等張性ビヒクルを使用して、好適な液剤を十分に調製することができる。防腐剤、安定化剤、バッファー、酸化防止剤および/または他の添加剤が、必要な場合に含まれ得る。

【 0 2 4 9 】

様々な実施形態では、単位剤形は、バイアル、アンプル、ボトル、または予め充填され

50

たシリンジである。一部の実施形態では、単位剤形は、0.01mg、0.1mg、0.5mg、1mg、2.5mg、5mg、10mg、12.5mg、25mg、50mg、75mg、または100mgの医薬組成物を含有する。一部の実施形態では、単位剤形は、125mg、150mg、175mg、または200mgの医薬組成物を含有する。一部の実施形態では、単位剤形は、250mgの医薬組成物を含有する。

【0250】

典型的な実施形態では、単位剤形における医薬組成物は、液体形態である。様々な実施形態では、単位剤形は、0.1mLから50mLの間の医薬組成物を含有する。一部の実施形態では、単位剤形は、1mL、2.5mL、5mL、7.5mL、10mL、25mL、または50mLの医薬組成物を含有する。

10

【0251】

特定の実施形態では、単位剤形は、0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mL、または1mg/mLの濃度の医薬組成物1mLを含有するバイアルである。一部の実施形態では、単位剤形は、0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mL、または1mg/mLの濃度の医薬組成物2mLを含有するバイアルである。

【0252】

一部の実施形態では、単位剤形における医薬組成物は、固体形態、例えば、可溶化に好適な凍結乾燥物である。

【0253】

皮下、皮内、または筋肉内投与に好適な単位剤形の実施形態は、充填済シリンジ、オートインジェクター、および自動注射ペン (autoinject pen) を含み、それぞれ、所定量の本明細書の上記に記載の医薬組成物を含有する。

20

【0254】

様々な実施形態では、単位剤形は、シリンジおよび所定量の医薬組成物を含む充填済シリンジである。ある特定の充填済シリンジの実施形態では、シリンジは、皮下投与用に適合させる。ある特定の実施形態では、シリンジは、自己投与に好適である。特定の実施形態では、充填済シリンジは、単回使用シリンジである。

【0255】

様々な実施形態では、充填済シリンジは、約0.1mLから約0.5mLの医薬組成物を含有する。ある特定の実施形態では、シリンジは、約0.5mLの医薬組成物を含有する。具体的な実施形態では、シリンジは、約1.0mLの医薬組成物を含有する。特定の実施形態では、シリンジは、約2.0mLの医薬組成物を含有する。

30

【0256】

ある特定の実施形態では、単位剤形は、自動注射ペンである。自動注射ペンは、本明細書に記載される医薬組成物を含有する自動注射ペンを含む。一部の実施形態では、自動注射ペンは、所定体積の医薬組成物を送達する。他の実施形態では、自動注射ペンは、使用者によってある体積の医薬組成物を送達するように構成される。

【0257】

様々な実施形態では、自動注射ペンは、約0.1mLから約5.0mLの医薬組成物を含有する。具体的な実施形態では、自動注射ペンは、約0.5mLの医薬組成物を含有する。特定の実施形態では、自動注射ペンは、約1.0mLの医薬組成物を含有する。他の実施形態では、自動注射ペンは、約5.0mLの医薬組成物を含有する。

40

7.11. 単位剤形

【0258】

医薬組成物は、便宜的に、単位剤形中に存在してもよい。

【0259】

単位剤形は、典型的には、医薬組成物の1つまたは複数の具体的な投与経路に対して適する。

【0260】

様々な実施形態では、単位剤形は、吸入による投与に適する。ある特定のこれらの実施

50

形態では、単位剤形は、気化器による投与に適する。ある特定のこれらの実施形態では、単位剤形は、ネブライザーによる投与に適する。ある特定のこれらの実施形態では、単位剤形は、エアロゾライザーによる投与に適する。

【0261】

様々な実施形態では、単位剤形は、経口投与、頬側投与、または舌下投与に適する。

【0262】

一部の実施形態では、単位剤形は、静脈内、筋肉内、または皮下投与に適する。

【0263】

一部の実施形態では、単位剤形は、髄腔内または脳室内投与に適する。

【0264】

一部の実施形態では、医薬組成物は、局所投与用に製剤化される。

【0265】

単一の剤形を生成するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、一般的に、治療効果をもたらす化合物の量である。

7.12. 使用方法

【0266】

無傷CTLA-4と特異的に結合する治療用抗体を使用することができる。

【0267】

in vivoおよび/またはin vitroアッセイは、最適な投与量の範囲を特定するのに助けるために必要に応じて用いることができる。製剤中で用いられる正確な用量は、投与経路、および状態の重篤性に応じて変わり、開業医の判断および各対象の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、in vitroまたは動物モデル試験系に由来する用量応答曲線から推定されてもよい。

【0268】

オリゴペプチドまたはポリペプチドは、本明細書において提供されるCDRの少なくとも1つ(least one)に対して；ならびに/または抗体A1~A28の少なくとも1つによるCTLA-4への結合を交差遮断する、および/もしくは抗体A1~A28の少なくとも1つによってCTLA-4との結合から交差遮断されるCTLA-4結合剤のCDRに対して；ならびに/またはCTLA-4のそのリガンドとの結合を遮断することができるCTLA-4結合剤のCDRに対して、少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を有する場合、オリゴペプチドまたはポリペプチドは本開示の範囲内にある。

【0269】

CTLA-4結合剤ポリペプチドおよび抗体は、抗体A1~A28の少なくとも1つの可変領域に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一であり、かつ抗体A1~A28の少なくとも1つのCTLA-4との結合を交差遮断する、および/または抗体A1~A28の少なくとも1つによってCTLA-4との結合から交差遮断される；および/またはCTLA-4のそのリガンドに関する阻害効果を遮断することができるアミノ酸配列を有する場合、CTLA-4結合剤ポリペプチドおよび抗体は、本開示の範囲内にある。

【0270】

本開示による抗体は、 5×10^{-7} M未満であるかもしくはそれに等しい、 1×10^{-7} M未満であるかもしくはそれに等しい、 0.5×10^{-7} M未満であるかもしくはそれに等しい、 1×10^{-8} M未満であるかもしくはそれに等しい、 1×10^{-9} M未満であるかもしくはそれに等しい、 1×10^{-10} M未満であるかもしくはそれに等しい、 1×10^{-11} M未満であるかもしくはそれに等しい、または 1×10^{-12} M未満であるかもしくはそれに等しい、ヒトCTLA-4に対する結合親和性を有してもよい。

10

20

30

40

50

【0271】

抗体または結合パートナーの親和性、および抗体が結合を阻害する程度は、従来の技法、例えば、Scatchard et al.(Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672(1949))に記載されるものを使用して、または表面プラズモン共鳴 (SPR; Biacore、Biosensor、Piscataway、NJ) によって、当業者によって決定され得る。表面プラズモン共鳴では、標的分子を固相に固定し、フローセルに沿って流れる移動相中のリガンドに曝露される。リガンドが、固定化された標的と結合する場合、局所的な屈折率が変化し、SPR角度の変化をもたらす、反射光の強度における変化を検出することにより、SPR角度の変化をリアルタイムでモニタリングすることができる。SPRシグナルの変化の速度を分析して、結合反応の会合および解離の相についての見かけの速度定数を得ることができる。これらの値の比率により、見かけの平衡定数 (親和性) を得る (例えば、Wolff et al., Cancer Res. 53:2560-65(1993)を参照されたい)。

10

【0272】

本開示による抗体は、いずれかの免疫グロブリンクラス、例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、またはIgAに属してもよい。本開示による抗体は、動物、例えば、家禽 (例えば、ニワトリ) および哺乳動物 (以下に限定されないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、または他のげっ歯類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ヒト、または他の霊長類を含む) から得られるかまたはそれに由来する。抗体は、内在化抗体であってもよい。抗体の産生は、一般的に、米国特許出願公開第2004/0146888A1号に開示される。

20

【0273】

特異的なA1～A28CDRの新たなフレームワークおよび/または定常領域への操作を含む、本開示に従って抗体を生成するための上記方法では、所望の抗体を選択するために適切なアッセイ (すなわち、CTLA-4に対する結合親和性を決定するためのアッセイ; 交差遮断アッセイ; Biacoreに基づく競合結合アッセイ; in vivoアッセイ) が利用可能である。

7.12.1. CTLA-4阻害剤または活性化剤に応答する疾患を処置する方法

【0274】

別の態様では、CTLA-4阻害剤または活性化剤に応答する疾患を有する対象を処置するための方法が示される。疾患は、がん、自己免疫疾患、またはウイルスもしくは細菌感染症であってもよい。

30

【0275】

用語「処置 (treatment)」、「処置する (treating)」などは、一般的に、所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることを意味するために本明細書において使用される。この効果は、疾患、状態、もしくはその症状を完全にもしくは部分的に防止するという点で予防的であってもよい、ならびに/または疾患もしくは状態および/もしくは疾患もしくは状態に起因する、症状などの有害作用に対する部分的または完全な治癒という点で治療的であってもよい。「処置」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒトの疾患または状態の任意の処置を網羅し: (a) 疾患もしくは状態に罹りやすい可能性があるが、疾患もしくは状態を有すると未だ診断されていない対象において、疾患もしくは状態が起こるのを防止すること; (b) 疾患もしくは状態を阻害すること (例えば、その発症を阻害すること); または (c) 疾患もしくは状態を緩和すること (例えば、疾患または状態を退縮させること、1つまたは複数の症状の改善をもたらすこと) を含む。いずれかの状態の改善は、標準的方法および当技術分野で公知の技法に従って、容易に評価することができる。その疾患について、その方法によって処置される対象の集団は、望ましくない状態または疾患を患っている対象、および状態または疾患の発症のリスクを有する対象を含む。

40

【0276】

用語「治療有効用量」または「有効量」によって、それが投与されるものに対して所望の効果をもたらす用量または量を意味する。正確な用量または量は、処置の目的次第であ

50

り、公知の技法を使用して、当業者によって確認される（例えば、Lloyd(1999)The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compoundingを参照されたい）。

【0277】

用語「十分な量」は、所望の効果をもたらすのに十分な量を意味する。

【0278】

用語「治療有効量」は、疾患の症状を改善するのに有効である量である。治療有効量は、予防を治療とみなすことができるため、「予防有効量」であってもよい。

【0279】

用語「改善する」は、疾患状態、例えば神経変性疾患状態の処置（その予防、重症度または進行の緩和、寛解、または治癒を含む）におけるいずれかの治療上有益な帰結を指す。

10

【0280】

投与される実際の量、ならびに投与速度および時間経過は、処置されるタンパク質凝集疾患の性質および重症度に応じて決まる。処置の処方、例えば、投与量などの決定は、一般開業医および他の医師の責任の範囲内にあり、典型的には、処置される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法および開業医に公知の他の要因を考慮に入れる。上述の技法およびプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A.(ed), 1980に見出される。

【0281】

一部の実施形態では、医薬組成物は、吸入によって、経口的に、頬側投与によって、舌下投与によって、注射によって、または局所投与によって投与される。

20

【0282】

一部の実施形態では、医薬組成物は、ニューロンの生存またはドーパミン放出をモジュレートするのに十分な量で投与される。一部の実施形態では、主要なカンナビノイドは、用量当たり1g未満、500mg未満、100mg未満、10mg未満の量で投与される。

【0283】

一部の実施形態では、医薬組成物は、1日に1回、1日に2～4回、1週間に2～4回、1週間に1回、または2週間ごとに1回投与される。

【0284】

組成物は、単独で、または処置される状態に応じて同時にもしくは逐次的に、他の処置と組み合わせて投与されてもよい。例えば、医薬組成物は、様々なチェックポイント受容体を標的とする1種または複数種の薬物、例えばPD-1阻害剤（例えば、抗PD-1抗体）またはTIGIT阻害剤（例えば、抗TIGIT抗体）と組み合わせて投与されてもよい。

30

【実施例】

【0285】

8. 実施例

以下は、本開示を実行するための特定の実施形態の例である。実施例は、例示目的のみにために提供され、本開示の範囲をいかなるようにも限定することを意図しない。使用される数値（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するための努力がなされているが、幾分かの実験誤差およびばらつきは、当然のことながら許容されるべきである。

40

【0286】

本開示の実践では、別段に示されていなければ、当技術分野における技術の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技法および薬理学についての従来の方法が用いられる。このような技法は、参考文献において十分に説明されている。例えば、T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties(W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry(Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology(S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition(Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Ca

50

rey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.(Plenum Press) Vols A and B(1992)を参照されたい。さらに、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるAdler et al., A natively paired antibody library yields drug leads with higher sensitivity and specificity than a randomly paired antibody library, MAbs(2018)、およびAdler et al., Rare, high-affinity mouse anti-CTLA-4 antibodies that function in checkpoint blockade, discovered using microfluidics and molecular genomics, MAbs(2017)において説明される抗体を生成および選択する方法を用いることができる。

(実施例1)

8.1. 実施例1：抗原結合タンパク質の生成

10

【0287】

マウスの免疫および試料の調製：

【0288】

最初に、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを、アジュバントとしてTiter Maxを使用して、配列番号7001の可溶性CTLA-4免疫原（すなわち、Hisタグ付きCTLA-4タンパク質（R&D Systems））で免疫した。3日毎、15日間、1 μ gの免疫原をそれぞれの踵関節中に注射し、3 μ gの免疫原を腹腔内に投与した。1：200希釈物から出発して、各動物の血清の1：2希釈系列で、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）により力価を評価した。アジュバントを含まない踵関節当たり2.5 μ gの最終的な静脈内ブーストを、採取前に各動物に与えた。殺後に、リンパ節（膝窩、鼠径部、腋窩、および腸間膜）を外科的に除去した。手作業で破壊して、その後70 μ mのフィルターを通して、各動物に関する単一細胞懸濁物を作製した。次に、EasySep（商標）Mouse Pan-B Cell Isolation Kit（Stemcell Technologies）陰性選択キットを使用して、各試料からB細胞を単離した。C-CHIP血球計数器（Incyto）で計数することによって、リンパ節B細胞集団を定量し、トリパンブルーを使用して生存率を評価した。次いで、12%のOptiPrep（商標）Density Gradient Medium（Sigma）を含むリン酸緩衝食塩水（PBS）中で、細胞を1mL当たり5,000～6,000個の細胞まで希釈した。この細胞混合物をマイクロ流体被包に使用した。およそ100万個のB細胞を、6匹の動物それぞれから、エマルジョン液滴マイクロフレイディクスのプラットフォームを介してランさせた。

20

30

【0289】

対合した重鎖および軽鎖のライブラリーの生成：

【0290】

エマルジョン液滴マイクロフレイディクスのプラットフォームまたはボルテックスエマルジョンを使用して、天然の重鎖-Igが無傷で対合した、単一細胞のRNA由来のscFvをコードするDNAライブラリーを生成した。DNAライブラリーを生成する方法を、1)ポリ(A)+mRNA捕捉、2)多重化オーバーラップ伸長逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（OE-RT-PCR）、および3)人工産物を除去して、ディープシーケンシングまたは酵母ディスプレイライブラリーのためにアダプターを付加するためのネステッドPCRに分割した。scFvライブラリーは、陽性ELISA力価に達した各動物由来のおよそ100万個のB細胞から作成した。

40

【0291】

ポリ(A)+mRNA捕捉のために、ガラス（Dolomite）から製作したカスタムデザインの並行流のエマルジョン液滴マイクロ流体チップを使用した。マイクロ流体チップは、フルオロカーボンオイル（Dolomite）のための2つのインプットチャンネル、上記の細胞懸濁物ミックスのための1つのインプットチャンネル、および細胞溶解バッファー（20mMのTris pH7.5、0.5MのNaCl、1mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、0.5%のTween-20、および20mMのジチオトレイトール）中1.25mg/mlのオリゴ-dTビーズ（NEB）のための1つのインプット

50

チャンネルを有する。インプットチャンネルは、チップの長さのほとんどに対しては150 μ mまで、液滴ジャンクションでは55 μ mまで狭く、50 μ mまでエッチングし、疎水性Pico-Glide (Dolomite) でコーティングした。3つのMitosis P-Pump 圧力ポンプ (Dolomite) を使用して、液体をチップを通してポンプで送った。液滴サイズは圧力に応じて変わるが、典型的には、約45 μ mの直径の液滴が最も安定している。エマルジョンを冷やした2 mlのマイクロ遠心管中に回収し、mRNA 捕捉のために40 で15分間インキュベートした。Pico-Break (Dolomite) を使用して、ビーズを液滴から抽出した。一部の実施形態では、ボルテックスを使用して、類似する単一細胞分配エマルジョンを作製した。

【0292】

多重OE-RT-PCRのために、ガラスのTelos液滴エマルジョンマイクロ流体チップを使用した (Dolomite)。mRNAが結合したビーズをOE-RT-PCRミックス中に再懸濁させ、鉍物油ベースの界面活性剤ミックス (GigaGenから市販されている) と共に、27 μ mの液滴を生じる圧力でマイクロ流体チップ中に注入した。OE-RT-PCRミックスは、2 \times ワンステップRT-PCRバッファー、2.0 mMのMgSO₄、SuperScript III逆転写酵素、およびPlatinum Taq (Thermo Fisher Scientific) を、IgK C領域、IgG C領域、および全てのV領域を対象とするプライマーの混合物と共に含有する (図2)。オーバーラップ領域は、Gly-Ser-rich scFvリンカー配列をコードするDNA配列であった。液滴破壊溶液 (droplet breaking solution) (GigaGenから市販されている) を使用して、DNA断片を液滴から回収し、次いで、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を使用して精製した。一部の実施形態では、同様のOE-RT-PCRエマルジョンをボルテックスを使用して作製した。

【0293】

ネステッドPCR (図2) では、最初に、精製したOE-RT-PCR産物を150 Vで80分間1.7%のアガロースゲルにランした。連結した産物に対応する1200~1500塩基対 (bp) のバンドを切り取り、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel) を使用して精製した。次いで、PCRを実施し、Illuminaシーケンシングまたは酵母ディスプレイのためにアダプターを付加した；シーケンシングでは、7つのヌクレオチドのランダムを付加して、次の次世代シーケンシングステップのベースコールの精度を増加させる。プライマーを含有するIlluminaアダプターまたは酵母発現ベクター中にクローニングするためのプライマーのいずれかを含む2 \times NEBNext High-Fidelity増幅ミックス (NEB) を用いてネステッドPCRを実施した。ネステッドPCR産物を150 Vで50分間1.2%のアガロースゲルにランした。800~1100 bpのバンドを切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel) を使用して精製した。

【0294】

一部の実施形態では、scFvライブラリーは自然に対合せず、例えばB細胞から単離されたRNAから直接的にscFvを増幅させることによってランダムに対合した。

(実施例2)

8.2. 実施例2：酵母ディスプレイによるCTLA-4バインダーの単離

【0295】

ライブラリーのスクリーニング：

【0296】

EZ-Link Micro Sulfo-NHS-LC-Biotinylationキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して、ヒトIgG1-Fc (Thermo Fisher Scientific) およびCTLA-4 (R&D Systems) タンパク質をビオチン化した。ビオチン化試薬を9 mMまで再懸濁

10

20

30

40

50

させ、50倍モル過剰でタンパク質に添加した。反応物を氷上で2時間インキュベートし、次いで、Zeba脱塩カラム(Thermo Fisher Scientific)を使用してビオチン化試薬を除去した。最終タンパク質濃度をBradfordアッセイで計算した。

【0297】

次に、6つのDNAライブラリーを酵母において表面scFvとして発現させた。GAL1/10プロモーター、Aga2細胞壁テザー、およびC末端c-Mycタグを含有する酵母表面ディスプレイベクター(pYD)を構築した。GAL1/10プロモーターは、ガラクトースを含有する培地中でscFvタンパク質の発現を誘導する。Aga2細胞壁テザーは、scFvを酵母細胞表面に往復させ、scFvを細胞外スペースに係留させるために必要とされた。流動選別の間にc-Mycタグを使用して、インフレームscFvタンパク質を発現する酵母細胞を染色した。Saccharomyces cerevisiae細胞(ATCC)をゲル精製したネステッドPCR産物と共に電気穿孔し(Bio-Rad Gene Pulser II; 0.54kV、25uF、抵抗を無限大に設定)、in vivoでの相同組換えのためのpYDベクターを線状化した。形質転換細胞を拡大させ、ガラクトースで誘導して、酵母scFvディスプレイライブラリーを生成した。

【0298】

拡大させたscFvライブラリーからの200万個の酵母細胞を抗c-Myc(Thermo Fisher Scientific A21281)およびAF488コンジュゲート二次抗体(Thermo Fisher Scientific A11039)で染色した。CTLA-4と結合するscFv発現細胞を選択するために、ビオチン化CTLA-4抗原を一次抗体のインキュベーション中に酵母培養物に添加し(最終7nM)、次いで、PE-ストレプトアビジン(Thermo Fisher Scientific)で染色した。酵母細胞を二重陽性細胞(AF488C/PEC)としてBD Influx(Stanford Shared FACS Facility)上で流動選別し、次いで、回収したクローンを、拡大のための、カナマイシン、ストレプトマイシン、およびペニシリン(Teknova)を含むSD-CAAプレート上に蒔いた。次いで、拡大した1回目のFACSクローンを、同じ容量モル濃度(最終7nM)の同じ抗原を用いて、2回目のFACSに供した。プラスミドミニプレップ(Zymo Research)を、最終のFACS選別から回収した酵母から調製した。テールドエンドPCRを使用して、ディープシーケンシングのためにプラスミドライブラリーにIlluminaアダプターを添加した。

【0299】

典型的なFACSドットプロットでは、四分円の右上は、抗原結合とscFv発現の両方について染色される(C末端c-Mycタグで同定される)酵母を含有する。四分円の左下は、抗原についてもscFv発現についても染色されない酵母を含有する。四分円の右下は、scFvを発現するが、抗原に結合しない酵母を含有する。各レパートリーにおけるバインダーの頻度は、抗原およびscFv発現について二重染色される酵母の数をscFvを発現する酵母の数で割ることによって推定した。7nMの最終抗原濃度で選別した場合、免疫したマウスから生成されたライブラリーによって、低いパーセンテージのscFvバインダー(0.08%~1.28%の範囲)しか得られなかった。レパートリーにおけるバインダーの血清中力価と頻度の間に明確な関連はなかった。これらの選別された細胞の拡大後に、7nMの最終抗原濃度で2回目のFACSを使用して、スクリーニングの特異性を増加させた。2回目のFACSにおけるバインダーの頻度は、通常、1回目のFACSよりも実質的に高く、8.39%~84.4%の範囲であった。一般的に、1回目の選別でのより低い頻度のバインダーによって、2回目の選別のより頻度の低いバインダーがもたらされた。おそらく、これは、元のレパートリーにおいて、より少ない真のバインダーしか有さない試料に対する、より低いゲーティング特異性によるものである。

【0300】

ディープレパートリーシーケンシング：

【0301】

CTLA-4に結合するクローンをライブラリーとして回収し（「CTLA-4に結合するクローンのライブラリー」）、ディープレパートリーシーケンシングに供した。ディープレパートリーシーケンシングによって、重鎖配列と軽鎖配列の両方の全ての対合した可変（V(D)J）領域の配列が決定される。CTLA-4に結合するクローンのライブラリーを、2018年11月20日付けで、ブタペスト条約のATCC受託番号PTA-125512の下で、ATCC寄託番号197361（アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（American Type Culture Collection）（ATCC）、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA）で寄託した。ライブラリーの各クローンは、単一細胞を起源とする重鎖配列と軽鎖配列の両方の対合した可変（V(D)J）領域を含むscFvを含有する。ディープレパートリーシーケンシングによって、重鎖配列と軽鎖配列の両方の全ての対合した可変（V(D)J）領域の配列が決定される。酵母のscFvライブラリーのシーケンシングから得られる重鎖配列および軽鎖配列の一部を、配列番号1~28および配列番号101~128に提供する。酵母のscFvライブラリーのシーケンシングから得られる追加の配列を配列番号8000~8991に提供する。具体的には、それらの軽鎖可変（VL）配列は、配列番号8000~8495を含む。これらの重鎖（VH）配列は、配列番号8496~8991を含む。

【0302】

ディープ抗体シーケンシングライブラリーを、定量的PCR Illumina Library Quantification Kit（KAPA）を使用して定量し、17.5pMまで希釈した。製造業者の指示に従って、500サイクルのMiSeq Reagent Kit v2を使用して、ライブラリーをMiSeq（Illumina）でシーケンシングした。重鎖と軽鎖の連結を維持して、高品質の配列リードを得るために、2回の別々の実行でシーケンシングを行った。1回目の実行（「連結型の実行」）では、scFvライブラリーを直接シーケンシングして、軽鎖V遺伝子およびCDR3について340サイクルのフォワードリード、ならびに重鎖CDR3および重鎖V遺伝子の一部を網羅する162サイクルのリバースリードを得た。2回目の実行（「非連結型の実行」）では、scFvライブラリーをPCRに関する鋳型として最初に使用し、重鎖および軽鎖V遺伝子を別々に増幅させた。次いで、重鎖および軽鎖Igについて、340サイクルのフォワードリードと162サイクルのリバースリードを別々に得た。これにより、CDR3とV遺伝子の一部でオーバーラップするフォワードリードとリバースリードが得られ、ヌクレオチドコールの信頼性が増加する。

【0303】

ベースコールエラーを除去するために、リードのエラー（E）の予想数をそのPhredスコアから計算した。デフォルトにより、E>1のリードを廃棄し、最も可能性の高いベースコールエラーの数がゼロであるリードを残した。追加のクオリティフィルターとして、2回またはそれより多い回数見出される配列は正しい可能性が高いため、単集合のヌクレオチドリードを廃棄した。最後に、フィルタリングされた配列をマージすることにより、高品質の、連結された抗体配列を連結型および非連結型の実行から生成した。簡潔には、非連結型の実行からフォワードリードとリバースリードを最初にマージした一連のスク립トをPythonで書き込んだ。ミスマッチを含有したフォワード配列とリバース配列の全ての対を廃棄した。次に、連結型の実行からのヌクレオチド配列を使用して、非連結型の実行でマージした配列を検索した。スク립トからの最終出力は、自然な重鎖および軽鎖Igの対合を有する一連の、全長、高品質の可変（V(D)J）配列である。

【0304】

リーディングフレームおよびFR/CDR接合部を特定するために、十分に精選した免疫グロブリン配列のデータベースを先ず処理して、各FR/CDR接合部に関する位置特異的配列マトリックス（PSSM）を生成した。これらのPSSMを使用して、上記プロ

10

20

30

40

50

セスを使用して生成したマージしたヌクレオチド配列のそれぞれについて、F R / C D R 接合部を特定した。これにより、ヌクレオチド配列のそれぞれに対するタンパク質リーディングフレームが特定された。P S S Mに対する低い識別スコアを有するC D R 配列を感嘆符によって示す。次いで、P y t h o n スクリプトを使用して、配列を翻訳した。リードは、妥当な予測C D R 3 配列を有する必要があるため、例えば、VセグメントとJセグメントの間のフレームシフトを有するリードは廃棄した。次に、クエリーとしてs c F vヌクレオチド配列ならびに参照配列としてI M G TデータベースからのVおよびJ遺伝子配列を使用して、U B L A S Tを実行した。最も低いE値を有するU B L A S Tアラインメントを使用して、VおよびJ遺伝子ファミリーを割り当て、生殖系列に対する% I Dを計算した。

10

【0305】

各動物によって、2回目のF A C S選択後に、合計28種の固有のs c F v候補バインダー（軽鎖について配列番号1～28；重鎖について配列番号101～128）を含む、0.1%またはそれより高い頻度で存在する38～50種の固有のs c F v配列が得られた。配列番号[n]の配列を有する軽鎖および配列番号[100+n]の配列を有する重鎖は、単一細胞からの同族対であり、単一のs c F vを形成する。例えば、配列番号1の軽鎖および配列番号101の重鎖は、同族対であり、配列番号28の軽鎖および配列番号128の重鎖は同族対である、などである。

【0306】

この方法では、2回のF A C SによってC T L A - 4に結合するs c F vが富化された。さらに、多くのs c F vは、免疫したマウス由来のB細胞の初期集団からのシーケンシングデータにおいては検出されず、選別前マウスレパートリーに存在するs c F vのほとんどは、F A C S後に排除された。したがって、この研究は、免疫したマウスのレパートリーに存在する抗体のほとんどは、免疫原に対する強力なバインダーではないこと、およびこの方法によって、免疫したマウス由来のB細胞の初期集団からの稀なn M親和性バインダーが富化され得ることを示唆する。

20

（実施例3）

8.3. 実施例3：抗原結合タンパク質の生物学的特徴

【0307】

次いで、選別前ライブラリーに低頻度で存在し、選別後ライブラリーにおいて高頻度となるs c F v配列を、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞において、全長m A bとして合成した。これらのm A bは、各動物ごとに、2回のF A C Sにおいて2～3種の最も豊富に存在する配列を含む。

30

【0308】

C T L A - 4 標的結合プロファイル

【0309】

C T L A - 4に対する各全長抗体の結合特異性および親和性を、バイオレイヤー干渉法（B L I）および/または表面プラズモン共鳴（S P R）を使用して決定した。抗c y n o C T L A - 4および抗マウスC T L A - 4親和性をF o r t e B i o（B L I）を使用して検査した。抗ヒトC T L A - 4親和性をC a r t e r r a（S P R）を使用して測定した。

40

【0310】

B L Iでは、O c t e t R e d 9 6システム（F o r t e B i o）を使用して、A n t i - H u m a n I g G F c（A H C）バイオセンサーに抗体をロードした。ロードしたバイオセンサーを、300nMで開始して1：3で6段階希釈した抗原希釈物に浸漬した。1：1の結合モデルおよびグローバルフィッティングを使用して動態解析を実施した。

【0311】

S P Rでは、本発明者らは、中間密度（>>1,000応答単位）の抗ヒトI g G - F c試薬（S o u t h e r n B i o t e c h 2047-01）を、100mMのM E S（p H 5.5）中133mMのE D C（S i g m a）および33.3mMのS - N H S（T

50

hermoFisher)で活性化させたXantec CMD-50Mチップ(50nmのカルボキシメチルデキストラン中密度の官能基)にアミンカップリングさせた。次いで、ヤギ抗ヒトIgG Fc(Southern Biotech 2047-01)を、10mMの酢酸ナトリウム(pH4.5)(Carterra Inc.)中に25mg/mLで10分間カップリングさせた。次いで、1Mのエタノールアミン(pH8.5)(Carterra Inc.)で、表面を不活性化させた。ローン(lawn)固定化に使用した泳動用緩衝液は、HBS-EPC(10mMのHEPES、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05%のTween 20、pH7.4;Teknova)であった。

【0312】

次いで、センサーチップをアレイ捕捉のための連続フローマイクロスポッター(CFM; Carterra Inc.)に移した。mAb上清を1mg/mLのBSAを含むHBS-EPC中に50倍希釈した(最終濃度3~10mg/mL)。試料を、1回目と2回目のプリントにおいて、それぞれ、15分と4分の捕捉ステップでそれぞれ2回捕捉し、65mL/分の流速を使用して、複数密度を作り出した。CFMにおける泳動用緩衝液もHBS-EPCであった。

【0313】

次に、センサーチップを動態解析のためのSPRリーダー(MX-96システム; Ibis Technologies)上にロードした。CTLA-4を泳動用緩衝液(1.0mg/mLのBSAを含むHBS-EPC)中1.95、7.8、31.25、125、および500nMの濃度の4倍希釈系列の5つの漸増濃度で注入した。CTLA-4の注入は、5分間であり、非再生動態系列(non-regenerative kinetic series)において8mL/秒で15分解離させた。75mg/mLのヤギ抗ヒトIgG Fc捕捉抗体の注入液をこの系列の終了時に注入し、各mAbの捕捉レベルを検証した。結合データは、スポット間表面(interspot surface)とブランク注入を減算することによって二重参照され、Kinetic Interaction Toolソフトウェア(Carterra Inc.)を使用して、ka(結合速度)、kd(解離速度)、およびKD(親和性)について解析した。

【0314】

細胞表面結合研究では、安定したCTLA-4を発現するFlp-In CHO(Thermo Fisher Scientific)細胞を生成し、50:50の比で混合した。100万個の細胞を200μlのMACSバッファー(0.5%のウシ血清アルブミンおよび2mMのEDTAを含むDPBS)中1μgの本開示の抗CTLA-4組換え抗体で、4で30分間染色した。次いで、無関係の抗ヒト標的APCおよび抗ヒトIgG Fc-PE[M1310G05](BioLegend 41070)抗体で、4で30分間、細胞を共染色した。抗ヒトCTLA-4-FITC抗体をこれらの混合実験に対する対照として使用し、細胞生存率をDAPIで評価した。フローサイトメトリー解析をStanford Shared FACS FacilityのBD Influxで行い、FlowJoを使用してデータを解析した。

【0315】

本発明者らは、CTLA-4に特異的に結合する抗体を同定した。各抗体のCTLA-4(KD)に対する親和性を表6に与える。Promegaアッセイの阻害%を、抗体A5である最も強力な阻害剤に対して計算した。ヒトCTLA-4に対する各抗体の親和性、結合速度、解離速度、およびKDを表7に示す。

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 6						
Ab 番号	FACS による 結合?	Promega アッセイ アンタゴニスト (EC50、ug/mL)	Promega アッセイ%阻害	ヒト CTLA- 4 に対する親 和性(nM)	Cyno CTLA4 に対 する親和性 (nM)	マウス CTLA-4 に対 する親和 性(nM)
イピリムマブ	有	0.51	50.2%	4.9	1.3	結合なし
A1	有	0.13	43.2%	0.77	0.96	51
A2	有	0.12	75.4%	5.1	3.1	結合なし
A3	有	0.18	49.8%	1.5	1.2	結合なし
A4	有	0.15	81%	3	1.2	結合なし
A5	有	0.18	100%	4.6	2.2	39.4
A6	有	0.18	61.7%	5.7	1.6	87.8
A7	有	0.17	11.5%	5.7	0.75	結合なし
A8	有	0.15	54.7%	4.6	1	結合なし
A9	有	0.19	60.8%	6.8	0.92	結合なし
A10	有	0.26	24.5%	22	3.1	結合なし
A11	有	0.42	26.6%	7.5	1.6	結合なし
A12	有	遮断なし	0%	5.3	4.5	試験されず
A13	有	0.09	13.3%	3.2	9.6	試験されず
A14	有	0.09	6%	9.8	23.6	試験されず
A15	有	遮断なし	0%	10	2.6	試験されず
A16	有	遮断なし	0%	23	2.8	試験されず
A17	有	遮断なし	0%	51	6.3	試験されず
A18	有	0.89	8.6%	48	結合なし	試験されず
A19	無	試験されず	試験されず	3.3	試験されず	試験されず
A20	無	試験されず	試験されず	20	試験されず	試験されず
A21	無	試験されず	試験されず	31	試験されず	試験されず
A22	無	試験されず	試験されず	32	試験されず	試験されず
A23	無	遮断なし	0%	35	試験されず	試験されず

【表 6 - 2】

A24	無	試験されず	試験されず	55	試験されず	試験されず
A25	無	試験されず	試験されず	58	試験されず	試験されず
A26	無	試験されず	試験されず	74	試験されず	試験されず
A27	無	試験されず	試験されず	120	試験されず	試験されず
A28	無	遮断なし	0%	46	試験されず	試験されず

【表 7】

表 7			
	kon (M-1 s-1)	koff (s-1)	KD (M)
イピリムマブ	6.50E+04	3.20E-04	4.90E-09
A1	2.10E+05	1.60E-04	7.70E-10
A2	1.00E+05	5.20E-04	5.10E-09
A3	1.90E+05	2.80E-04	1.50E-09
A4	7.60E+04	2.30E-04	3.00E-09
A5	9.00E+04	4.20E-04	4.60E-09
A6	6.10E+04	3.50E-04	5.70E-09
A7	6.40E+04	3.60E-04	5.70E-09
A8	8.50E+04	3.90E-04	4.60E-09
A9	6.30E+04	4.30E-04	6.80E-09
A10	2.30E+04	5.10E-04	2.20E-08
A11	4.70E+04	3.50E-04	7.50E-09
A12	5.10E+04	2.70E-04	5.30E-09
A13	1.30E+05	4.20E-04	3.20E-09
A14	5.40E+04	5.20E-04	9.80E-09
A15	7.00E+04	7.30E-04	1.00E-08
A16	3.10E+04	7.20E-04	2.30E-08
A17	6.60E+04	3.40E-03	5.10E-08
A18	4.20E+03	2.00E-04	4.80E-08
A19	1.20E+05	3.80E-04	3.30E-09
A20	3.20E+04	6.40E-04	2.00E-08
A21	1.80E+04	5.50E-04	3.10E-08
A22	1.10E+04	3.60E-04	3.20E-08
A23	3.40E+04	1.20E-03	3.50E-08
A24	2.50E+04	1.40E-03	5.50E-08
A25	3.00E+04	1.80E-03	5.80E-08
A26	3.50E+03	2.60E-04	7.40E-08
A27	3.10E+04	3.60E-03	1.20E-07
A28	5.20E+04	2.40E-03	4.60E-08

10

20

【0316】

CTLA-4 リガンド遮断アッセイ：

30

【0317】

CTLA-4 / リガンド相互作用を遮断する抗体の能力の解析では、製造業者の指示に従って、CTLA-4 Blockade Bioassay (Promega) を使用した。アッセイの前日に、CTLA-4 リガンド CD80 および CD86 を発現する APC / Raji 細胞を 90 % の Ham's F-12 / 10 % ウシ胎仔血清 (FBS) 中に解凍し、2 つの 96 ウェルプレートの内側の 60 ウェル中に蒔いた。細胞を 37 °C、5 % CO₂ で一晩インキュベートした。アッセイの当日に、抗体を 99 % の RPMI / 1 % の FBS 中に希釈した。抗体希釈液を CTLA-4 リガンドを発現する aAPC / Raji 細胞を含有するウェルに添加し、その後、CTLA-4 エフェクター細胞 (99 % の RPMI / 1 % の FBS 中に解凍した) を添加した。細胞 / 抗体混合物を 37 °C、5 % の CO₂ で 6 時間インキュベートし、その後、Bio-Glo 試薬を添加し、Spectramax i3x プレートリーダー (Molecular Devices) を使用して発光を読み取った。[抗体に関するシグナル] / [無抗体に関するシグナル] の比率を計算することによって誘導倍率をプロットし、このプロットを使用して、SoftMax Pro (Molecular Devices) を使用して EC50 を計算した。社内で生産したイピリムマブを陽性対照として使用し、無関係の抗原との抗体結合を陰性対照として使用した。

40

【0318】

CTLA-4 のそのリガンドとの結合により、T 細胞シグナル伝達の阻害がもたらされる。したがって、CTLA-4 に結合し、CTLA-4 / リガンド相互作用をアンタゴナ

50

イズする抗体は、この阻害を除去し、T細胞の活性化を可能にする。CTLA-4 / リガンドチェックポイント遮断を *in vitro* 細胞性の活性化T細胞核内因子 (NFAT) ルシフェラーゼレポーターアッセイによって試験した。このアッセイでは、その抗CTLA-4エピトープがリガンド結合ドメインの内側に存在する抗体が、CTLA-4 / リガンド相互作用をアンタゴナイズし、NFAT - ルシフェラーゼレポーターの増加をもたらす。CHO細胞で発現されたCTLA-4に結合することができる全長mAb候補物質をアッセイした。各mAbに対するEC50値を得るために、いくつかの濃度にわたって測定を行った。いくつかの全長mAbが、表6にまとめたように、用量に依存してチェックポイント遮断において機能的であることが判明した。

【0319】

CD80またはCD86のプレートに結合したCTLA4との結合を妨げるCTLA4抗体の能力(表8に示した)をELISAを使用して評価した。EC50と各相互作用のパーセント阻害を表8に示す。プレートをrhCTLA4-Fcでコーティングし、次いで、5% w/vの脱脂粉乳を含む1xPBSTでブロッキングした。ブロッキング後、示した抗体の希釈系列をプレートに添加した。次いで、どの程度の量のCD80またはCD86がプレートに結合したCTLA4に依然として結合することができるかを決定するために、プレートを洗浄した後に、rhCD80-HisまたはrhCD86-Hisをそれぞれプレートに添加した。未結合のCD80-His / CD86-Hisを洗い流し、マウス抗His-HRPを添加した。TMBを使用して、どの程度の量のCD80-His / CD86-Hisが、各抗体の存在下で、プレートに結合したCTLA4と結合したかを決定した。

【0320】

本開示の一部の実施形態では、抗CTLA-4抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)によって薬理的に機能する。本開示の一部の実施形態では、抗CTLA-4抗体療法に関連する免疫関連毒性は、ADCCにおいて機能するが、チェックポイント遮断において機能しない抗体で抑止される。

【表8】

表 8				
抗体	CD80 EC50 (ug/mL)	CD80%阻害	CD86 EC50 (ug/ml)	CD86%阻害
イピリムマブ	0.08211	96.5%	0.1136	90.6%
CTLA4.A7	0.9955	92.1%	1.98	78.8%
CTLA4.A2	0.1006	95.4%	0.1452	91.5%
CTLA4.A12	0.2427	89.2%	0.3704	77.4%
CTLA4.A14	0.2262	83.7%	0.2442	54.5%
CTLA4.A5	0.07049	96.3%	0.1218	90.6%

【0321】

エピトープビニング：

【0322】

改変された古典的サンドイッチアプローチにおいてハイスループットアレイSPRを使用して、エピトープビニングを実施した。CMD-200Mチップ型を使用した(200nmのカルボキシメチルデキストラン、Xantec)以外は、Carterra CFMおよびSPR親和性研究に類似する方法を使用して、センサーチップを官能化し、mAbを50mg/mLでカップリングさせて、より結合能の高い表面を作出した(固定された約3,000個の反応性単位)。mAb上清を、上清中のmAb濃度に応じて、泳動用緩衝液中で1:1または1:10で希釈した。

【0323】

センサーチップをMX-96機器中に配置し、捕捉したmAb(「リガンド」)を二価のアミン反応性リンカーであるビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS3、ThermoFisher)を使用して表面に架橋させ、これを水中0.87mMで10分

間注入した。過剰に活性化したBS3を1Mのエタノールアミン(pH8.5)で中和させた。各ビニングサイクルでは、250mg/mLのヒトIgG(Jackson ImmunoResearch 009-000-003)の7分間の注入を使用して、参照表面および標的スポットのいずれかの残存能を遮断した。

【0324】

次に、250nMのCTLA-4タンパク質をセンサーチップ上に注入し、その後、希釈したmAb上清(「解析物」)または陰性対照としてのバッファープラックを注入した。よって、解析物のmAbは、リガンドのmAbと競合しない場合は、抗原に結合するのみであった。各サイクルの終わりに、4部のPierce IgG Elution Buffer(ThermoFisher 番号21004)、1部の5MのNaCl(最終0.83M)、および1.25部の0.85%のH₃PO₄(最終0.17%)を使用して、1分の再生注入を実施した。

10

【0325】

次いで、SPRエピトープデータ解析ソフトウェアパッケージ(Carterra Inc.)において、ネットワークコミュニティプロットアルゴリズムを使用して、エピトープピンを決定した。クラスタリングアルゴリズムによって、リガンドデータと解析物データの両方が利用可能であるmAbとは別に、解析物データのみが利用可能であるmAbがグループ化されることに留意されたい。この現象は、不完全競合行列のアーチファクトである。リガンドデータと解析物データの両方を有するmAbは、より多くのmAb-mAb測定値を有し、より強いmAb-mAb接続をもたらし、コミュニティプロットにおいてより緊密な関係をもたらした。

20

【0326】

エピトープビニングは、全てのmAbが、イピリムマブと別個のピンに存在することを示した(図3)。

(実施例4)

8.4. 実施例4：腫瘍成長へのCTLA-4 ABPの影響

【0327】

ヒトCTLA-4を発現するトランスジェニックマウス(hCTLA-4 KIマウス)の右脇腹に、MC38腫瘍細胞を皮下移植した。移植後8、11、および14日目に、hCTLA-4 KIマウスを1mg/kgの示したCTLA-4抗体で処置した。詳細には、マウスを、対照抗体(n=8)、イピリムマブ(n=8)、CTLA4.A2抗体(n=8)、CTLA4.A14抗体(n=9)、CTLA4.A14.2a抗体(n=8)、CTLA4.A7抗体(n=9)、CTLA4.A7抗体(n=9)、およびCTLA4.A12抗体(n=8)で処置した。CTLA4.A14.2a抗体は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を増強する、マウスIgG2aバックグラウンドにクローニングされたA14抗体である。腫瘍体積を測定し、腫瘍成長阻害を以下の式を使用して計算した：

30

$$\text{平均阻害\%} = (\text{平均}(C) - \text{平均}(T)) / \text{平均}(C) \times 100\%$$

T - 本発明の群の値

C - 対照群の値

40

【0328】

腫瘍発生のために、0.1mLのPBS中MC38腫瘍細胞(1×10^6 個)により、腫瘍を右脇腹領域に皮下移植した。指数増殖期にある細胞を採取し、腫瘍移植前に、細胞計数計で定量した。腫瘍体積は、カリパスを使用して、2次元で週に2回測定し、体積は、以下の式を使用してmm³で表現する：“ $V = (L \times W \times W) / 2$ ”(式中、Vは、腫瘍体積であり、Lは、腫瘍長(最も長い腫瘍寸法)であり、Wは、腫瘍幅(Lに対して垂直な最も長い腫瘍寸法)である)。投与ならびに腫瘍および体重の測定は、Laminar Flow Cabinet内で行った。体重および腫瘍体積は、Study Director(商標)ソフトウェア(バージョン3.1.399.19)を使用することによって測定した。0.1mg/mLの示したタンパク質を含む滅菌食塩水溶液中の示したタンパ

50

ク質を動物に i . p . (腹腔内) 投与した。各マウスは、体重 1 グラム当たり 1 0 マイクロリットルの示した溶液 (1 m g / k g の投与をもたらす) を受けた。無作為化後 0、3、および 6 日目に動物に投与した。

【 0 3 2 9 】

表 9 は、腫瘍が処置に対する完全奏効 (C R) を有したマウスのパーセンテージを示す。処置開始後の少なくとも 2 回の連続的な腫瘍測定値 0 m m ³ を C R とみなす。

【表 9】

表 9	
抗体	CR を有する腫瘍の%
対照	12.5% (8 匹のうちの 1 匹)
イピリムマブ	75% (8 匹のうちの 6 匹)
CTLA4.A2	100% (8 匹のうちの 8 匹)
CTLA4.A14	66.67% (9 匹のうちの 6 匹)
CTLA4.A14.2a	75% (8 匹のうちの 6 匹)
CTLA4.A7	55.6% (9 匹のうちの 5 匹)
CTLA4.A12	50% (8 匹のうちの 4 匹)

10

【 0 3 3 0 】

表 1 0 は、C R を有したが、その後に、5 6 日目までに再発した腫瘍を有するマウスのパーセンテージを示す。以前に C R を示した C T L A 4 . A 1 4 . 2 a で処置した群は、5 6 日目までに 0 % しか再発せず、A D C C が抗腫瘍免疫を延長させることができることを示す。

【表 1 0】

表 10	
抗体	以前に CR を示した腫瘍の 56 日目までの再発の%
イピリムマブ	16.67% (6 匹のうちの 1 匹)
CTLA4.A2	25% (8 匹のうちの 2 匹)
CTLA4.A14	33.3% (6 匹のうちの 2 匹)
CTLA4.A14.2a	0% (6 匹のうちの 0 匹)

30

【 0 3 3 1 】

表 1 1 は、M C 3 8 腫瘍細胞を移植した h C T L A - 4 K I マウスを 1 m g / k g の対照または 1 m g / k g の示した C T L A - 4 抗体で処置した場合の、経時的な腫瘍体積の平均阻害を示す。

【表 1 1】

表 11: 平均阻害											
研究日	8	11	14	17	21	24	27	29	31	35	38
対照	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
イピリムマブ	-3.81%	0.44%	31.41%	69.65%	84.04%	90.73%	96.00%	96.92%	96.61%	87.45%	88.27%
CTLA4.A7	-7.49%	10.91%	34.54%	60.11%	70.73%	81.04%	78.25%	78.75%	70.60%	50.50%	43.41%
CTLA4.A2	-6.79%	-6.10%	26.70%	61.14%	85.22%	97.98%	99.58%	100.00%	100.00%	99.55%	99.36%
CTLA4.A12	-5.89%	12.35%	34.21%	49.59%	70.56%	86.82%	90.22%	91.82%	91.13%	68.63%	70.44%
CTLA4.A14	-7.37%	-6.91%	26.70%	58.54%	80.64%	93.71%	95.73%	97.23%	97.26%	92.22%	90.17%
CTLA4.A14.2a	-4.74%	-20.04%	9.74%	40.80%	65.98%	87.85%	93.48%	95.01%	93.66%	81.40%	82.75%

40

(実施例 5)

実施例 5 : 全身的抗腫瘍免疫への C T L A 4 A B P の影響

【 0 3 3 2 】

50

MC38腫瘍を有するhCTLA4 KIマウスを、上記で説明したように、腫瘍細胞移植後8、11、および14日目に、示した抗CTLA4で処置した。腫瘍がCRをディスプレイしたマウスを、MC38細胞の反対側の脇腹への移植により再チャレンジした。表12は、研究最終日の元の腫瘍または再チャレンジ腫瘍の個々のマウスの腫瘍体積(mm³) (元の腫瘍細胞移植の73日後および再チャレンジ移植の30日後)を示す。元の腫瘍がCRのままであったマウスの再チャレンジ腫瘍は成長しなかった。再チャレンジ腫瘍で成長が見られた3つの例は、元の腫瘍が再成長し始めたマウスにおいてであった(表12を参照されたい)。この結果は、CTLA4.A2が、原発腫瘍(元の腫瘍)が再発する場合であっても保護的な全身抗腫瘍免疫を誘導し得ることも示した(表13を参照されたい)。

10

【表12】

表 12						
	イピリムマブ (元の腫瘍)	イピリムマブ (再チャレンジ腫瘍)	CTLA4.A2 (元の腫瘍)	CTLA4.A2 (再チャレンジ腫瘍)	CTLA4.A14 (元の腫瘍)	CTLA4.A14 (再チャレンジ腫瘍)
腫瘍体積 (mm ³)	0	0	0	0	105.7	85.3
	1822.3	149.6	0	0	0	0
	0	0	0	0	913.3	98.1
	0	0	0	0	0	0
	0	0	1415	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
			678.9	0		
			0	0		

20

【表13】

表 13	
抗体	原発腫瘍が再発した場合に成長した二次腫瘍の%
イピリムマブ	100% (1匹のうちの1匹)
CTLA4.A2	0% (2匹のうちの0匹)
CTLA4.A14	100% (2匹のうちの2匹)

30

(実施例6)

8.5. 実施例6: CTLA-4 ABPの増加した投与量の影響

【0333】

抗CTLA-4で処置したMC38腫瘍

【0334】

ヒトCTLA-4を発現する2から8匹のトランスジェニックマウス(hCTLA-4 KIマウス)の右脇腹にMC38腫瘍細胞を移植した。平均腫瘍サイズが98.5 mm²に達した場合に無作為化を開始した。hCTLA-4 KIマウスを、無作為化後0日目に開始する5回の投与として、5 mg/kgの示した抗CTLA4で隔週処置した。投与した抗体を表14に示す。CTLA4.A14.2aは、ADCC活性を増強するマウスIgG2a骨格でクローニングされる抗体A14である。接頭辞297は、hIgG1FcがN297アミノ酸で変異し、グリコシル化、よってADCCを含むFcエフェクター機能を排除することを示す。

40

【0335】

A) 腫瘍成長阻害

【0336】

研究の経過にわたって、腫瘍成長阻害を以下の式を使用して決定した:

平均阻害% = (平均(C) - 平均(T)) / 平均(C) × 100%

50

T - 本発明の群の値

C - 対照群の値

【 0 3 3 7 】

この結果は、F c 活性を欠如する抗体が全体的有効性を低下させることを示した。これらの抗体は、一部の動物において腫瘍退縮を依然として誘導することができ、抗 C T L A 4 が、F c 依存性作用機序と F c 非依存性作用機序の両方によって作用することを示し、A D C C および A D C P を含む、F c 活性を欠如する抗 C T L A 4 が、抗腫瘍応答を誘導し得ることを示す（表 1 4 および 1 5 ）。

【表 1 4】

表 14							
	平均阻害						
研究日	0	3	6	10	13	17	20
1×PBS(陰性対照)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
イピリムマブ	0.31%	-21.76%	12.56%	75.43%	91.55%	95.54%	98.71%
CTLA4.A5	0.74%	-28.09%	-6.22%	64.17%	87.32%	98.32%	100.00%
CTLA4.A14	-0.56%	-13.30%	5.33%	68.17%	86.21%	92.79%	97.52%
CTLA4.A12	0.40%	-32.59%	-14.13%	57.48%	83.00%	94.99%	98.04%
CTLA4.A8	0.26%	-18.48%	-14.18%	52.53%	78.37%	96.15%	97.96%
CTLA4.A7	-0.61%	-7.67%	10.04%	76.74%	94.36%	98.88%	100.00%
CTLA4.A2	0.27%	-23.97%	-9.95%	60.95%	89.33%	98.35%	100.00%
CTLA4.A13	-1.15%	-7.61%	6.23%	49.18%	64.82%	93.82%	95.23%
CTLA4.A5.2a	0.88%	11.78%	27.51%	66.64%	89.02%	96.85%	100.00%
CTLA4.A14.2a	1.04%	-7.89%	21.12%	45.60%	84.83%	97.30%	100.00%
イピリムマブ.297	0.68%	8.27%	21.37%	22.75%	16.02%	25.70%	26.39%
CTLA4.A5.297	-0.33%	17.56%	18.58%	5.70%	-15.40%	4.65%	13.61%

【表 1 5】

表 15	
腫瘍が処置開始後 13 日目までに退縮し始めた各群の%	
1×PBS(陰性対照)	0%
イピリムマブ	100%
CTLA4.A5	100%
CTLA4.A14	100%
CTLA4.A12	88%
CTLA4.A8	100%
CTLA4.A7	100%
CTLA4.A2	100%
CTLA4.A13	86%
CTLA4.A5.2a	100%
CTLA4.A14.2a	100%
イピリムマブ.297	25%
CTLA4.A5.297	14%

【 0 3 3 8 】

B) 組織病理学的解析 :

【 0 3 3 9 】

h C T L A - 4 マウスを安楽死させ、それらの右腎を組織病理学解析のために採取した。組織をホルマリン固定およびパラフィン包埋し、5 μm の切片に切断し、これらを標準的なヘマトキシリンエオシン (H & E) 染色ならびに抗 I g G および抗 C 3 免疫組織化学 (I H C) 染色のためにスライドガラス上に配置した。染色したスライドをデジタル画像として調製した。実験動物および毒性病理学において経験を有する委員会認定の獣医病理学者は、全ての所見に関して H & E 画像を評価し、陽性染色の位置、強度、およびパーセントについて抗 I g G および C 3 のスライドを評価した。H & E 画像における所見を 0 から 5 のスケールでスコア化した (0 = 正常範囲、1 = 最小限の所見または認識できる最も少ない変化、2 = 軽い所見、3 = 中程度、4 = 顕著、および 5 = 重度または可能な限り最大限)。I H C 画像の所見を強度について 1 から 4 のスケールで (0 = 陰性、1 = 最小限またはわずかに陽性および 4 = 非常に暗い)、および糸球体における陽性細胞のパーセントとして (少なくとも 5 つの糸球体を精査した後に) スコア化した。

10

【0340】

H & E、免疫グロブリン、または C 3 染色の画像は、盲検病理学者によってスコア化され、結果を図 4 に示す。主な H & E の所見は、腎臓間質における白血球が、通常糸球体に関与しないことであった。糸球体における I g および C 3 沈着のスコア化を図 4 にも示す。

【0341】

C) アルカリホスファターゼ:

【0342】

アルカリホスファターゼレベルの変化について、h C T L A - 4 マウスも解析した。血清中のアルカリホスファターゼのレベルを、A B A X I S V e t S c a n V S 2 上の包括的診断用ローターを使用して決定した。

20

【0343】

この研究は、イピリムマブ (I P I) が、免疫媒介性肝炎の指標であり得るアルカリホスファターゼレベルを上昇させることを見出した。C T L A 4 抗体 (例えば、C T L A 4 . A 1 4 . 2 A) は、アルカリホスファターゼレベルの上昇の低下を示した (図 5)。本開示の C T L A 4 抗体によって誘導されるアルカリホスファターゼにおけるこの上昇の低下は、これらが、イピリムマブなどの処置よりも免疫媒介性肝炎を誘発する可能性が低いことを示し得る。

(実施例 7)

30

8.6. 実施例 7: 第 2 の腫瘍モデルへの C T L A - 4 A B P の影響

【0344】

抗 C T L A - 4 で処置した R M 1 腫瘍

【0345】

ヒト C T L A - 4 を発現するトランスジェニックマウス (h C T L A - 4 K I マウス) の右脇腹に R M 1 腫瘍細胞を移植した。(ヒト I g G 1 アイソタイプ陰性対照 n = 7、アテゾリムマブ n = 8、全ての他の群について n = 11)。h C T L A 4 K I マウスを、表 16 に示した抗体で処置した。無作為化後 0、3、および 6 日目に C T L A 4 抗体を 5 m g / k g で投与し、無作為化後 0 日目に開始して 3 週間、隔週、アテゾリムマブを 5 m g / k g で投与した。無作為化後 0、3、および 6 日目にヒト I g G 1 アイソタイプ陰性対照を 5 m g / k g で投与した。腫瘍成長の平均阻害を以下の式を使用して 0、4、7、11、14、および 18 日目に決定した。

40

平均阻害 % = (平均 (C) - 平均 (T) / 平均 (C) × 100 %

T - 本発明の群の値

C - 対照群の値

【0346】

表 16 は、研究の経過にわたって、対照、C T L A 4 抗体、およびアテゾリムマブ処置についての平均阻害値を示す。

50

【表 16】

表 16						
	平均阻害					
研究日	0	4	7	11	14	18
ヒト IgG1 アイソタイプ (陰性対照)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
イピリムマブ	2.14%	11.33%	30.07%	41.96%	52.16%	57.56%
CTLA4.A2	0.09%	-12.28%	25.30%	43.83%	50.20%	59.41%
CTLA4.A14	-0.17%	-7.72%	22.10%	36.93%	48.84%	55.18%
アテゾリズマブ	1.83%	17.66%	0.41%	-3.02%	-7.89%	-2.89%
アテゾリズマブ+イピリ ムマブ	-0.47%	-3.31%	18.00%	29.81%	30.39%	35.21%
アテゾリズマブ +CTLA4.A2	1.50%	-6.72%	23.00%	41.64%	40.93%	44.30%
アテゾリズマブ +CTLA4.A14	0.87%	2.55%	31.58%	45.65%	47.43%	55.18%

(実施例 8)

8 . 7 . 実施例 8 : 併用処置 (ペンブロリズマブおよび抗 C T L A 4)

【 0 3 4 7 】

ヒト C T L A - 4 および P D - 1 を発現するトランスジェニックマウス (h C T L A 4 - h P D 1 K I マウス、処置群当たり n = 8) の右脇腹に 1×10^6 個の M C 3 8 腫瘍細胞を皮下移植した。h C T L A 4 - h P D 1 K I マウスを対照 (1 × リン酸緩衝食塩水、または P B S) ; 2 m g / k g のペンブロリズマブ (p e m b r o) または 2 m g / k g の p e m b r o + 5 m g / k g の抗 C T L A 4 で処置し、無作為化後 1 日目に開始して 3 週間、毎週 2 回、表 1 7 に示したように、動物 1 匹当たり 1 0 m l / k g の用量体積で i . p . 投与した。対照処置と比較して各処置によって誘導された腫瘍成長の平均 (%) デルタ阻害を以下の式を使用して計算し、結果を表 1 7 に示す。

平均 % 阻害 = ((平均 (C) - 平均 (C ₀)) - (平均 (T) - 平均 (T ₀))) / (平均 (C) - 平均 (C ₀)) × 1 0 0 %

T - 本発明の群の値

T ₀ - 本発明の群の初期値

C - 対照群の値

C ₀ - 対照群の初期値

【表 17】

表 17							
	平均デルタ阻害						
研究日	4	7	10	14	17	21	24
対照	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
ペムブロリズマブ	44.33%	44.20%	30.78%	20.92%	10.08%	8.62%	-11.94%
ペムブロリズマブ +CTLA4.A5	29.57%	79.32%	85.83%	87.28%	86.27%	78.55%	97.36%
ペムブロリズマブ +CTLA4.A1	-82.05%	-5.30%	41.81%	50.97%	55.73%	52.23%	66.74%

【 0 3 4 8 】

本研究は、p e m b r o 単独で処置したマウスは 2 4 日目に腫瘍成長阻害を示さなかったが、しかし、示した C T L A 4 抗体の添加によって、研究の経過にわたる腫瘍成長阻害が増加したことを示した。

【 0 3 4 9 】

実験の終わりに、選択した腫瘍を回収し、フローサイトメトリーを行って、腫瘍内免疫細胞集団を調査した。このデータは、抗CTLA4が、腫瘍内NK細胞集団を増加させながら、腫瘍内Treg集団を減少させることを示す(図6)。

(実施例9)

8.8. 実施例9：免疫に関連する有害事象

【0350】

ヒトCTLA-4を発現するトランスジェニックマウス(hCTLA-4 KIマウス)の右脇腹にMC38腫瘍細胞を移植した。hCTLA-4 KIマウスを、移植後8、11、および14日目に、1mg/kgの示したCTLA-4抗体で処置した。移植後8、11、14、および17日目に、マウスの体重を計った。動物の数は、イピリムマブに対してn=8、A7に対してn=9、A2に対してn=8、A14に対してn=9、およびA14.2に対してn=8であった。示した抗CTLA4処置を受けているマウスの体重のパーセント変化を図7に示す。

10

【0351】

CTLA4.A7、CTLA4.A14、およびCTLA4.A14.2aで処置したマウスは、抗CTLA4の最終投与後に体重減少を示さないようであった(図7)。この所見は、免疫関連の有害事象(irAE)が、ADCCを増強する抗CTLA4(例えば、CTLA.A14.2a)が投与された場合により大きくなることが報告されているため、予測されていなかった。このデータは、遮断活性の低下した抗CTLA4が、ADCCが増強される場合であっても、irAEの誘導を限定し得ることを示唆する。

20

(実施例10)

8.9. 実施例10：末梢フローサイトメトリー

【0352】

ヒトCTLA-4を発現するトランスジェニックマウス(hCTLA-4 KIマウス)の右脇腹にMC38腫瘍細胞を移植した。hCTLA-4 KIマウスを、移植後8、11、および14日目に、1mg/kgの示したCTLA-4抗体で処置した。27日目に末梢フローサイトメトリーを実施した。100μLの血液を染色に使用した。末梢血フローサイトメトリーからの所見を図8~10に示す。

【0353】

この結果は、CTLA4.A2およびCTLA4.A14が、末梢T細胞(CD3+)の上昇を低下させることを示した。CTLA4.A14.2aによりADCCを増強することによって、新たに活性化されたT細胞(CD69+)が増加した。CTLA4.A2およびCTLA4.A14は、より少ない従来にない調節細胞(CD4+PD1+、CD4+ICOS+)しかもたらさなかった。(図8を参照されたい)。

30

【0354】

結果は、CTLA4.A2およびCTLA4.A14が、CD8+ T細胞をより強く増強することも示した。CTLA4.A2は、新たに活性化されたT細胞(CD8+CD69+)をより強く増強し、イピリムマブと比較してT細胞の枯渇(CD8+PD1+)を低下させた。ICOSは、抗CTLA4に対する薬力学マーカーとして記載されている。CTLA4.A14.2aによりADCCを増強することにより、CD8+ICOS+細胞はさらに増加したようであった(図9)。結果は、CTLA4.A2およびCTLA4.A14.2aが、樹状細胞(DC)および活性化DC(CD86+)の頻度によって判断されるように、イピリムマブと比較して低下した末梢免疫活性化をもたらすことも示した。(図10を参照されたい)。

40

(実施例11)

8.10. 実施例11：低用量のCTLA-4研究による処置

【0355】

ヒトCTLA-4を発現するトランスジェニックマウス(hCTLA-4 KIマウス)の右脇腹領域に、腫瘍発生のための、0.1mLのPBS中のMC38腫瘍細胞(1E6)を皮下移植した。指数増殖期にある細胞を採取し、腫瘍移植前に、細胞計数計で定量

50

した。平均腫瘍体積が 96.15 mm^3 となった場合に、hCTLA-4 KIマウスを無作為化し、無作為化後0、3および6日目に、 0.3 mg/kg の、示した抗CTLA4、イピリムマブ、またはヒトIgG1アイソタイプ対照（アイソタイプ）で処置した。腫瘍体積および阻害の平均％を実施例4に記載したように決定した。CTLA4.A2およびCTLA4.A14は、18日間の研究にわたり、有意に高い腫瘍阻害をもたらした。この研究の結果を表18および図11に示す。

【表18】

表 18						
群	日付/研究日					
	12/6/2019	12/10/2019	12/13/2019	12/17/2019	12/20/2019	12/24/2019
	0	4	7	11	14	18
アイソタイプ						
イピリムマブ	-0.17%	9.33%	18.68%	22.37%	27.23%	11.84%
CTLA4.A2	0.22%	13.00%	23.03%	49.09%	60.03%	59.54%
CTLA4.A14	0.01%	23.39%	35.06%	53.05%	57.50%	45.41%

9. 参照による組み込み

【0356】

本出願において引用される全ての刊行物、特許、特許出願および他の文書は、それぞれ個々の刊行物、特許、特許出願または他の文書が全ての目的で参照により本明細書に組み込まれることを個々に示されているのと同程度に、全ての目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10. 均等物

【0357】

様々な具体的な実施形態が例示および記載されているが、上記明細書は限定的ではない。本開示の趣旨および範囲を逸脱することなく、様々な変更がなされ得ることが認識される。多くの変更は、本明細書を鑑みて当業者にとって明らかになる。

10

20

30

40

50

【表 19 - 1】

表19は、抗体軽鎖、重鎖、CDR、およびヒトCTLA4に関する配列を提供する。

表 19		
配列 番号	配列	鎖 (抗体)
1	EIVLTQSPGTLSPGEGATLSCRASQSFSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPFTFGPGTKVDIK	L1 (A1)
2	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGRSPFTFGPGTKVDIK	L2 (A2)
3	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK	L3 (A3)
4	EIVLTQSPGTLSPGDRATLSCRASQSGSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPFTSGPGTKVDIK	L4 (A4)
5	EIVLTQSPGTLSPGDRATLSCRASQSGSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPFTSGPGTKVDIK	L5 (A5)
6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK	L6 (A6)
7	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK	L7 (A7)
8	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK	L8 (A8)
9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK	L9 (A9)
10	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK	L10 (A10)
11	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQS GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPPTFGQGTKVEIK	L11 (A11)
12	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPWTFGQGTKVEIK	L12 (A12)
13	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK	L13 (A13)
14	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTSGQGTKVEIK	L14 (A14)
15	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK	L15 (A15)
16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQNYNSAPWTFGQGTKVEIK	L16 (A16)
17	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQS GVPPRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGKVEIK	L17 (A17)
18	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK	L18 (A18)
19	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSMYTFGQGTKLEIK	L19 (A19)
20	EIVLTQSPGTLSPGGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGRSPFTFGPGTKVDIK	L20 (A20)
21	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLHNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG SNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQTLQTPLTFGGGKVEIK	L21 (A21)

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 2】

22	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQAIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQS GVPPRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLOHNSYPLTFGGGKVEIK	L22 (A22)
23	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGPSPWTFGGGKVEIK	L23 (A23)
24	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYRTPFTFGPGTKVDIK	L24 (A24)
25	EIVMTQSPATLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWYQQKPGQAPRLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLQPEDFAVYYCQQGYNLPFTAGPGTKVDIK	L25 (A25)
26	DVVMQTQSPSLSPVTLLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYK VSNRDSGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPITSGQGTRLE IK	L26 (A26)
27	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYHCQQYGRSPWTLGGGKVEIK	L27 (A27)
28	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTSGQGKVEIK	L28 (A28)
101	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGRNKYYVDSVKGRFTISRDNNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEFFGEFFD YWGGGTLVTSSA	H1 (A1)
102	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGRNKHYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDWGPYF DYWGQGTTLVTSSA	H2 (A2)
103	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWNWY DGSNKHYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGVWGPYF DYWGQGTTLVTSSA	H3 (A3)
104	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGIHWVRQAPGKGLQWVAWIWYD GRNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRSGSFGAFDIW GQGTMTVTSSA	H4 (A4)
105	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMYSLRAEDTAVYYCARGGILAGIF DYWGQGTTLVTSSA	H5 (A5)
106	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGSYKYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARAPHYAILTG YYEDYWGGGTLVTSSA	H6 (A6)
107	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSFGMHWRQAPGKGLEWVAWIWY DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHYFGAFDI WGQGTMTVTSSA	H7 (A7)
108	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGRNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYSCARAGELGPFDY WGQGTTLVTSSA	H8 (A8)
109	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGSNKHYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDILTYGYG YWGGGTLVTSSA	H9 (A9)
110	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGSNKHYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLGPFDY WGQGTTLVTSSA	H10 (A10)
111	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DVGNKYYIDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYGSGSPR HFDYWGGGTLVTSSA	H11 (A11)
112	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGSNKYYADSVKGRFTFSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLMGAFD YWGGGTLVTSSA	H12 (A12)
113	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGRNKDYADSVKGRITISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLGPYFD YWGGGTLVTSSA	H13 (A13)
114	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGTGLEWVAWIWY EGRNKYYADPVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRDDDTAVYYCARAGDLGAFDI WGQGTMTVTSSA	H14 (A14)
115	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWY DGSNKHYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGLIGAFDI WGQGTMTVTSSA	H15 (A15)

10

20

30

40

50

【表 19 - 3】

116	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGIHWVRQAPGKGLEWVAIVYD GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLGPFDFY WGQGLVTVSSA	H16 (A16)
117	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGG GLSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLLWLGFDFY WGQGLVTVSSA	H17 (A17)
118	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVY DGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGHLGSFDY WGQGLVTVSSA	H18 (A18)
119	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINP SVGSTSYAQKFQGRVTMTDTSTVYMESSLRSED TAVYYCAREVRVRGVIIIP FFDYWDQGLVTVSSA	H19 (A19)
120	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISA YNGNTNYAQKFQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAK VSGYFDY WGQGLVTVSSA	H20 (A20)
121	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVY DGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRADDTAVYYCARMRLGAPYY YGMDEVWGQGLVTVSSA	H21 (A21)
122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLGIAWYFDV WGRGLVTVSSA	H22 (A22)
123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISA YNGNTYYAQKFQGRVTMTDTSTSTAYVELRSLRSDDTAVYYCARVTGRDAFDI WGQGLVTVSSA	H23 (A23)
124	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLECMGWISA YNGNTNYAQKFQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVGPINLDY WGQGLVTVSSA	H24 (A24)
125	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISV YNGNTNYAQKFQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLISDDTAVYYCARLGKGLFDY WGQGLVTVSSA	H25 (A25)
126	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASDYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISA YNGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTNTAYLELRSLRSDDTAVYYCARDYYDSSGY FDYWGQGLVTVSSA	H26 (A26)
127	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISA YNGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCGRWVRGVEY WGQGLVTVSSA	H27 (A27)
128	QVQLVESGGGVVQPGRSLGLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTLY DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASLTGSFDY WGQGLVTVSSA	H28 (A28)
1001	QSFSSNY	CDR1-L1 (A1)
1002	QSVSSSY	CDR1-L2 (A2)
1003	QSVSSSY	CDR1-L3 (A3)
1004	QSGSSSY	CDR1-L4 (A4)
1005	QSGSSSY	CDR1-L5 (A5)
1006	QSISSY	CDR1-L6 (A6)
1007	QSVSSSY	CDR1-L7 (A7)
1008	QSVSY	CDR1-L8 (A8)
1009	QSISSY	CDR1-L9 (A9)
1010	QSVSSSY	CDR1-L10 (A10)
1011	QGISSY	CDR1-L11 (A11)
1012	QSVSSSY	CDR1-L12 (A12)
1013	QSVSSSY	CDR1-L13 (A13)
1014	QSVSSSY	CDR1-L14 (A14)
1015	QSVSSSY	CDR1-L15 (A15)
1016	QGISNY	CDR1-L16 (A16)
1017	QAIRND	CDR1-L17 (A17)
1018	QSVSY	CDR1-L18 (A18)
1019	QSVSSSY	CDR1-L19 (A19)
1020	QSVSSSY	CDR1-L20 (A20)

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 4】

1021	QSLHNSNGYNY	CDR1-L21 (A21)
1022	QAIRND	CDR1-L22 (A22)
1023	QSVSSSY	CDR1-L23 (A23)
1024	QSISSY	CDR1-L24 (A24)
1025	QSVSSSY	CDR1-L25 (A25)
1026	QSLVYSDGNTY	CDR1-L26 (A26)
1027	QSVSSSY	CDR1-L27 (A27)
1028	QSVSSSY	CDR1-L28 (A28)
2001	GAS	CDR2-L1 (A1)
2002	GAS	CDR2-L2 (A2)
2003	GAS	CDR2-L3 (A3)
2004	GAS	CDR2-L4 (A4)
2005	GAS	CDR2-L5 (A5)
2006	AAS	CDR2-L6 (A6)
2007	GAS	CDR2-L7 (A7)
2008	GAS	CDR2-L8 (A8)
2009	AAS	CDR2-L9 (A9)
2010	GAS	CDR2-L10 (A10)
2011	AAS	CDR2-L11 (A11)
2012	GAS	CDR2-L12 (A12)
2013	GAS	CDR2-L13 (A13)
2014	GAS	CDR2-L14 (A14)
2015	GAS	CDR2-L15 (A15)
2016	AAS	CDR2-L16 (A16)
2017	AAS	CDR2-L17 (A17)
2018	GAS	CDR2-L18 (A18)
2019	GAS	CDR2-L19 (A19)
2020	GAS	CDR2-L20 (A20)
2021	LGS	CDR2-L21 (A21)
2022	AAS	CDR2-L22 (A22)
2023	GAS	CDR2-L23 (A23)
2024	AAS	CDR2-L24 (A24)
2025	GAS	CDR2-L25 (A25)
2026	KVS	CDR2-L26 (A26)
2027	GAS	CDR2-L27 (A27)
2028	GAS	CDR2-L28 (A28)
3001	QQYGTSPFT	CDR3-L1 (A1)
3002	QQYGRSPFT	CDR3-L2 (A2)
3003	QQYGSSPFT	CDR3-L3 (A3)
3004	QQYGTSPFT	CDR3-L4 (A4)
3005	QQYGTSPFT	CDR3-L5 (A5)
3006	QQSYSTPFT	CDR3-L6 (A6)
3007	QQYGSSPFT	CDR3-L7 (A7)
3008	QQYGSSPWT	CDR3-L8 (A8)
3009	QQSYSTPFT	CDR3-L9 (A9)
3010	QQYGSSPFT	CDR3-L10 (A10)
3011	QQLNSYPPT	CDR3-L11 (A11)
3012	QQYGTSPWT	CDR3-L12 (A12)
3013	QQYGSSPFT	CDR3-L13 (A13)
3014	QQYGSSPWT	CDR3-L14 (A14)
3015	QQYGSSPFT	CDR3-L15 (A15)
3016	QNYNSAPWT	CDR3-L16 (A16)
3017	LQHNSYPLT	CDR3-L17 (A17)
3018	QQYGSSPWT	CDR3-L18 (A18)
3019	QQYGSSMYT	CDR3-L19 (A19)
3020	QQYGRSPFT	CDR3-L20 (A20)
3021	MQTLQTPLT	CDR3-L21 (A21)
3022	LQHNSYPLT	CDR3-L22 (A22)

10

20

30

40

50

【表 1 9 - 5】

3023	QQYGPSPWT	CDR3-L23 (A23)
3024	QQSYRTPFT	CDR3-L24 (A24)
3025	QQGYNLPFT	CDR3-L25 (A25)
3026	MQGTHWPIT	CDR3-L26 (A26)
3027	QQYGRSPWT	CDR3-L27 (A27)
3028	QQYGSSPWT	CDR3-L28 (A28)
4001	GFTFSSFG	CDR1-H1 (A1)
4002	GFTFSNYG	CDR1-H2 (A2)
4003	GFTFSSYG	CDR1-H3 (A3)
4004	GFTFSSYG	CDR1-H4 (A4)
4005	GFTFSSYG	CDR1-H5 (A5)
4006	GFTFSSYG	CDR1-H6 (A6)
4007	GFTLSSFG	CDR1-H7 (A7)
4008	GFTFSRYG	CDR1-H8 (A8)
4009	GFTFSSHG	CDR1-H9 (A9)
4010	GFTLSSYG	CDR1-H10 (A10)
4011	GFTFSSYG	CDR1-H11 (A11)
4012	GFTFSSYG	CDR1-H12 (A12)
4013	GFTFSSYG	CDR1-H13 (A13)
4014	GFTFSSYG	CDR1-H14 (A14)
4015	GFTFRSYG	CDR1-H15 (A15)
4016	GFTFSSYG	CDR1-H16 (A16)
4017	GFTFSNYA	CDR1-H17 (A17)
4018	GFTFSSYG	CDR1-H18 (A18)
4019	GYTFTSYG	CDR1-H19 (A19)
4020	GYTFTSYG	CDR1-H20 (A20)
4021	GFTFSSYG	CDR1-H21 (A21)
4022	GFTFSSYA	CDR1-H22 (A22)
4023	GYTFTSYG	CDR1-H23 (A23)
4024	GYTFTSYG	CDR1-H24 (A24)
4025	GYTFTNYG	CDR1-H25 (A25)
4026	DYTFTYYG	CDR1-H26 (A26)
4027	GYTFTSYG	CDR1-H27 (A27)
4028	GFTFSTYG	CDR1-H28 (A28)
5001	IWYDGRNK	CDR2-H1 (A1)
5002	IWYDGRNK	CDR2-H2 (A2)
5003	NWYDGSNK	CDR2-H3 (A3)
5004	IWYDGRNK	CDR2-H4 (A4)
5005	IWYDGNNK	CDR2-H5 (A5)
5006	IWYDGSYK	CDR2-H6 (A6)
5007	IWYDGSNK	CDR2-H7 (A7)
5008	IWYDGRNK	CDR2-H8 (A8)
5009	IWYDGSNK	CDR2-H9 (A9)
5010	IWYDGSNK	CDR2-H10 (A10)
5011	IWYDVGNK	CDR2-H11 (A11)
5012	IWYDGSNK	CDR2-H12 (A12)
5013	IWYDGRNK	CDR2-H13 (A13)
5014	IWYEGRNK	CDR2-H14 (A14)
5015	IWYDGSNK	CDR2-H15 (A15)
5016	IWYDGSNK	CDR2-H16 (A16)
5017	ISGGGLST	CDR2-H17 (A17)
5018	IWYDGSNK	CDR2-H18 (A18)
5019	INPSVGST	CDR2-H19 (A19)
5020	ISAYNGNT	CDR2-H20 (A20)
5021	IWYDGNNK	CDR2-H21 (A21)
5022	ISGSGGST	CDR2-H22 (A22)
5023	ISAYNGNT	CDR2-H23 (A23)
5024	ISAYNGNT	CDR2-H24 (A24)

10

20

30

40

50

【表 19 - 6】

5025	ISVYNGNT	CDR2-H25 (A25)
5026	ISAYNGNT	CDR2-H26 (A26)
5027	ISAYNGNT	CDR2-H27 (A27)
5028	TYDGSNK	CDR2-H28 (A28)
6001	ARGEFFGEFFDY	CDR3-H1 (A1)
6002	ARGGDWGPYFDY	CDR3-H2 (A2)
6003	ARGGVWGPYFDY	CDR3-H3 (A3)
6004	SRSGSFGAFDI	CDR3-H4 (A4)
6005	ARGGILAAGIFDY	CDR3-H5 (A5)
6006	ARAPHYAILTGYIEDY	CDR3-H6 (A6)
6007	ARAHYFGAFDI	CDR3-H7 (A7)
6008	ARAGELGPFYD	CDR3-H8 (A8)
6009	ARGDILTGYGY	CDR3-H9 (A9)
6010	ARGGQLGPFYD	CDR3-H10 (A10)
6011	ARDYYGSGSPRHFDY	CDR3-H11 (A11)
6012	ARGGLMGAFDY	CDR3-H12 (A12)
6013	ARGLLGPYFDY	CDR3-H13 (A13)
6014	ARAGDLGAFDI	CDR3-H14 (A14)
6015	ARNGLIGAFDI	CDR3-H15 (A15)
6016	ARGSLGPFYD	CDR3-H16 (A16)
6017	AKDLLWLGFYD	CDR3-H17 (A17)
6018	ARGGHLGSFDY	CDR3-H18 (A18)
6019	AREVRVRGVIPFFDY	CDR3-H19 (A19)
6020	AKVSGYFDY	CDR3-H20 (A20)
6021	ARMLRGAPYYYGMDV	CDR3-H21 (A21)
6022	AKLGIWYFDV	CDR3-H22 (A22)
6023	ARVTGRDAFDI	CDR3-H23 (A23)
6024	ARVGPINLDY	CDR3-H24 (A24)
6025	ARLGKGLFDY	CDR3-H25 (A25)
6026	ARDYYDSSGYFDY	CDR3-H26 (A26)
6027	GRWVRGVEY	CDR3-H27 (A27)
6028	ARASLTGSFDY	CDR3-H28 (A28)
7001	MACLGFRHKAQNLAAARTWPCTLLFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIA FVCEYASPGKATEVRVTVLQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSG NQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLYGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLW ILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPI N	ヒト CTLA4

【表 20 - 1】

表20は、示されたクローンの軽鎖、重鎖、およびCDRに関する配列識別子を提供する。

表 20								
抗体クローン番号	配列番号							
	軽鎖	重鎖	CDR1 (軽鎖)	CDR2 (軽鎖)	CDR3 (軽鎖)	CDR1 (重鎖)	CDR2 (重鎖)	CDR3 (重鎖)
1	8000	8496	8992	9488	9984	10480	10976	11472
2	8001	8497	8993	9489	9985	10481	10977	11473
3	8002	8498	8994	9490	9986	10482	10978	11474
4	8003	8499	8995	9491	9987	10483	10979	11475
5	8004	8500	8996	9492	9988	10484	10980	11476
6	8005	8501	8997	9493	9989	10485	10981	11477
7	8006	8502	8998	9494	9990	10486	10982	11478
8	8007	8503	8999	9495	9991	10487	10983	11479
9	8008	8504	9000	9496	9992	10488	10984	11480
10	8009	8505	9001	9497	9993	10489	10985	11481
11	8010	8506	9002	9498	9994	10490	10986	11482
12	8011	8507	9003	9499	9995	10491	10987	11483
13	8012	8508	9004	9500	9996	10492	10988	11484
14	8013	8509	9005	9501	9997	10493	10989	11485

【表 2 0 - 2】

15	8014	8510	9006	9502	9998	10494	10990	11486
16	8015	8511	9007	9503	9999	10495	10991	11487
17	8016	8512	9008	9504	10000	10496	10992	11488
18	8017	8513	9009	9505	10001	10497	10993	11489
19	8018	8514	9010	9506	10002	10498	10994	11490
20	8019	8515	9011	9507	10003	10499	10995	11491
21	8020	8516	9012	9508	10004	10500	10996	11492
22	8021	8517	9013	9509	10005	10501	10997	11493
23	8022	8518	9014	9510	10006	10502	10998	11494
24	8023	8519	9015	9511	10007	10503	10999	11495
25	8024	8520	9016	9512	10008	10504	11000	11496
26	8025	8521	9017	9513	10009	10505	11001	11497
27	8026	8522	9018	9514	10010	10506	11002	11498
28	8027	8523	9019	9515	10011	10507	11003	11499
29	8028	8524	9020	9516	10012	10508	11004	11500
30	8029	8525	9021	9517	10013	10509	11005	11501
31	8030	8526	9022	9518	10014	10510	11006	11502
32	8031	8527	9023	9519	10015	10511	11007	11503
33	8032	8528	9024	9520	10016	10512	11008	11504
34	8033	8529	9025	9521	10017	10513	11009	11505
35	8034	8530	9026	9522	10018	10514	11010	11506
36	8035	8531	9027	9523	10019	10515	11011	11507
37	8036	8532	9028	9524	10020	10516	11012	11508
38	8037	8533	9029	9525	10021	10517	11013	11509
39	8038	8534	9030	9526	10022	10518	11014	11510
40	8039	8535	9031	9527	10023	10519	11015	11511
41	8040	8536	9032	9528	10024	10520	11016	11512
42	8041	8537	9033	9529	10025	10521	11017	11513
43	8042	8538	9034	9530	10026	10522	11018	11514
44	8043	8539	9035	9531	10027	10523	11019	11515
45	8044	8540	9036	9532	10028	10524	11020	11516
46	8045	8541	9037	9533	10029	10525	11021	11517
47	8046	8542	9038	9534	10030	10526	11022	11518
48	8047	8543	9039	9535	10031	10527	11023	11519
49	8048	8544	9040	9536	10032	10528	11024	11520
50	8049	8545	9041	9537	10033	10529	11025	11521
51	8050	8546	9042	9538	10034	10530	11026	11522
52	8051	8547	9043	9539	10035	10531	11027	11523
53	8052	8548	9044	9540	10036	10532	11028	11524
54	8053	8549	9045	9541	10037	10533	11029	11525
55	8054	8550	9046	9542	10038	10534	11030	11526
56	8055	8551	9047	9543	10039	10535	11031	11527
57	8056	8552	9048	9544	10040	10536	11032	11528
58	8057	8553	9049	9545	10041	10537	11033	11529
59	8058	8554	9050	9546	10042	10538	11034	11530
60	8059	8555	9051	9547	10043	10539	11035	11531
61	8060	8556	9052	9548	10044	10540	11036	11532
62	8061	8557	9053	9549	10045	10541	11037	11533
63	8062	8558	9054	9550	10046	10542	11038	11534
64	8063	8559	9055	9551	10047	10543	11039	11535
65	8064	8560	9056	9552	10048	10544	11040	11536
66	8065	8561	9057	9553	10049	10545	11041	11537
67	8066	8562	9058	9554	10050	10546	11042	11538
68	8067	8563	9059	9555	10051	10547	11043	11539
69	8068	8564	9060	9556	10052	10548	11044	11540
70	8069	8565	9061	9557	10053	10549	11045	11541
71	8070	8566	9062	9558	10054	10550	11046	11542
72	8071	8567	9063	9559	10055	10551	11047	11543
73	8072	8568	9064	9560	10056	10552	11048	11544

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3】

74	8073	8569	9065	9561	10057	10553	11049	11545
75	8074	8570	9066	9562	10058	10554	11050	11546
76	8075	8571	9067	9563	10059	10555	11051	11547
77	8076	8572	9068	9564	10060	10556	11052	11548
78	8077	8573	9069	9565	10061	10557	11053	11549
79	8078	8574	9070	9566	10062	10558	11054	11550
80	8079	8575	9071	9567	10063	10559	11055	11551
81	8080	8576	9072	9568	10064	10560	11056	11552
82	8081	8577	9073	9569	10065	10561	11057	11553
83	8082	8578	9074	9570	10066	10562	11058	11554
84	8083	8579	9075	9571	10067	10563	11059	11555
85	8084	8580	9076	9572	10068	10564	11060	11556
86	8085	8581	9077	9573	10069	10565	11061	11557
87	8086	8582	9078	9574	10070	10566	11062	11558
88	8087	8583	9079	9575	10071	10567	11063	11559
89	8088	8584	9080	9576	10072	10568	11064	11560
90	8089	8585	9081	9577	10073	10569	11065	11561
91	8090	8586	9082	9578	10074	10570	11066	11562
92	8091	8587	9083	9579	10075	10571	11067	11563
93	8092	8588	9084	9580	10076	10572	11068	11564
94	8093	8589	9085	9581	10077	10573	11069	11565
95	8094	8590	9086	9582	10078	10574	11070	11566
96	8095	8591	9087	9583	10079	10575	11071	11567
97	8096	8592	9088	9584	10080	10576	11072	11568
98	8097	8593	9089	9585	10081	10577	11073	11569
99	8098	8594	9090	9586	10082	10578	11074	11570
100	8099	8595	9091	9587	10083	10579	11075	11571
101	8100	8596	9092	9588	10084	10580	11076	11572
102	8101	8597	9093	9589	10085	10581	11077	11573
103	8102	8598	9094	9590	10086	10582	11078	11574
104	8103	8599	9095	9591	10087	10583	11079	11575
105	8104	8600	9096	9592	10088	10584	11080	11576
106	8105	8601	9097	9593	10089	10585	11081	11577
107	8106	8602	9098	9594	10090	10586	11082	11578
108	8107	8603	9099	9595	10091	10587	11083	11579
109	8108	8604	9100	9596	10092	10588	11084	11580
110	8109	8605	9101	9597	10093	10589	11085	11581
111	8110	8606	9102	9598	10094	10590	11086	11582
112	8111	8607	9103	9599	10095	10591	11087	11583
113	8112	8608	9104	9600	10096	10592	11088	11584
114	8113	8609	9105	9601	10097	10593	11089	11585
115	8114	8610	9106	9602	10098	10594	11090	11586
116	8115	8611	9107	9603	10099	10595	11091	11587
117	8116	8612	9108	9604	10100	10596	11092	11588
118	8117	8613	9109	9605	10101	10597	11093	11589
119	8118	8614	9110	9606	10102	10598	11094	11590
120	8119	8615	9111	9607	10103	10599	11095	11591
121	8120	8616	9112	9608	10104	10600	11096	11592
122	8121	8617	9113	9609	10105	10601	11097	11593
123	8122	8618	9114	9610	10106	10602	11098	11594
124	8123	8619	9115	9611	10107	10603	11099	11595
125	8124	8620	9116	9612	10108	10604	11100	11596
126	8125	8621	9117	9613	10109	10605	11101	11597
127	8126	8622	9118	9614	10110	10606	11102	11598
128	8127	8623	9119	9615	10111	10607	11103	11599
129	8128	8624	9120	9616	10112	10608	11104	11600
130	8129	8625	9121	9617	10113	10609	11105	11601
131	8130	8626	9122	9618	10114	10610	11106	11602
132	8131	8627	9123	9619	10115	10611	11107	11603

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4】

133	8132	8628	9124	9620	10116	10612	11108	11604
134	8133	8629	9125	9621	10117	10613	11109	11605
135	8134	8630	9126	9622	10118	10614	11110	11606
136	8135	8631	9127	9623	10119	10615	11111	11607
137	8136	8632	9128	9624	10120	10616	11112	11608
138	8137	8633	9129	9625	10121	10617	11113	11609
139	8138	8634	9130	9626	10122	10618	11114	11610
140	8139	8635	9131	9627	10123	10619	11115	11611
141	8140	8636	9132	9628	10124	10620	11116	11612
142	8141	8637	9133	9629	10125	10621	11117	11613
143	8142	8638	9134	9630	10126	10622	11118	11614
144	8143	8639	9135	9631	10127	10623	11119	11615
145	8144	8640	9136	9632	10128	10624	11120	11616
146	8145	8641	9137	9633	10129	10625	11121	11617
147	8146	8642	9138	9634	10130	10626	11122	11618
148	8147	8643	9139	9635	10131	10627	11123	11619
149	8148	8644	9140	9636	10132	10628	11124	11620
150	8149	8645	9141	9637	10133	10629	11125	11621
151	8150	8646	9142	9638	10134	10630	11126	11622
152	8151	8647	9143	9639	10135	10631	11127	11623
153	8152	8648	9144	9640	10136	10632	11128	11624
154	8153	8649	9145	9641	10137	10633	11129	11625
155	8154	8650	9146	9642	10138	10634	11130	11626
156	8155	8651	9147	9643	10139	10635	11131	11627
157	8156	8652	9148	9644	10140	10636	11132	11628
158	8157	8653	9149	9645	10141	10637	11133	11629
159	8158	8654	9150	9646	10142	10638	11134	11630
160	8159	8655	9151	9647	10143	10639	11135	11631
161	8160	8656	9152	9648	10144	10640	11136	11632
162	8161	8657	9153	9649	10145	10641	11137	11633
163	8162	8658	9154	9650	10146	10642	11138	11634
164	8163	8659	9155	9651	10147	10643	11139	11635
165	8164	8660	9156	9652	10148	10644	11140	11636
166	8165	8661	9157	9653	10149	10645	11141	11637
167	8166	8662	9158	9654	10150	10646	11142	11638
168	8167	8663	9159	9655	10151	10647	11143	11639
169	8168	8664	9160	9656	10152	10648	11144	11640
170	8169	8665	9161	9657	10153	10649	11145	11641
171	8170	8666	9162	9658	10154	10650	11146	11642
172	8171	8667	9163	9659	10155	10651	11147	11643
173	8172	8668	9164	9660	10156	10652	11148	11644
174	8173	8669	9165	9661	10157	10653	11149	11645
175	8174	8670	9166	9662	10158	10654	11150	11646
176	8175	8671	9167	9663	10159	10655	11151	11647
177	8176	8672	9168	9664	10160	10656	11152	11648
178	8177	8673	9169	9665	10161	10657	11153	11649
179	8178	8674	9170	9666	10162	10658	11154	11650
180	8179	8675	9171	9667	10163	10659	11155	11651
181	8180	8676	9172	9668	10164	10660	11156	11652
182	8181	8677	9173	9669	10165	10661	11157	11653
183	8182	8678	9174	9670	10166	10662	11158	11654
184	8183	8679	9175	9671	10167	10663	11159	11655
185	8184	8680	9176	9672	10168	10664	11160	11656
186	8185	8681	9177	9673	10169	10665	11161	11657
187	8186	8682	9178	9674	10170	10666	11162	11658
188	8187	8683	9179	9675	10171	10667	11163	11659
189	8188	8684	9180	9676	10172	10668	11164	11660
190	8189	8685	9181	9677	10173	10669	11165	11661
191	8190	8686	9182	9678	10174	10670	11166	11662

10

20

30

40

【表 2 0 - 5】

192	8191	8687	9183	9679	10175	10671	11167	11663
193	8192	8688	9184	9680	10176	10672	11168	11664
194	8193	8689	9185	9681	10177	10673	11169	11665
195	8194	8690	9186	9682	10178	10674	11170	11666
196	8195	8691	9187	9683	10179	10675	11171	11667
197	8196	8692	9188	9684	10180	10676	11172	11668
198	8197	8693	9189	9685	10181	10677	11173	11669
199	8198	8694	9190	9686	10182	10678	11174	11670
200	8199	8695	9191	9687	10183	10679	11175	11671
201	8200	8696	9192	9688	10184	10680	11176	11672
202	8201	8697	9193	9689	10185	10681	11177	11673
203	8202	8698	9194	9690	10186	10682	11178	11674
204	8203	8699	9195	9691	10187	10683	11179	11675
205	8204	8700	9196	9692	10188	10684	11180	11676
206	8205	8701	9197	9693	10189	10685	11181	11677
207	8206	8702	9198	9694	10190	10686	11182	11678
208	8207	8703	9199	9695	10191	10687	11183	11679
209	8208	8704	9200	9696	10192	10688	11184	11680
210	8209	8705	9201	9697	10193	10689	11185	11681
211	8210	8706	9202	9698	10194	10690	11186	11682
212	8211	8707	9203	9699	10195	10691	11187	11683
213	8212	8708	9204	9700	10196	10692	11188	11684
214	8213	8709	9205	9701	10197	10693	11189	11685
215	8214	8710	9206	9702	10198	10694	11190	11686
216	8215	8711	9207	9703	10199	10695	11191	11687
217	8216	8712	9208	9704	10200	10696	11192	11688
218	8217	8713	9209	9705	10201	10697	11193	11689
219	8218	8714	9210	9706	10202	10698	11194	11690
220	8219	8715	9211	9707	10203	10699	11195	11691
221	8220	8716	9212	9708	10204	10700	11196	11692
222	8221	8717	9213	9709	10205	10701	11197	11693
223	8222	8718	9214	9710	10206	10702	11198	11694
224	8223	8719	9215	9711	10207	10703	11199	11695
225	8224	8720	9216	9712	10208	10704	11200	11696
226	8225	8721	9217	9713	10209	10705	11201	11697
227	8226	8722	9218	9714	10210	10706	11202	11698
228	8227	8723	9219	9715	10211	10707	11203	11699
229	8228	8724	9220	9716	10212	10708	11204	11700
230	8229	8725	9221	9717	10213	10709	11205	11701
231	8230	8726	9222	9718	10214	10710	11206	11702
232	8231	8727	9223	9719	10215	10711	11207	11703
233	8232	8728	9224	9720	10216	10712	11208	11704
234	8233	8729	9225	9721	10217	10713	11209	11705
235	8234	8730	9226	9722	10218	10714	11210	11706
236	8235	8731	9227	9723	10219	10715	11211	11707
237	8236	8732	9228	9724	10220	10716	11212	11708
238	8237	8733	9229	9725	10221	10717	11213	11709
239	8238	8734	9230	9726	10222	10718	11214	11710
240	8239	8735	9231	9727	10223	10719	11215	11711
241	8240	8736	9232	9728	10224	10720	11216	11712
242	8241	8737	9233	9729	10225	10721	11217	11713
243	8242	8738	9234	9730	10226	10722	11218	11714
244	8243	8739	9235	9731	10227	10723	11219	11715
245	8244	8740	9236	9732	10228	10724	11220	11716
246	8245	8741	9237	9733	10229	10725	11221	11717
247	8246	8742	9238	9734	10230	10726	11222	11718
248	8247	8743	9239	9735	10231	10727	11223	11719
249	8248	8744	9240	9736	10232	10728	11224	11720
250	8249	8745	9241	9737	10233	10729	11225	11721

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 6】

251	8250	8746	9242	9738	10234	10730	11226	11722
252	8251	8747	9243	9739	10235	10731	11227	11723
253	8252	8748	9244	9740	10236	10732	11228	11724
254	8253	8749	9245	9741	10237	10733	11229	11725
255	8254	8750	9246	9742	10238	10734	11230	11726
256	8255	8751	9247	9743	10239	10735	11231	11727
257	8256	8752	9248	9744	10240	10736	11232	11728
258	8257	8753	9249	9745	10241	10737	11233	11729
259	8258	8754	9250	9746	10242	10738	11234	11730
260	8259	8755	9251	9747	10243	10739	11235	11731
261	8260	8756	9252	9748	10244	10740	11236	11732
262	8261	8757	9253	9749	10245	10741	11237	11733
263	8262	8758	9254	9750	10246	10742	11238	11734
264	8263	8759	9255	9751	10247	10743	11239	11735
265	8264	8760	9256	9752	10248	10744	11240	11736
266	8265	8761	9257	9753	10249	10745	11241	11737
267	8266	8762	9258	9754	10250	10746	11242	11738
268	8267	8763	9259	9755	10251	10747	11243	11739
269	8268	8764	9260	9756	10252	10748	11244	11740
270	8269	8765	9261	9757	10253	10749	11245	11741
271	8270	8766	9262	9758	10254	10750	11246	11742
272	8271	8767	9263	9759	10255	10751	11247	11743
273	8272	8768	9264	9760	10256	10752	11248	11744
274	8273	8769	9265	9761	10257	10753	11249	11745
275	8274	8770	9266	9762	10258	10754	11250	11746
276	8275	8771	9267	9763	10259	10755	11251	11747
277	8276	8772	9268	9764	10260	10756	11252	11748
278	8277	8773	9269	9765	10261	10757	11253	11749
279	8278	8774	9270	9766	10262	10758	11254	11750
280	8279	8775	9271	9767	10263	10759	11255	11751
281	8280	8776	9272	9768	10264	10760	11256	11752
282	8281	8777	9273	9769	10265	10761	11257	11753
283	8282	8778	9274	9770	10266	10762	11258	11754
284	8283	8779	9275	9771	10267	10763	11259	11755
285	8284	8780	9276	9772	10268	10764	11260	11756
286	8285	8781	9277	9773	10269	10765	11261	11757
287	8286	8782	9278	9774	10270	10766	11262	11758
288	8287	8783	9279	9775	10271	10767	11263	11759
289	8288	8784	9280	9776	10272	10768	11264	11760
290	8289	8785	9281	9777	10273	10769	11265	11761
291	8290	8786	9282	9778	10274	10770	11266	11762
292	8291	8787	9283	9779	10275	10771	11267	11763
293	8292	8788	9284	9780	10276	10772	11268	11764
294	8293	8789	9285	9781	10277	10773	11269	11765
295	8294	8790	9286	9782	10278	10774	11270	11766
296	8295	8791	9287	9783	10279	10775	11271	11767
297	8296	8792	9288	9784	10280	10776	11272	11768
298	8297	8793	9289	9785	10281	10777	11273	11769
299	8298	8794	9290	9786	10282	10778	11274	11770
300	8299	8795	9291	9787	10283	10779	11275	11771
301	8300	8796	9292	9788	10284	10780	11276	11772
302	8301	8797	9293	9789	10285	10781	11277	11773
303	8302	8798	9294	9790	10286	10782	11278	11774
304	8303	8799	9295	9791	10287	10783	11279	11775
305	8304	8800	9296	9792	10288	10784	11280	11776
306	8305	8801	9297	9793	10289	10785	11281	11777
307	8306	8802	9298	9794	10290	10786	11282	11778
308	8307	8803	9299	9795	10291	10787	11283	11779
309	8308	8804	9300	9796	10292	10788	11284	11780

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7】

310	8309	8805	9301	9797	10293	10789	11285	11781
311	8310	8806	9302	9798	10294	10790	11286	11782
312	8311	8807	9303	9799	10295	10791	11287	11783
313	8312	8808	9304	9800	10296	10792	11288	11784
314	8313	8809	9305	9801	10297	10793	11289	11785
315	8314	8810	9306	9802	10298	10794	11290	11786
316	8315	8811	9307	9803	10299	10795	11291	11787
317	8316	8812	9308	9804	10300	10796	11292	11788
318	8317	8813	9309	9805	10301	10797	11293	11789
319	8318	8814	9310	9806	10302	10798	11294	11790
320	8319	8815	9311	9807	10303	10799	11295	11791
321	8320	8816	9312	9808	10304	10800	11296	11792
322	8321	8817	9313	9809	10305	10801	11297	11793
323	8322	8818	9314	9810	10306	10802	11298	11794
324	8323	8819	9315	9811	10307	10803	11299	11795
325	8324	8820	9316	9812	10308	10804	11300	11796
326	8325	8821	9317	9813	10309	10805	11301	11797
327	8326	8822	9318	9814	10310	10806	11302	11798
328	8327	8823	9319	9815	10311	10807	11303	11799
329	8328	8824	9320	9816	10312	10808	11304	11800
330	8329	8825	9321	9817	10313	10809	11305	11801
331	8330	8826	9322	9818	10314	10810	11306	11802
332	8331	8827	9323	9819	10315	10811	11307	11803
333	8332	8828	9324	9820	10316	10812	11308	11804
334	8333	8829	9325	9821	10317	10813	11309	11805
335	8334	8830	9326	9822	10318	10814	11310	11806
336	8335	8831	9327	9823	10319	10815	11311	11807
337	8336	8832	9328	9824	10320	10816	11312	11808
338	8337	8833	9329	9825	10321	10817	11313	11809
339	8338	8834	9330	9826	10322	10818	11314	11810
340	8339	8835	9331	9827	10323	10819	11315	11811
341	8340	8836	9332	9828	10324	10820	11316	11812
342	8341	8837	9333	9829	10325	10821	11317	11813
343	8342	8838	9334	9830	10326	10822	11318	11814
344	8343	8839	9335	9831	10327	10823	11319	11815
345	8344	8840	9336	9832	10328	10824	11320	11816
346	8345	8841	9337	9833	10329	10825	11321	11817
347	8346	8842	9338	9834	10330	10826	11322	11818
348	8347	8843	9339	9835	10331	10827	11323	11819
349	8348	8844	9340	9836	10332	10828	11324	11820
350	8349	8845	9341	9837	10333	10829	11325	11821
351	8350	8846	9342	9838	10334	10830	11326	11822
352	8351	8847	9343	9839	10335	10831	11327	11823
353	8352	8848	9344	9840	10336	10832	11328	11824
354	8353	8849	9345	9841	10337	10833	11329	11825
355	8354	8850	9346	9842	10338	10834	11330	11826
356	8355	8851	9347	9843	10339	10835	11331	11827
357	8356	8852	9348	9844	10340	10836	11332	11828
358	8357	8853	9349	9845	10341	10837	11333	11829
359	8358	8854	9350	9846	10342	10838	11334	11830
360	8359	8855	9351	9847	10343	10839	11335	11831
361	8360	8856	9352	9848	10344	10840	11336	11832
362	8361	8857	9353	9849	10345	10841	11337	11833
363	8362	8858	9354	9850	10346	10842	11338	11834
364	8363	8859	9355	9851	10347	10843	11339	11835
365	8364	8860	9356	9852	10348	10844	11340	11836
366	8365	8861	9357	9853	10349	10845	11341	11837
367	8366	8862	9358	9854	10350	10846	11342	11838
368	8367	8863	9359	9855	10351	10847	11343	11839

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 8】

369	8368	8864	9360	9856	10352	10848	11344	11840
370	8369	8865	9361	9857	10353	10849	11345	11841
371	8370	8866	9362	9858	10354	10850	11346	11842
372	8371	8867	9363	9859	10355	10851	11347	11843
373	8372	8868	9364	9860	10356	10852	11348	11844
374	8373	8869	9365	9861	10357	10853	11349	11845
375	8374	8870	9366	9862	10358	10854	11350	11846
376	8375	8871	9367	9863	10359	10855	11351	11847
377	8376	8872	9368	9864	10360	10856	11352	11848
378	8377	8873	9369	9865	10361	10857	11353	11849
379	8378	8874	9370	9866	10362	10858	11354	11850
380	8379	8875	9371	9867	10363	10859	11355	11851
381	8380	8876	9372	9868	10364	10860	11356	11852
382	8381	8877	9373	9869	10365	10861	11357	11853
383	8382	8878	9374	9870	10366	10862	11358	11854
384	8383	8879	9375	9871	10367	10863	11359	11855
385	8384	8880	9376	9872	10368	10864	11360	11856
386	8385	8881	9377	9873	10369	10865	11361	11857
387	8386	8882	9378	9874	10370	10866	11362	11858
388	8387	8883	9379	9875	10371	10867	11363	11859
389	8388	8884	9380	9876	10372	10868	11364	11860
390	8389	8885	9381	9877	10373	10869	11365	11861
391	8390	8886	9382	9878	10374	10870	11366	11862
392	8391	8887	9383	9879	10375	10871	11367	11863
393	8392	8888	9384	9880	10376	10872	11368	11864
394	8393	8889	9385	9881	10377	10873	11369	11865
395	8394	8890	9386	9882	10378	10874	11370	11866
396	8395	8891	9387	9883	10379	10875	11371	11867
397	8396	8892	9388	9884	10380	10876	11372	11868
398	8397	8893	9389	9885	10381	10877	11373	11869
399	8398	8894	9390	9886	10382	10878	11374	11870
400	8399	8895	9391	9887	10383	10879	11375	11871
401	8400	8896	9392	9888	10384	10880	11376	11872
402	8401	8897	9393	9889	10385	10881	11377	11873
403	8402	8898	9394	9890	10386	10882	11378	11874
404	8403	8899	9395	9891	10387	10883	11379	11875
405	8404	8900	9396	9892	10388	10884	11380	11876
406	8405	8901	9397	9893	10389	10885	11381	11877
407	8406	8902	9398	9894	10390	10886	11382	11878
408	8407	8903	9399	9895	10391	10887	11383	11879
409	8408	8904	9400	9896	10392	10888	11384	11880
410	8409	8905	9401	9897	10393	10889	11385	11881
411	8410	8906	9402	9898	10394	10890	11386	11882
412	8411	8907	9403	9899	10395	10891	11387	11883
413	8412	8908	9404	9900	10396	10892	11388	11884
414	8413	8909	9405	9901	10397	10893	11389	11885
415	8414	8910	9406	9902	10398	10894	11390	11886
416	8415	8911	9407	9903	10399	10895	11391	11887
417	8416	8912	9408	9904	10400	10896	11392	11888
418	8417	8913	9409	9905	10401	10897	11393	11889
419	8418	8914	9410	9906	10402	10898	11394	11890
420	8419	8915	9411	9907	10403	10899	11395	11891
421	8420	8916	9412	9908	10404	10900	11396	11892
422	8421	8917	9413	9909	10405	10901	11397	11893
423	8422	8918	9414	9910	10406	10902	11398	11894
424	8423	8919	9415	9911	10407	10903	11399	11895
425	8424	8920	9416	9912	10408	10904	11400	11896
426	8425	8921	9417	9913	10409	10905	11401	11897
427	8426	8922	9418	9914	10410	10906	11402	11898

10

20

30

40

【表 2 0 - 9】

428	8427	8923	9419	9915	10411	10907	11403	11899
429	8428	8924	9420	9916	10412	10908	11404	11900
430	8429	8925	9421	9917	10413	10909	11405	11901
431	8430	8926	9422	9918	10414	10910	11406	11902
432	8431	8927	9423	9919	10415	10911	11407	11903
433	8432	8928	9424	9920	10416	10912	11408	11904
434	8433	8929	9425	9921	10417	10913	11409	11905
435	8434	8930	9426	9922	10418	10914	11410	11906
436	8435	8931	9427	9923	10419	10915	11411	11907
437	8436	8932	9428	9924	10420	10916	11412	11908
438	8437	8933	9429	9925	10421	10917	11413	11909
439	8438	8934	9430	9926	10422	10918	11414	11910
440	8439	8935	9431	9927	10423	10919	11415	11911
441	8440	8936	9432	9928	10424	10920	11416	11912
442	8441	8937	9433	9929	10425	10921	11417	11913
443	8442	8938	9434	9930	10426	10922	11418	11914
444	8443	8939	9435	9931	10427	10923	11419	11915
445	8444	8940	9436	9932	10428	10924	11420	11916
446	8445	8941	9437	9933	10429	10925	11421	11917
447	8446	8942	9438	9934	10430	10926	11422	11918
448	8447	8943	9439	9935	10431	10927	11423	11919
449	8448	8944	9440	9936	10432	10928	11424	11920
450	8449	8945	9441	9937	10433	10929	11425	11921
451	8450	8946	9442	9938	10434	10930	11426	11922
452	8451	8947	9443	9939	10435	10931	11427	11923
453	8452	8948	9444	9940	10436	10932	11428	11924
454	8453	8949	9445	9941	10437	10933	11429	11925
455	8454	8950	9446	9942	10438	10934	11430	11926
456	8455	8951	9447	9943	10439	10935	11431	11927
457	8456	8952	9448	9944	10440	10936	11432	11928
458	8457	8953	9449	9945	10441	10937	11433	11929
459	8458	8954	9450	9946	10442	10938	11434	11930
460	8459	8955	9451	9947	10443	10939	11435	11931
461	8460	8956	9452	9948	10444	10940	11436	11932
462	8461	8957	9453	9949	10445	10941	11437	11933
463	8462	8958	9454	9950	10446	10942	11438	11934
464	8463	8959	9455	9951	10447	10943	11439	11935
465	8464	8960	9456	9952	10448	10944	11440	11936
466	8465	8961	9457	9953	10449	10945	11441	11937
467	8466	8962	9458	9954	10450	10946	11442	11938
468	8467	8963	9459	9955	10451	10947	11443	11939
469	8468	8964	9460	9956	10452	10948	11444	11940
470	8469	8965	9461	9957	10453	10949	11445	11941
471	8470	8966	9462	9958	10454	10950	11446	11942
472	8471	8967	9463	9959	10455	10951	11447	11943
473	8472	8968	9464	9960	10456	10952	11448	11944
474	8473	8969	9465	9961	10457	10953	11449	11945
475	8474	8970	9466	9962	10458	10954	11450	11946
476	8475	8971	9467	9963	10459	10955	11451	11947
477	8476	8972	9468	9964	10460	10956	11452	11948
478	8477	8973	9469	9965	10461	10957	11453	11949
479	8478	8974	9470	9966	10462	10958	11454	11950
480	8479	8975	9471	9967	10463	10959	11455	11951
481	8480	8976	9472	9968	10464	10960	11456	11952
482	8481	8977	9473	9969	10465	10961	11457	11953
483	8482	8978	9474	9970	10466	10962	11458	11954
484	8483	8979	9475	9971	10467	10963	11459	11955
485	8484	8980	9476	9972	10468	10964	11460	11956
486	8485	8981	9477	9973	10469	10965	11461	11957

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 0】

487	8486	8982	9478	9974	10470	10966	11462	11958
488	8487	8983	9479	9975	10471	10967	11463	11959
489	8488	8984	9480	9976	10472	10968	11464	11960
490	8489	8985	9481	9977	10473	10969	11465	11961
491	8490	8986	9482	9978	10474	10970	11466	11962
492	8491	8987	9483	9979	10475	10971	11467	11963
493	8492	8988	9484	9980	10476	10972	11468	11964
494	8493	8989	9485	9981	10477	10973	11469	11965
495	8494	8990	9486	9982	10478	10974	11470	11966
496	8495	8991	9487	9983	10479	10975	11471	11967

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

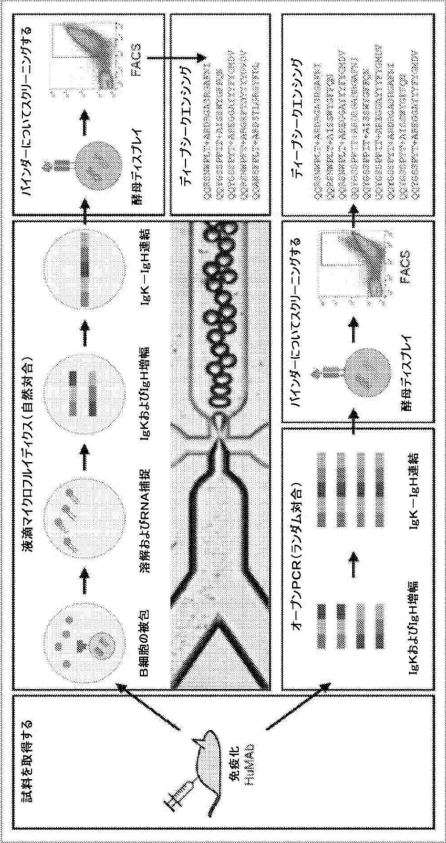


FIG. 1

【図 2】

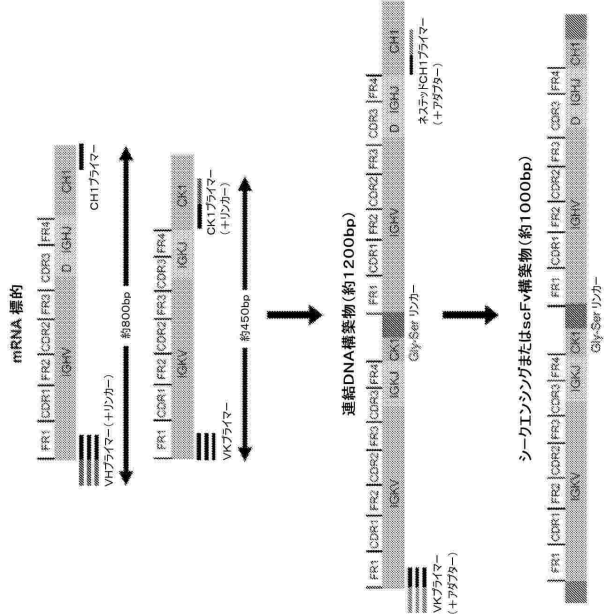


FIG. 2

【図 3】

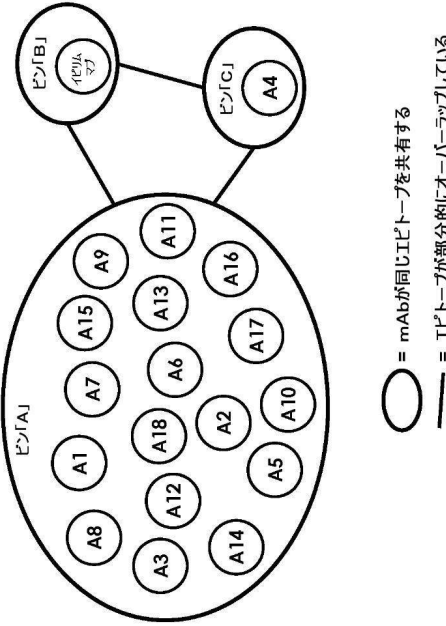


FIG. 3

【図 4】

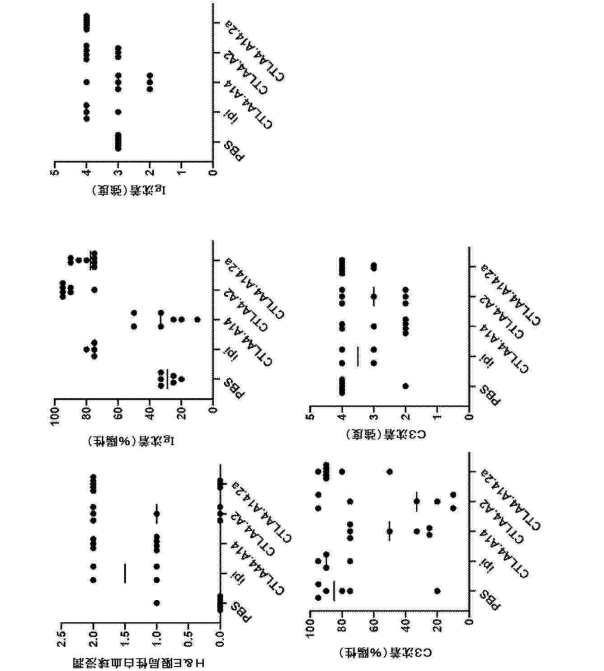


FIG. 4

10

20

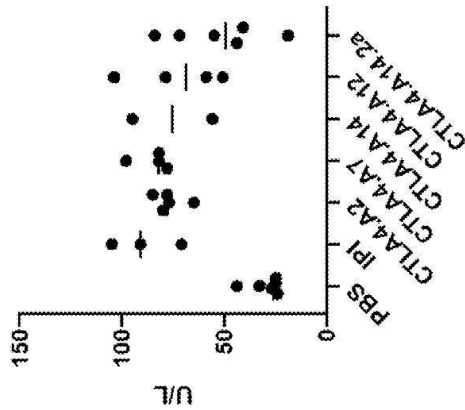
30

40

50

【図 5】

アルカリホスファターゼ



【図 6】

FIG. 5

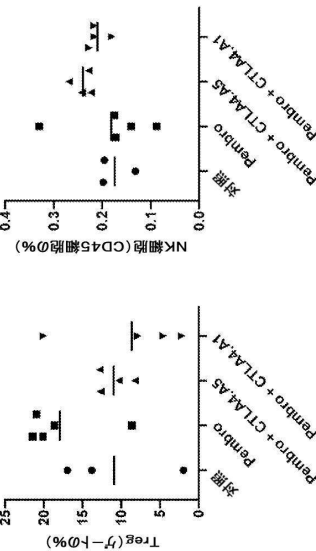
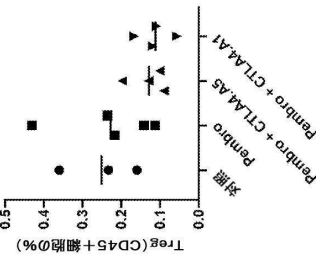


FIG. 6



【図 7】

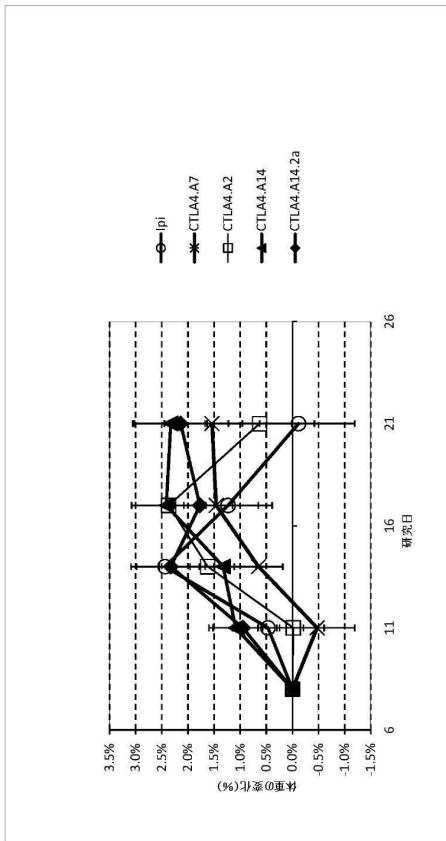


FIG. 7

【図 8】

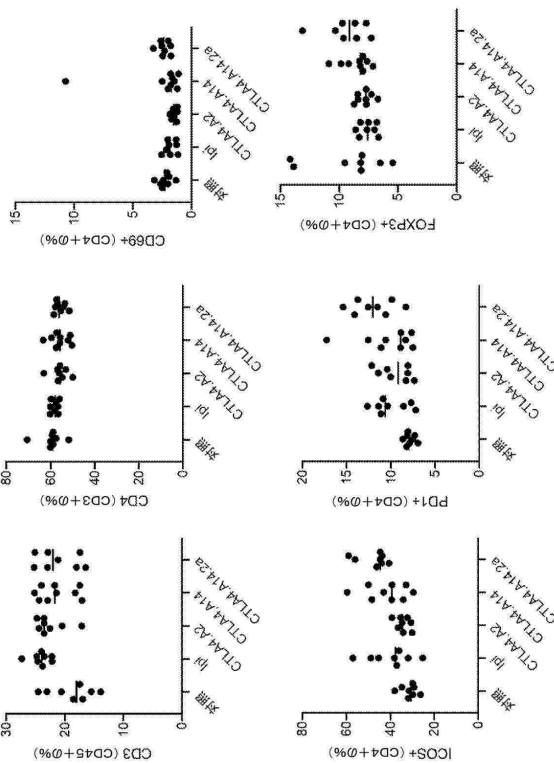
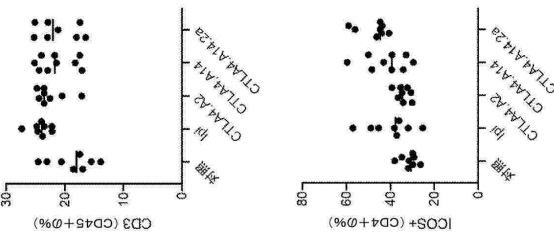
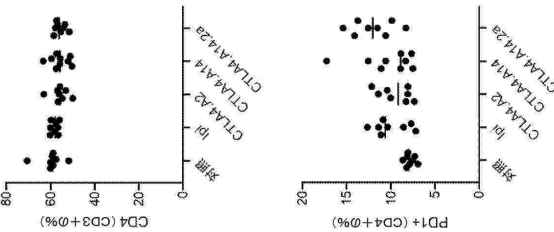


FIG. 8



10

20

30

40

50

【図 9】

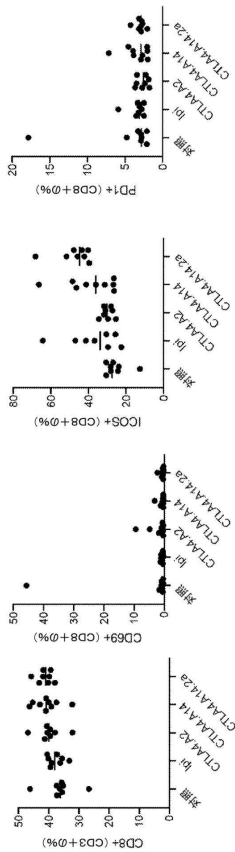


FIG. 9

【図 10】

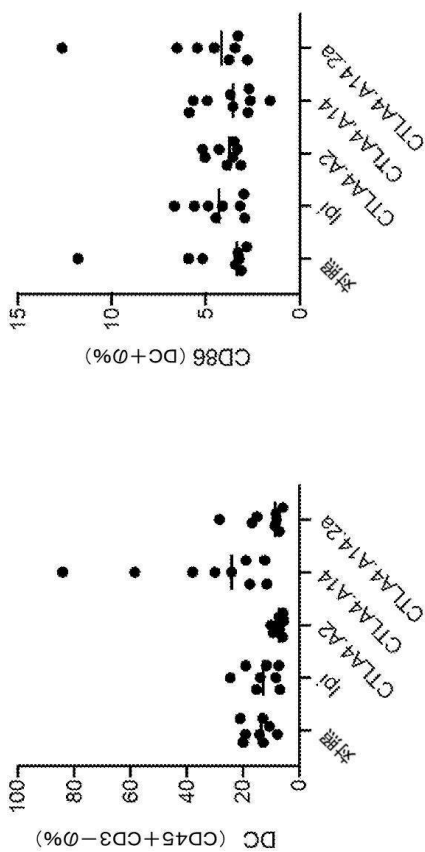


FIG. 10

【図 11】

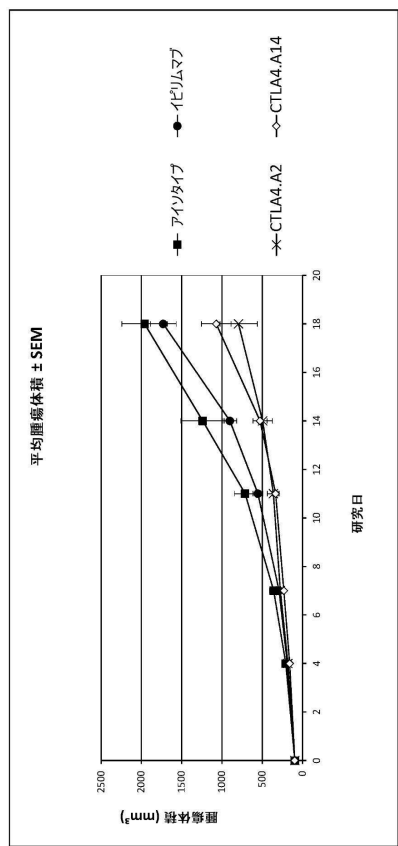


FIG. 11

10

20

30

40

50

【配列表】
0007558949000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	

ATCC PTA-125511

ATCC PTA-125512

ATCC PTA-125513

(72)発明者 ジョンソン, デイビッド スコット

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ワン タワー プレイ
ス, スイート 7 5 0, ギガジェン, インコーポレイティッド 気付

(72)発明者 アドラー, アダム シュルツ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ワン タワー プレイ
ス, スイート 7 5 0, ギガジェン, インコーポレイティッド 気付

(72)発明者 ミズラヒ, レナ アヴィヴァ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ワン タワー プレイ
ス, スイート 7 5 0, ギガジェン, インコーポレイティッド 気付

(72)発明者 リム, ユン ワン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ワン タワー プレイ
ス, スイート 7 5 0, ギガジェン, インコーポレイティッド 気付

(72)発明者 アセンシオ, マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ワン タワー プレイ
ス, スイート 7 5 0, ギガジェン, インコーポレイティッド 気付

(72)発明者 ストーン, エリカ リン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ワン タワー プレイ
ス, スイート 7 5 0, ギガジェン, インコーポレイティッド 気付

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 特表 2 0 1 8 - 5 0 8 5 7 3 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 8 / 2 0 9 7 0 1 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 /

C 0 7 K 1 6 /

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

U n i P r o t / G e n e S e q