

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成24年1月5日(2012.1.5)

【公表番号】特表2010-508297(P2010-508297A)

【公表日】平成22年3月18日(2010.3.18)

【年通号数】公開・登録公報2010-011

【出願番号】特願2009-534892(P2009-534892)

【国際特許分類】

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/06 (2006.01)

A 6 1 P 33/02 (2006.01)

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/22 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 15/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/04 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/08 (2006.01)

A 6 1 P 9/04 (2006.01)

A 6 1 P 17/02 (2006.01)

A 6 1 P 7/02 (2006.01)

C 0 7 K 16/44 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 27/02

A 6 1 P 27/06

A 6 1 P 33/02

A 6 1 P 31/00

A 6 1 P 31/22

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 15/00

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 9/08

A 6 1 P 9/10 1 0 3

A 6 1 P 9/04

A 6 1 P 17/02

A 6 1 P 7/02

C 0 7 K 16/44 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年6月2日(2011.6.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)のレベル上昇に関連する眼の疾患または障害の処置または予防のための、生理的条件下でS1Pに対して反応性の免疫誘導部分である抗S1P剤を含む医薬組成物。

【請求項2】

S1Pのレベルの上昇に関連する眼の疾患または障害が、加齢性黄斑変性症、脈絡膜血管新生、慢性ブドウ膜炎、慢性硝子体炎、角膜移植拒絶反応、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、鎌状赤血球網膜症、特発性ポリープ状脈絡膜血管障害、虚血性網膜症、レーザー損傷、網膜静脈閉塞性疾患、血管新生緑内障、黄斑パッカー、セロファン網膜症、ERM形成、コンタクトレンズの過剰装着、牽引性網膜剥離、増殖性硝子体網膜症、外傷性眼損傷、眼の瘢痕性類天疱瘡、眼ヒストプラスマ症、網膜血管腫増殖、スティーブンス・ジョンソン症候群、中毒性表皮剥離症、翼状片、角膜の感染症、および眼手術の影響からなる群から選択される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

角膜の感染症が、単純ヘルペス感染症、帯状疱疹感染症、および原虫感染症からなる群から選択される、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

眼手術が、屈折矯正手術、硝子体茎切除術および緑内障手術からなる群から選択される、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項5】

S1Pのレベルの上昇に関連する眼の疾患または障害が、異常な新血管形成、異常な線維成長、線維症、瘢痕化および／または炎症によって少なくとも部分的に特徴付けられるものである、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項6】

全身、眼内または局所で投与される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項7】

加齢性黄斑変性症が、乾燥型加齢黄斑変性症である、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項8】

加齢性黄斑変性症が、湿潤型加齢黄斑変性症である、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項9】

眼投与用組成物であって、担体、および生理的条件下でスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)に対して特異的に反応し、かつ、DHTIH(配列番号:13)、AISPRHDITKYNEMFRG(配列番号:18)、GGFYGSTIWFDF(配列番号:15)、ITTTDIDDDMN(配列番号:10)、EGNILRP(SEQ ID NO:11)およびLQSDNLPFT(配列番号:12)からなる群から選択されるペプチドのアミノ酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、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%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する少なくとも1つのCDRペプチドを含む単離された抗S1P剤を含む、組成物。

【請求項10】

少なくとも1つのCDRペプチドの配列同一性が、DHTIH(配列番号:13)、AISPRHDITKYNEMFRG(配列番号:18)、GGFYGSTIWFDF(配列番号:15)、ITTTDIDDDMN(配列番号:10)、EGNILRP(SEQ ID NO:11)およびLQSDNLPFT(配列番号:12)からなる群から選択されるペプチドのアミノ酸配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%および少なくとも

95%からなる群から選択される、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

抗S1P剤が、抗体、抗体フラグメント、抗体誘導体および抗体由来でない分子からなる群から選択される、請求項9に記載の組成物。

【請求項12】

抗S1P剤が、親和性が成熟した抗体であってもよい完全長抗体である、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

抗S1P剤が、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体からなる群から選択される、請求項11に記載の組成物。

【請求項14】

抗体が、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖から構成され、それぞれの免疫グロブリン重鎖が配列番号27のアミノ酸配列を含み、かつ、それぞれの免疫グロブリン軽鎖が配列番号29のアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項15】

抗体が、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖から構成され、それぞれの免疫グロブリン重鎖が配列番号31のアミノ酸配列を含み、かつ、それぞれの免疫グロブリン軽鎖が配列番号32のアミノ酸配列を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項16】

担体が、眼投与に適した医薬的に許容される得る担体である、請求項9に記載の組成物。

【請求項17】

リン酸緩衝生理食塩水を含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項18】

担体、および精製された抗S1P抗体またはそのフラグメントを含む抗S1P剤を含む眼投与用の組成物であって、抗体またはそのフラグメントのそれぞれの免疫グロブリン重鎖が配列番号27のアミノ酸配列を有する可変ドメインを含み、かつ、抗体またはそのフラグメントのそれぞれの免疫グロブリン軽鎖が配列番号29のアミノ酸配列を有する可変ドメインを含む、組成物。

【請求項19】

担体が、眼投与に適した医薬的に許容され得る担体である、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

リン酸緩衝生理食塩水を含む、請求項19に記載の組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0144

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0144】

a. 網膜上および／または網膜下の膜形成を特徴とする病理学的新血管新生および疾患と関連した虚血性網膜症 (ischemic retinopathy)

虚血性網膜症 (IR) は、網膜血流の低下を特徴とする多様な障害群である。IRの例としては、糖尿病性網膜症 (DR)、未熟児網膜症 (ROP)、鎌状細胞網膜症および網膜静脈閉塞性疾患が含まれる。これらの障害は全て、VEGFにより駆動される病理学的新血管新生の増殖に関連づけることができ、やがては眼球内出血、網膜上膜形成および牽引性網膜剥離に至り得る。特発性網膜上膜 (ERM) は、黄斑パッカーまたはセロファン網膜症 (cellophane retinopathy) と呼ばれ、網膜構造の変形に次いで視力低下を引き起こし得る。これらの膜は、外科的に除去しても再発することがあり、網膜虚血を伴うこともある。VEGFおよびその受容体はERMに局在している。増殖性糖尿病網膜

症、増殖性硝子体網膜症および黄斑パッカーと関連のある膜内に V E G F が存在することは、このサイトカインが、脈管形成において、虚血性網膜疾患において、また、増殖性硝子体網膜障害における膜増殖において、重要な役割を果たすことをさらに示唆する。さらに V E G F 受容体 V E G F R 1 および V E G F R 2 もまた、E R M の細胞で同定される。これらのデータは、V E G F が血管性および無血管性 E R M の進行に関与し得る自己分泌および／またはパラ分泌刺激因子であり得るということを示す。P D G F およびその受容体 [Robbins, et al. (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 35: 3649-3663] は、増殖性網膜疾患に罹患している眼球において記載されている [Cassidy, et al. (1998), Br J Ophthalmol; vol 82: 181-85 および Freyberger, et al. (2000), Exp Clin Endocrinol Diabetes, vol 108: 106-109]。これらの知見は、P D G F リガンドおよび受容体は、種々の起源の増殖性網膜の膜中に拡散していることを示唆し、P D G F による自己分泌およびパラ分泌刺激は E R M 病理に関与し得ることを示唆している。トランスフォーミング増殖因子 β (T G F - β) は、T G F 染色および免疫活性によって示されるように、E R M の形成と関与している [Pournaras, et al. (1998), Klin Monatsbl Augenheilkd, vol 212: 356-358]。さらに、T G F - β 受容体 I I は、糖尿病性膜および P V R 膜の E R M の筋繊維芽細胞で発現される。これらの結果は、網膜および E R M の複数の細胞種で産生された T G F - β は、P V R、糖尿病性の、および二次的な E R M の処置のための魅力的な標的であることを示唆する。インターロイキン - 6 (I L - 6) は、増殖性糖尿病性網膜症 (P D R) においてヒト硝子体中で増加するということが報告されており [La Heij, et al. (2002), Am J Ophthalmol, 134: 367-375]、ある研究では、研究された 100% 糖尿病性 E R M が I L - 6 タンパク質を発現した [Yamamoto, et al. (2001) Am J Ophthalmol, vol 132: 369-377]。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0146

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0146】

S 1 P の既知の多面発現作用、および V E G F、b F G F、P D G F、T G F - β および I L - 6 との相互作用を考えれば、S 1 P と結合する、S 1 P に拮抗する、S 1 P の作用または産生を阻害する薬剤は、虚血性網膜症および血管性または無血管性 E R M 形成を特徴とする後眼部疾患において病理学的網膜新血管新生を抑制する際に有効であると考えられる。少なくとも部分的に、異常な新血管新生または脈管形成を特徴とする他の眼球症状には、加齢性黄斑変性、角膜移植拒絶反応、新生血管緑内障、コンタクトレンズの過剰装着、角膜感染（単純ヘルペス、帯状疱疹および原虫感染を含む）、翼状片、感染性ブドウ膜炎、慢性網膜剥離、レーザー損傷、鎌状細胞網膜症、静脈閉塞疾患、脈絡膜新血管新生、網膜血管腫増殖 (retinal angiomatous proliferation) および特発性ポリープ状脈絡膜血管障害 (idiopathic polypoidal choroidal vasculopathy) を含む。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0340

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0340】

表 4 においていくつかのキメラ抗体可変 (V_H および V_L) ドメインのアミノ酸配列を比較している。これらの変異体を、発現ベクター中へ、生殖系列リーダー配列の後ろにクローニングした。pATH200 (最初の 19 アミノ酸) および pATH300 配列 (最初の 22 アミノ酸) 上の生殖系列リーダー配列には、表 4 において下線が引かれている。CDR は太字で示されている。表 4 における重鎖および軽鎖配列の各々の C 末端に続くアミノ酸は、イタリック体で示されている。これらは定常ドメインの最初の数アミノ酸であり、可変ドメ

インの一部ではない。pATH200 および pATH300 シリーズの番号は通常、特定の可変ドメイン変異体の配列を含むベクターを指すが、便宜のため、本明細書において、この命名法は該変異体の可変ドメイン自体を指すため、および区別するために用いられ得ることに注意すべきである。ネズミ V_H および V_L ドメインの配列を用いて、どのフレームワーク残基をヒト化抗体に組み込むべきかを確認するための分子モデルを構築した。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 4 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 4 1】

【表 4 - 1】

表 4: ヒト化抗S1P 抗体変異体のヒト化 VH (pATH200 シリーズ) および VL (pATH300 シリーズ) ドメインのアミノ酸配列。
 リーダーには下線が引かれ、CDR は太字で示される。

VH 変異体	
pATH200 配列番号: 16	<u>mgstailal</u> llavlggvcevqlvqsgaevkkpgeslkiscqsfgyifidhtihwvrqmpggglewmgcisprhdi tkyn
pATH201	m.....
pATH202	f.....m.....i.....
pATH203	i.....
pATH204	f.....
pATH205	f.....m.....i.....
pATH206	a.....f.....m.....i.....
pATH207	m.....a.....
配列続き:	
pATH200 続き	emfrgqv tisadkssstaylqwsslkasdtamycar ggfygsti wdfwggqtmvtvssastk g ps
pATH201	
pATH202	
pATH203	
pATH204	
pATH205	a.l.....
pATH206	a.l.....
pATH207	

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 3 4 2
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0 3 4 2】

【表 4 - 2】

表 4 続き	
VL 変異体	
pATH300 (配列番号: 17)	mdmrvpagllgllllwlpgarce ~~tt~~ ltqsp ~~s~~ flsasvgdrvtitc it ~~tt~~ tdi ~~ddd~~ mnwyqqepgkapklliy egn ilrpgv
pATH301	S.....
pATH302	f.....
pATH303	v.....S.....
pATH304	f.....S.....
pATH305	v.....f.....S.....
pATH306	v.....f.....S.....
pATH308	v.....f.....S.....
pATH309	S.....
配列続き	
pATH300 続き	psrfsgsgsgtdftltisklqpedfatyycl qsdnlp ftfgqg ~~tkle~~ ikrewip
pATH301	
pATH302	
pATH303	-
pATH304	
pATH305	--
pATH306	S.....--
pATH308	S..Y.....
pATH309	S..Y.....

【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0343
 【補正方法】削除
 【補正の内容】
 【手続補正8】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0350
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0350】

5. 抗体変異体のS1Pに対する比較結合

下記表5では変異株とキメラ抗体との比較分析を示している。マウスまたはヒトIgGに対して特異的な、HRPとコンジュゲートされた二次抗体によって結合抗体を検出して、これらの結果を得た。発色反応を測定し、光学密度(OD)として報告した。抗体パネルの濃度は0.1 µg/mlであった。S1Pコーティングマトリックス単独との二次抗体の相互作用は全く検出されなかった。

【手続補正9】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0351
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0351】
 【表5】

表5：キメラ抗S1P抗体の変異体におけるS1Pに対する比較結合

可変ドメイン	突然変異	プラスミド	結合
HC	キメラ	pATH50 + pATH10	1.5
	CysAla	pATH50 + pATH11	2
	CysSer	pATH50 + pATH 12	0.6
	CysArg	pATH50 + pATH14	0.4
	CysPhe	pATH50 + pATH16	2
LC	MetLeu	pATH53 + pATH10	1.6

【手続補正10】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0359
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0359】

実施例12：ヒト化抗S1Pモノクローナル抗体LT1009 (Sonepcizumab) の作製および特性解析

S1Pと特異的に結合するネズミ抗S1Pモノクローナル抗体306D (LT1002; Sphingomab (商標)) は、様々な動物モデルにおいて脈管形成および腫瘍成長を強く抑制することが証明されている。以下に記述するように、LT1002を、ネズミCDRをグラフトするヒトフレームワークの配列同一性および相同性検索といくつかのフレームワーク逆突然変異を導くコンピューター処理モデルを用いてヒト化した。2つの変異体、HuMAbHCLC₃ (LT1004) (軽鎖に3つの逆突然変異を含む) およびHuMAbHCLC₅ (LT1006) (軽鎖に5つの逆突然変異を含む) はナノモル範囲で結合親和性を示した。ヒト化変異体の生物物理学的特性および生物学的特性を向上

させる目的で、さらなる工学的処理を行った。H C D R 2 中のフリーステイン残基がアラニンで置き換えられたヒト化変異体 H u M A b H C _{C y s A l a} L C ₃ (L T 1 0 0 7) および H u M A b H C _{C y s A l a} L C ₅ (L T 1 0 0 9) はピコモル範囲で結合親和性を示した。全てのヒト化変異体が生体性黄斑変性症 (A M D) の脈絡膜新生血管新生 (C N V) モデルにおいて脈管形成を阻害し、H u M A b H C _{C y s A l a} L C ₅ (L T 1 0 0 9) は、親ネズミ抗体と比較して、優れた安定性および *in vivo* 有効性を示した。この変異体 h u M A b H C C y s A l a L C ₅ (L T 1 0 0 9) を S o n e p c i z u m a b (商標) と称した。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 6 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 6 1】

この研究では、構造アライメントプログラム (S R v 7. 6) を用いた I M G T および K a b a t データベース内のヒト抗体の相同性検索に基づいて、好適なアクセプター構造を選択した。最初のステップは、これらのヒト重鎖可変 (V H) および軽鎖可変 (V L) 配列データベース (these human heavy variable (VH) and light variable (VL) sequence databases) に L T 1 0 0 2 V H および V L タンパク質配列それぞれについて問い合わせること、バーニア残基 (Foote, J. & Winter, G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499 (1992))、カノニカル残基 (Morea, et al., Antibody modeling: implications for engineering and design, Methods 20, 267-279 (2000) および V H - V L 界面残基 (Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R., & Karplus, M. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186, 651-663 (1985)) に於いて、F R 内に高い配列同一性を有し、かつ同一カノニカルクラスおよび／または長さの C D R を有するヒトフレームワーク (F R) を同定することである。このライブラリーの各メンバーの、マウス抗体の個別アライン残基に対する同一性を、前記プログラムを用いて計算した。マウス F R と最も同一性の高い F R 配列を有するヒト配列を同定し、ヒト「アクセプター」配列の最初のショートリストを作成した。バーニア残基、カノニカル残基および V H - V L 界面 (V C I) 残基においてマウス抗体と最も同一性の高い配列も計算した。ヒトとマウスとの間でのこれらの位置における相違は、保存的置換と非保存的置換に分類され、L T 1 0 0 2 との非保存的 V C I の相違が最低値であることを最良のフレームワーク選択とした。L T 1 0 0 2 の C D R ループ L 3 および H 1 はカノニカル構造に分類することができた。これらの L 3 および H 1 構造を用いて、同一カノニカル構造を有するヒト抗体 F R を選択した。分類されない C D R については、C D R 長さがマウス抗体と同一であるヒトフレームワークを選択するよう試みた。この理論的解釈は、C D R ループ構造が、C D R ループ配列自体だけでなく、その基礎となるフレームワーク残基 (カノニカル残基) にも依存しているということである。そのため、マッチするカノニカル C D R 構造および／または C D R 長さを有するヒトフレームワークは、グラフトしたマウス C D R を、抗原結合親和性を維持するのに最も適した配向で保持する可能性が高い。C D R H 3 を除く全ての C D R では、これはヒトフレームワーク配列の選択によって行われた。加えて、可能であれば、普通でないシステインまたはプロリン残基を有するフレームワークを排除した。重鎖および軽鎖配列についてはこれらの計算を別々に実施した。最後に、最良にマッチする配列におけるフレームワーク領域全体での個別配列の相違を比較した。上記比較計算結果に最良にフィットするヒト抗体のうち、抗体 A Y 0 5 0 7 0 7 および A J 0 0 2 7 7 3 を、軽鎖および重鎖それぞれについて最も適したヒトフレームワークとして選択した。A Y 0 5 0 7 0 7 フレームワークは、van den Brink らによって記載されており (Blood, 15 April 2002, Vol. 99, No. 8, pp 2828-2834)、その配列は Genbank を介して入手可能である (受入番号 AY050707; Homo sapiens clone WR3VL immunoglob

ulin light chain variable region mRNA, partial cds; 2001年11月13日提出, 最新の改訂は2002年4月8日)。同様に、A J 0 0 2 7 7 3 抗体フレームワークは Snow らによって記載されており[Eur. J. Immunol. 28 (10), 3354-3361 (1998)]、その配列は Genbank を介して入手可能である(受入番号 AJ002772; Homo sapiens mRNA for variable region 5 of immunoglobulin G4 heavy chain patient 2,2; 1998年11月6日提出, 最新の改訂は2006年10月16日)。AY050707(軽鎖)およびAJ002773(重鎖)の配列の両者とも、ヒトおよび他の脊椎動物種の免疫グロブリン(IG)および T 細胞受容体(TR)のヌクレオチド配列の総合データベースである IMGT/LIGM においても見出される。このデータベースは、Marie-Pau le Lefranc, LIGM, Montpellier, France によって1989年に作成され、1995年7月以降、オンラインで利用可能となっている。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 6 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 6 5】

L T 1 0 0 2 V_L の K a b a t C D R 1、2 および 3 を、A Y 0 5 0 7 0 7 の アクセプターフレームワーク内へグラフトすることによりヒト化軽鎖を得た。A Y 0 5 0 7 0 7 に最も近い生殖細胞遺伝子は L 1 1 であり、このリーダー配列をヒト化軽鎖構築物に組み込んだ。p A T H 3 0 0 (L T 1 0 0 2 軽鎖)のタンパク質配列は、表 4 に示される。V_L の場合では、4つの非保存バーニア位置 4 位、3 6 位、4 9 位、6 4 位は C D R ループの構造の支持に關与するため、ネズミ残基の逆突然変異のためにそれらの位置を選択した。L T 1 0 0 2 の分子モデルの検討により、T y r 6 7 が C D R 表面に近く、抗原結合面に向かって配向しており、S 1 P と相互作用することができる示唆された。そのため、後のヒト化型に S 6 7 Y 逆突然変異も追加した。2つの突然変異を別々に導入して、Y 4 9 S または Y 3 6 F のいずれかを含む 2つの型を作製した。次の突然変異組合せを用いていくつかの型を作出した：(Y 4 9 S、F 4 V)、(Y 4 9 S、Y 3 6 F)、(Y 4 9 S、Y 3 6 F、F 4 V)、(Y 4 9 S、G 6 4 S)、(Y 4 9 S、Y 3 6 F、F 4 V、G 6 4 S)、(Y 4 9 S、Y 3 6 F、F 4 V、G 6 4 S、S 6 7 Y)、(Y 4 9 S、G 6 4 S、S 6 7 Y)。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 7 0】

e. ヒト化リード候補の最適化

ネズミ抗 S 1 P 抗体は、重鎖の C D R 2 内に遊離システイン残基 (C y s 5 0) を含み、この残基は抗体分子を多少不安定にさせる可能性があった。部位特異的突然変異誘発を用いて、システイン残基を、アラニン (h u M A b H C C y s A l a L C₃) (p A T H 2 0 7)、グリシン (h u M A b H C C y s A l a L C₃)、セリン (h u M A b H C C y s s e r L C₃) およびフェニルアラニン (h u M A b H C C y s P h e L C₃) と置換することにより p A T H 2 0 1 変異体を作出した。また、システイン変異株の重鎖を、5つの逆突然変異を含むヒト化軽鎖 (p A T H 3 0 8) (h u M A b H C C y s A l a L C₅ = L T 1 0 0 9) を用いて試験した。これらの変異体を哺乳類細胞で発現させた後、in vitro アッセイのパネルで特性解析した。重要なことには、ヒト化変異体の発現率は c h M A b S 1 P の場合よりも著しく高かった。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0373】

i i i. 安定性 ヒト化変異体を高温でのチャレンジ後の安定性について試験した。各ヒト化変異体について、上清を60～74℃の範囲の温度に供することによって熱変性転移の近似中心点(T_M)を決定した。これらの温度は、幅広い範囲の温度の間50～80℃間での温度刺激の後にネズミ抗体分子で見られた変性プロファイルに基づいて選択した。各変異体の結合特性を温度刺激の前後に決定した。ネズミ抗体は T_M 65℃を示した。変異体 huMAbHC Cys Ala LC₅ (LT1009)は、他の全ての変異体と比較して、優れた T_M を示した。表6ではリードヒト化候補とそれらの特性を示している。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0374

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0374】

表6：リードヒト化S1P mAb候補と特性

重鎖および軽鎖中の突然変異の数を示している。種類欄に重鎖および軽鎖の識別を記載する。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0375

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0375】

【表 6】

表6：リードヒト化S1P mAb候補と特性

重鎖および軽鎖中の突然変異の数を示している。種類欄に重鎖および軽鎖の識別を記載する。

mAb	種類	重鎖中の突然変異		軽鎖中の突然変異		In vitro 活性	
		CDR	フレームワーク	CDR	フレームワーク	結合親和性 (K _{DI})	特異性 (ELISA)
LT1002	ネズミ mAb Sphingomab	N/A	N/A	N/A	N/A	0.026 ± 0.000 nM	高い
LT1004	HuHCLC ₃ pATH201HC pATH309LC	0	1	0	3	1.060 ± 0.010 nM	高い
LT1006	HuHCLC ₅ pATH201HC pATH308LC	0	1	0	5	0.690 ± 0.010 nM	高い
LT1007	HuHC _{CysAla} LC ₃ pATH207HC pATH309LC	1	1	0	3	0.0414 ± 0.0004 nM	
LT1009	HuHC _{CysAla} LC ₅ pATH207HC pATH308LC	1	1	0	5	0.056 ± 0.001 nM	高い

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0376

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0376】

i v. 配列

天然に存在する抗体と同様に、LT1009は、1抗体分子に含まれる2つの軽鎖ポリペプチドそれぞれと2つの重鎖ポリペプチドそれぞれに3つの相補性決定領域（それぞれ「CDR」）を含む。これらの6つのCDRそれぞれのアミノ酸配列を直下に記載する（「VL」は免疫グロブリン軽鎖の可変領域を示し、一方「VH」は免疫グロブリン重鎖の可変領域を示す）：

CDR1 VL: ITTTDIDDDMN [配列番号10]

CDR2 VL: EGNILRP [配列番号11]

CDR3 VL: LQSDNLPFT [配列番号12]

CDR1 VH: DHTIH [配列番号13]

CDR3 VH: GGFYGSTIWFD [配列番号15]

CDR2 VH: AISPRHDITKYNEMFRG [配列番号18]

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0377

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0377】

LT1009 の重鎖および軽鎖ポリペプチドについてのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を直下に記載する：

LT1009 HC 可変ドメインのアミノ酸配列 [配列番号 19]：

【化 1】

```

1  mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
51  htihwmrqmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvtis adkssstayl
101 qwsslkasdt amyfcargggf ygstiwfdfw gqgtmvtvss

```

LT1009 LC可変ドメインのアミノ酸配列 [配列番号 20]：

【化 2】

```

1  msvptqvlgl lllwltdarc ettvtqspsf lsasvgdrvt itcitttdid
51  ddmnwfqqep gkapkllise gnilrpgvps rfsssgygtd ftltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfgq gtkleik

```

重鎖および軽鎖可変ドメインをコードする対応するヌクレオチド配列を直下に示す。リーダー配列(Lonza社のGS発現ベクターからの)には下線が引かれており；該リーダーに先行する配列は、HindIII切断部位(aagctt)および翻訳過程の開始において主要な役割を果たすKozakコンセンサス配列(gccgccacc)であり；CDRは太字で示される：

LT1009 HC可変ドメインのヌクレオチド配列 [配列番号 21]：

【化 3】

```

1  aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttctgt tctttctgtc
51  cgtgaccaca ggcgtgcatt ctgaggtgca gctggtgcag tctggagcag
101 aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga
151 tacatcttta tcgaccatac tattcactgg atgcgccaga tgcccgggca
201 aggcctggag tggatggggg ctattttctcc cagacatgat attactaaat
251 acaatgagat gttcaggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc
301 agcaccgcct acttgcaagt gagcagcctg aaggcctcgg acaccgccat
351 gtattttctgt gcgagaggggg ggttctacgg tagtactatc tggtttgact
401 tttggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttca

```

LT1009 LC可変ドメインのヌクレオチド配列 [配列番号 22]：

【化 4】

1 aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct
 51 gctgtggctg acagacgccc gctgtgaaac gacagtgacg cagtctccat
 101 ccttcctgtc tgcattctgta ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc
 151 **accactgata ttgatgatga tatgaactgg** ttccagcagg aaccagggaa
 201 agcccctaag ctctctgatct **ccgaaggcaa tattcttcgt cctgggggtcc**
 251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc
 301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactgtt **tgcagagtga**
 351 **taacttacca ttcactttcg** gccaaaggac caagctggag atcaaa

LT1009 の完全長 HC ヌクレオチド(cDNA)配列（配列番号 2 3）；CDR は太字で示され、リーダー領域に下線が引かれており、ヒンジ領域はイタリック体である。リーダーに先行する配列は、HindIII 切断部位(aagctt) および Kozak 配列(gccgccacc)である：

【化 5】

aagcttgccgccaccatggaatggagctgggtgttcttctgtccgtgaccacaggcgtg
cattctgaggtgcagctgggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtcctctgaagatc
tctgtcagagttttggatacatctttatc**gaccatactattcact**ggatgcgccagatgcccggg
 caaggcctggagtggtgggg**gctatttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttc**
aggggccaggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgcagtgaggcagcctg
 aaggcctcggacaccgccaatgtatttctgtgcgagag**ggggggttctacggtagtactatctgggtt**
gacttttggggccaagggaatgggtcacctgtcttccagcctccaccaagggcccatcggtcttc
 ccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcctgggtcaaggac
 tacttccccgaaccggtgacgggtgtcgtggaaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttc
 ccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagc
 ttgggcaaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaacaccaagggtggacaagaga
 gttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggg
 ggaccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgacccttgag
 gtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggctggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg
 gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctcc
 aacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaacca
 caggtgtacaccctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctg
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac
 tacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcacctg
 gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaac
 cactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatag

リーダー(下線付き)を有し、ヒンジ領域を有さない LT1009 HCアミノ酸配列。CDR は太字で示される。〔配列番号 2 4〕：

【化 6】

```

1  mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
51  htihwmrqmp ggglewmgai sprhditkyn emfrgqvtis adkssstayl
101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdfw gggtmvtvss astkgpsvfp
151 lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv htfpavlqss
201 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvap ellggpsvfl
251 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vkfnwyvdgv evhnaktkpr
301 eeqynstyrv vsvltvlhqd wlngkeykck vsnkalpapi ektiskakgq
351 prepqvytlp psreemtknq vsltclvkgf ypsdiavewe sngqpennyk
401 ttppvldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv fscsvmheal hnhytqksls
451 lspgk

```

LT1009 LC 完全長ヌクレオチド配列 [配列番号 2 5] ; リーダーに下線が引かれ、CDR が太字で示される; リーダーに先行する配列は、HindIII 切断部位(aagctt) および Kozak 配列(gccgccacc)である:

【化 7】

```

1  aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct
51  gctgtggctg acagacgccc gctgtgaaac gacagtgacg cagtctccat
101 ccttcctgtc tgcattctgta ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc
151 accactgata ttgatgatga tatgaactgg ttccagcagg aaccagggaa
201 agcccctaag ctccctgatct ccgaaggcaa tattcttctgt cctgggggtcc
251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc
301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactgtt tgcagagtga
351 taacttacca ttcactttcg gccaaaggac caagctggag atcaaacgta
401 cggttggtgc accatctgtc ttcattcttcc cgccatctga tgagcagttg
451 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag
501 agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact
551 cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
601 agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
651 cgcttgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct
701 tcaacagggg agagtgttag

```

下線付きのリーダーおよび太字の CDR を有する、LT1009 LCアミノ酸配列 [配列番号 2 6] :

【化 8】

```

1  msvptqvlgl lllwltdarc ettvtqspsf lsasvgdrvt itcittttdid
51  ddmnwfqqep gkapkllise gnilrpgvps rfsssgygt dftltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfgq gtleikrtv aapsvfifpp sdeqlksgta
151 svvcllnnfy breakvqwk dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
201 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksf n rgec

```

リーダー配列を有さない（かつ、先行するヌクレアーゼ切断部位および Kozak 配列を有さない）LT1009 重鎖および軽鎖の配列は、以下の通りである。CDR は太字で示される。

LT1009 HC の可変ドメインのアミノ酸配列 [配列番号 27]:

【化 9】

```

evqlvqsgaevkkpge slkiscqsfgyifidhtihwmrqmpggglewmgaisprhditkyn
emfrgqvttisadkssstaylqwsslkasdtamyfcarggfygstiwfdfwgqgtmvtvss

```

該可変ドメインをコードする、対応する LT1009 HC のヌクレオチド配列 [配列番号 28]

：

【化 10】

```

gaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccgaggagtcctctgaagatctcctgt
cagagttttggatacatctttatcgaccatactattcactggatgcgccagatgccccgggcaaggc
ctggagtggatgggggctatttctcccagacatgatattaactaaatacaatgagatgttcaggggc
caggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgcagtgagcagcctgaaggcc
tcggacaccgccatgtatttctgtgcgagagggggggttctacggtagtactatctgggttgacttt
tggggccaagggacaatgggtcaccgtctcttca

```

LT1009 LC の可変ドメインのアミノ酸配列 [配列番号 29]:

【化 11】

```

ettvtqspsf lsasvgdrvt itcittttdid ddmnwfqqepgkapkllisegnilrpgvps
rfsssgygt dftltisklqp edfatyyclq sdnlpftfgq gtleik

```

該可変ドメインをコードする、対応する LT1009 LC のヌクレオチド配列 [配列番号 30]

【化 1 2】

gaaacgacagtgacgcagtcctccatccttctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcact
 tgcataaccaccactgatattgatgatgatatgaactgggtccagcaggaaccagggaaagccct
 aagctcctgatctccgaaggcaatattcttcgctcctgggggtcccatcaagattcagcagcagtgga
 tatggcacagatttcactctcaccatcagcaaattgcagcctgaagattttgcaacttattactgt
 ttgcagagtgataacttaccattcacttttcggccaagggaaccaagctggagatcaaa

リーダーを有さない完全長の LT1009 重鎖および軽鎖のアミノ酸配列は、以下の通りである (CDR は太字で示される):

リーダーを有さず (かつ、先行するヌクレアーゼ切断部位および Kozak 配列を有さず)、かつ、ヒンジ (下線) を含む、LT1009 の完全長重鎖アミノ酸配列。 (配列番号 3 1)

【化 1 3】

evqlvqsgaevkkpgeslkiscqsfgyifidhtihwmrqmpgqglewmgaisprhditkynemfrg
 qvtisadkssstaylqwsslkasdtamyfcarggfygstiwdfdwgggtmvtvssastkgpsvfpl
 apsskstsggtaalglvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssslg
 tqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevt
 cvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk
 alpapiektiskakggprepqvytlppsreemtknqvsiltclvkgyfypsdiavewesngqpennyk
 ttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsislspgk

リーダーを有さない LT1009 の完全長軽鎖アミノ酸配列。 [配列番号 3 2]:

【化 1 4】

ettvtqspstflsasvgdrvtitciitttdidddmnwfgqgepgkapkllisegnilrpgvpsrfsssg
 ygtdftltisklqpedfatyyclqsdnlpftfgggtkleikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasv
 vc1lnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevth
 qglsspvtksfnrgec

対応するヌクレオチド配列 (リーダーまたは先行するヌクレアーゼもしくは Kozak 部位を有さない) は、以下の通りである。遺伝コードの縮重のため、代替のヌクレオチド配列もまた、事実上あらゆる所与のアミノ酸配列をコードし得ることが理解される。

LT1009 の完全長重鎖ヌクレオチド (cDNA) 配列 [配列番号 3 3]:

【化 1 5】

gaggtgcagctggtgcagttctggagcagaggtgaaaaagcccgaggagtctctgaagatctcctgt
cagagttttggatacatctttatc**gaccatactattcact**ggatgcgccagatgcccgggcaagggc
ctggagtggatgggg**gctat**ttctcc**cagacatgatattactaaatacaatgagatgttcaggggc**
caggtcaccatctcagccgacaagtcagcagcaccgcctacttgagtgagcagcctgaaggcc
tcggacaccgccatgtatcttctgtgcgagag**gggggggttcta**cggtag**tactatctgggttgacttt**
tggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcctccaccaagggcccatcggctcttccccctg
gcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcctggtcaaggactacttc
cccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggct
gtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgag
cccaaactcttg**tgacaaaactcacacatgcccaccgtgccc**agcacctgaactcctggggggaccg
tcagtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcaca
tgcggtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg
gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaa
gccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg
tacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaa
ggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaag
accacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcacctggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactac
acgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatag

LT1009 の完全長軽鎖ヌクレオチド配列 [配列番号 3 4]:

【化 1 6】

gaaacgacagtgacgcagtcctccatccttctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcact
 tgcataaaccaccactgatattgatgatgatatgaactgggtccagcaggaaccagggaaagccctt
 aagctcctgatctccgaaggcaatattcttcgctcctgggggtcccatcaagattcagcagcagtgga
 tatggcacagatttcactctcaccatcagcaaattgcagcctgaagattttgcaacttattactgt
ttgcagagtgataacttaccattcactttcggccaagggaccaagctggagatcaaacgtacggtg
 gctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
 gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgcctc
 caatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagc
 agcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccat
 cagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggttag

LT1009 の重鎖上の C 末端リジンは、成熟した重鎖タンパク質上に常に存在するわけではない。

LT1009 重鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、タンパク質の最後の(最も C 末端側の)アミノ酸残基としてリジンを示しているが、例えば CHO 細胞クローン LH1 275 において発現する場合、LT1009 は C 末端リジンを含まない。この事はペプチドマッピングによって示され、理論に束縛されることなく、哺乳類の系におけるタンパク質の翻訳後修飾の結果として生じると考えられる。また、理論に束縛されることなく、他の発現系、特に非哺乳類の系においては、成熟した LT1009 重鎖上に C 末端リジンが存在すると考えられる。

CHO 細胞において発現する LT1009 重鎖のアミノ酸配列（即ち、リーダーを有さず、かつ、C 末端リジンを有さない）を以下に示す（CDR は太字で示され、ヒンジはイタリック体で示される）[配列番号 3 5]:

【化 1 7】

evqlvqsgaevkkpgeslkiscqsfgyifid**htihw**mrqmpgqglewm**ga**isprh**ditkynemfrg**
 qvtisadkssstaylqwsslkasdtamyfcar**ggfygsti**w**fd**fwgqgtmvtvssastkgpsvfpl
 apsskstsggtaalgcclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslg
 tqtyicnvnhkpsntkvdkrvepk**scdktht**cp**pc**papellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevt
 cvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnk
 alpapiektiskakgqprepqvtytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyk
 ttpvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslspsg

このアミノ酸配列をコードすることができるヌクレオチド配列の例を、以下に配列番号

36として示す。遺伝コードの縮重により、複数のヌクレオチド配列が同じアミノ酸配列をコードし得ることが理解され、そのため、アミノ酸配列をコードするものとして本明細書に示されるこれらのおよび他のヌクレオチド配列は、例示を目的とするものであると認められる。CDR は太字で示され、ヒンジ領域はイタリック体で示される：

【化18】

gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtcctctgaagatctcctgt
cagagttttggatacatctttatcgaccatactattcactggatgcgccagatgcccgggcaaggc
ctggagtggaatgggggctatcttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatggttcaggggc
caggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgagtgagcagcctgaaggcc
tcggacaccgcatgtatcttctgtgcgagagggggggttctacggtagtactatctgggttgacttt
tggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctg
gcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttc
ccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccggt
gtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttggt
gagaggccagcacagggaggagggtgtctgtctggaagccaggctcagcgtcctgcctggacgca
tccccggtatgcagtcaccagtcagggcagcaaggcaggccccgtctgcctcttcacccggaggcc
tctgcccgccccactcatgtctcaggagaggggtcttctggcttttccccaggctctgggcaggca
caggctaggtgccccctaaccaggccctgcacacaaaggggcagggtgctgggctcagacctgcaa
gagccatatccgggaggaccctgccccctgacctaaagcccaccccaaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacaccttctctcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaa
atcttgtgacaaaactcacacatgcccacctgcccaggtaagccagcccaggcctcgccctccag
ctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcacccaggacaggccccagccgggtgctgaca
cgtccacctccatctcttctcctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttcccc
caaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga
gccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga
caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctgcacc
aggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcg
agaaaaccatctccaaagccaaagggtgggaccgtgggggtgcgagggccacatggacagaggccgg
ctcgccccaccctctgccctgagagtgaccgtgtaccaacctctgtccttacagggcagccccga
gaaccacaggtgtacacctgcccccatccggggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
tgcctggtcaaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggag
aacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctccttcttctcctctatagcaagctc
accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg
cacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggttag

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0380

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0380】

ヒト化可変ドメイン（重鎖および軽鎖の両方）をLonza社のGS遺伝子発現系にクローニングして、プラスミド pATH1009を作製した。該Lonza社のGS発現系は、抗

体遺伝子の定常ドメインを有する発現ベクターと、選択マーカーであるグルタミンシンセターゼ（GS）とからなる。GSは、グルタミン酸とアンモニアからのグルタミン生合成に関与する酵素である。抗体遺伝子と選択マーカーの両方を有するベクターを、細胞が外因性グルタミンなしに生存するのに十分なグルタミンを供給した無血清培地中での増殖に適したプロプライエタリーチャイニーズハムスター卵巣宿主細胞系統（CHO K1 SV）にトランスフェクトする。加えて、ベクターによって提供されるGS活性を有する細胞系統だけが生存し得るように内因性GSの活性を阻害するために、この培地に特異的GS阻害剤であるメチオニンスルホキシミン（MSX）を添加する。その結果得られる、pATH1009を用いてトランスフェクトされたCHO細胞系統をLH1と命名する。

上記の実施例に記載される天然の生殖系列遺伝子のリーダー配列が、プラスミドpATH1009を作成するために用いられるGS発現ベクター骨格中のリーダー配列によって置換されることに注意すべきである。後者のリーダー配列は、LT1009重鎖（配列番号19および24）のN末端における“mewswv”で始まる19個のアミノ酸として見出すことができ、LCのリーダーは、“msvpt”で始まる20個のアミノ酸（配列番号20および26のN末端に示される）である。

トランスフェクトされたCHO LH1細胞を、MSXの存在下でグルタミンフリー培地中で増殖するそれらの能力について選択し、分離株（クローン）を活性LT1009の高レベル分泌について選択した。LH1 275とは、LT1009抗体生産物の全てのロットの生産のためのマスター細胞バンク(Master Cell Bank)(MCB)の作成のために選択された、pATH1009ベクターを含むLH1 CHO細胞系統のリードクローンに与えられた名称である。こうして、毒性学および臨床開発に毒性学研究および臨床開発のための材料がもたらされた。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0381

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0381】

ATCC寄託：pATH1009プラスミドを含む大腸菌StB12は、American Type Culture Collectionに寄託した（寄託番号PTA-8421）。pATH1009ベクターを含むCHO細胞系統 LH1 275もAmerican Type Culture Collectionに寄託した（寄託番号PTA-8422）。ATCCは、10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209に所在する。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0412

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0412】

カスパーゼ3活性化は、S1Pの存在下で抗S1P mAbを加えることによって増加し、この抗体によるS1Pの選択的吸収によってS1Pの保護的抗アポトーシス作用が除かれることが示唆された。ヒト化抗体変異体、huMAbHCLC₃（LT1004）およびhuMAbHCLC₅（LT1006）の両方が、LT1002と比較して優れた活性を示した。同時に、全ての変異体を、癌細胞からのS1P誘発性サイトカイン放出に対するそれらの作用について試験した。S1Pは、癌細胞からの細胞馴化培地への著しいIL-8放出を引き起こすことが分かっている。マウス対照抗S1P mAbを加えることによって卵巣癌細胞からのIL-8放出が濃度依存的に減少した。2つのヒト化変異体 huMAbHC_{CysAla}LC₃（LT1007）およびhuMAbHC_{CysAla}LC₅（LT1009）は、HuMAbHCLC₃（LT1004）およびhuMAb

H C L C₅ (L T 1 0 0 6) よりも大きな I L - 8 放出の減少を示した。

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 3 2】

虚血性および炎症性網膜症モデルでは、これまでに、抗 S 1 P 抗体での処置後にマクロファージ浸潤の 5 5 % 阻害が示されている。これらのデータは十分に確立されたネズミ酸素誘発性網膜症モデル（未熟児網膜症（R O P）モデルとしても知られている）を用いて得られた。具体的には、C 5 7 B L / 6 マウスを生後 7 日に 7 5 % 酸素中に置き、生後 1 2 日に大気に戻し、片側の眼に 3 μ g のヒト化抗 S 1 P 抗体（L T 1 0 0 9、S o n e p c i z u m a b（商標））の、他側の眼にビヒクルの眼内圧注射を行った。これらのマウスに生後 1 7 日目に F 4 / 8 0（汎マクロファージマーカー）に対する F I T C 標識抗体の眼内圧注射を行い、8 時間後に、マウスを安楽死させた。眼球を摘出し、P B S 緩衝ホルマリン中に室温で 5 時間固定した。網膜を切開し、0 . 2 5 % T r i t o n X - 1 0 0 含有リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、全てを装着した。Nikon 社製蛍光顕微鏡を用いてスライドを観察し、網膜マクロファージを定量した。これらの結果を下記の表 7 に示す。

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 3 3】

【表 7】

表 7：S 1 P に対するヒト化モノクローナル抗体での処置による
網膜におけるマクロファージ浸潤の減少

1 網膜あたりのマクロファージ数		マクロファージ密度の減少率%	
生理食塩水対照	S 1 P 抗体	生理食塩水対照	S 1 P 抗体
2513 $\pm$ 115	1136 $\pm$ 33	100 $\pm$ 0.5	55.4 $\pm$ 1.3
P<0.001		P<0.0001	

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 3 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 3 8】

【表 8】

表 8： 研究の結果の数値概要－C o l o 2 0 5

処置	最終腫瘍重量 (m g)	ビヒクル処置マウスに対する減少率%
ビヒクル	3047.25	－
50 mg/kg LT1009	2071.17	32%
25/75 mg/kg LT1009	2465.60	20%
アバスチン	1967.90	35%
アバスチン + 50 mg/kg LT1009	1614.40	48%
パクリタキセル	0	100%

【手続補正 2 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 4 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 4 3】

【表 9】

表 9： 最終腫瘍重量－H T 2 9

処置	最終腫瘍重量 (m g)	有意性 (P-値)	ビヒクル処置マウスに対する減少率%
ビヒクル	2723.67	－	－
LT1009	2390.63	1.00	13%
アバスチン	1927.44	0.39	30%
LT1009 + アバスチン	1624.90	0.001	41%
5-FU	1963.71	0.099	28%
LT1009 + 5-FU	1948.00	0.049	29%

【手続補正 2 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 4 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 4 8】

【表 1 0】

表 1 0 : 研究の結果の数値概要－D U 1 4 5

処置	最終腫瘍重量 (m g)	有意性 (P-値)	ビヒクル処置マウスに 対する減少率%
ビヒクル	2703	－	－
LT1009	2242	0.00	28%
アバスチン	578	0.00	79%
LT1009 + アバスチン	676	0.00	75%
パクリタキセル	539	0.00	80%
LT1009 + パクリタキセル	373	0.00	84%

【手続補正 2 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 5 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 5 3】

【表 1 1】

表 1 1 : 最終腫瘍体積－R P M I

処置	最終腫瘍重量 (m g)	ビヒクル処置マウスに 対する減少率%
ビヒクル	2083	0
ボルテゾミブ	1664	20%
25 mg/kg LT1009	1860	11%
50 mg/kg LT1009	1978	5%
50 mg/kg LT1009 + ボルテゾミブ	1832	12%

【手続補正 2 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2010508297000001.app