

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4986633号
(P4986633)

(45) 発行日 平成24年7月25日 (2012. 7. 25)

(24) 登録日 平成24年5月11日 (2012. 5. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/28 (2006. 01)

C O 7 K 16/28

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

C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 23 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-552966 (P2006-552966)

(73) 特許権者 000001029

(86) (22) 出願日 平成18年1月12日 (2006. 1. 12)

協和発酵キリン株式会社

(86) 国際出願番号 PCT/JP2006/300307

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(87) 国際公開番号 W02006/075668

(74) 代理人 100105647

(87) 国際公開日 平成18年7月20日 (2006. 7. 20)

弁理士 小栗 昌平

審査請求日 平成20年9月18日 (2008. 9. 18)

(74) 代理人 100105474

(31) 優先権主張番号 特願2005-5794 (P2005-5794)

弁理士 本多 弘徳

(32) 優先日 平成17年1月12日 (2005. 1. 12)

(74) 代理人 100108589

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

弁理士 市川 利光

(74) 代理人 100129160

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-7758

弁理士 古館 久丹子

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-7759

(72) 発明者 高橋 信明

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-8024

群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化されたヒト IgG2 および IgG3 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトIgG2重鎖の定常領域において、KabatらによるEUインデックスにより示される300番目のFからYへの置換、309番目のVからLへの置換および339番目のTからAへの置換から選ばれる少なくとも1つの置換を有するIgG重鎖。

【請求項 2】

重鎖定常領域にKabatらによるEUインデックスにより示される331番目のPのSへの置換を含む、請求項 1 に記載のIgG重鎖。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のIgG重鎖を含む、モノクローナル抗体。

10

【請求項 4】

ハイブリドーマKM341-1-19 (受託番号FERM BP-7759) が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のIgG重鎖。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のIgG重鎖およびハイブリドーマKM341-1-19 (受託番号FERM BP-7759) が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【請求項 6】

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の21番目から148番目のアミノ酸配列を含むIgG重鎖の可変領域を有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のIgG重鎖。

20

【請求項 7】

請求項 6 に記載の IgG 重鎖および配列番号 4 で示される アミノ酸配列の 21 番目から 124 番目のアミノ酸配列を含む IgG 軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【請求項 8】

配列番号 3 1 で示されるポリペプチドの 21 番目から 474 番目のアミノ酸配列 からなる請求項 2 に記載の IgG 重鎖。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の IgG 重鎖および配列番号 3 3 で示されるポリペプチドの 21 番目から 231 番目のアミノ酸配列 からなる 軽鎖を含む モノクローナル抗体。

10

【請求項 10】

配列番号 3 0 で示されるポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 1 0 に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 1 1 に記載の発現ベクターを含む宿主。

【請求項 13】

請求項 1 2 に記載の宿主から産生される請求項 4 に記載の IgG 重鎖。

【請求項 14】

請求項 1 3 に記載の IgG 重鎖及び配列番号 3 2 で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生されるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

20

【請求項 15】

ヒト IgG2 重鎖の定常領域における Kabat らによる EU インデックスにより示される 300 番目の F から Y への置換、309 番目の V から L への置換および 339 番目の T から A への置換から選ばれた 少なくとも 1 つの置換を行なう工程を含む、IgG 重鎖の製造方法。

【請求項 16】

請求項 1 5 に記載の製造方法を含むモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 17】

配列番号 3 0 で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主から IgG 重鎖を取得する工程を含む、IgG 重鎖の製造方法。

30

【請求項 18】

配列番号 3 0 で示されるポリヌクレオチドおよび配列番号 3 2 で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 19】

配列番号 3 4 で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主から IgG 重鎖を取得する工程を含む、IgG 重鎖の製造方法。

40

【請求項 20】

配列番号 3 4 で示されるポリヌクレオチドおよび配列番号 3 6 で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 21】

請求項 3 に記載のモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 22】

ヒト IgG2 重鎖の定常領域における Kabat らによる EU インデックスにより示される 300 番目

50

のFからYへの置換、309番目のVからLへの置換および339番目のTからAへの置換から選ばれる少なくとも1つの置換を行なうことを特徴とする、モノクローナル抗体の凝集抑制方法

。

【請求項 2 3】

請求項 5、7、9 および 1 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含む組成物

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ヒトIgG2およびIgG3重鎖の定常領域に変異を導入することにより得られた、
安定性が改善されたIgG2およびIgG3抗体に関するものである。 10

【背景技術】

【0 0 0 2】

免疫グロブリンは、すべての哺乳動物の血清や組織体液中に存在する糖蛋白質で、外来抗原を認識する働きをもっている。抗体の抗原への結合により、補体系の活性化や、細胞表面に存在するFc レセプター (FcR) を介し、細胞の食作用、抗体依存性細胞障害作用、メディエーターの遊離、抗原提示作用の亢進など、エフェクター機能の活性化を介して、生体防御にかかわっている。

【0 0 0 3】

ヒトの免疫グロブリンには、IgG、IgA、IgM、IgDおよびIgEからなる5つの異なったク
ラスが存在する。IgGはさらにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4からなる4つのサブクラス、
またIgAはさらにIgA1およびIgA2からなる2つのサブクラスに分類することができる。免
疫グロブリンの基本構造は、2本の相同な軽鎖 (L鎖) と、2本の相同な重鎖 (H鎖) から
成り立っている。免疫グロブリンのクラスとサブクラスはH鎖によって決定される。 20

【0 0 0 4】

それぞれの免疫グロブリンは異なった機能をもつことが解っている。たとえば、補体結
合能は、IgM>IgG3>IgG1>IgG2の順で高く、FcレセプターIへの親和性は、IgG3>IgG1>IgG4>
IgG2の順で高い。またプロテインAに対して、IgG1、IgG2およびIgG4が結合することが可
能である。

【0 0 0 5】

ヒト抗体は、血液から採取精製されたものが医薬品として使用されているが、近年数多
くのモノクローナル抗体に関して臨床試験が実施されており、上市されているものも数多
くある。しかし、医薬品用途で上市または臨床開発されているモノクローナル抗体の多く
はIgG1サブクラスのものでIgG2、IgG3サブクラスのはほとんどない。IgG2は補体の
活性化において、副経路を活性化できる唯一のIgGであり、インフルエンザなどの感染症
との関連が報告されている。IgG2はまた、抗体依存性細胞障害作用がほとんどないことが
知られている。一方、IgG3は、抗体依存性補体活性化能、抗体依存性細胞障害作用が非常
に強いことが知られている。このような特徴を生かすことにより、新しい活性をもつ抗体
医薬品の開発が期待できる。 30

【0 0 0 6】

しかし、IgG2、IgG3に関しては、ほとんど医薬品として開発された経験がないために、
その製造技術に関して、不確定な部分が多い。 40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 7】

本件発明は、ヒトIgG2およびIgG3抗体の、安定性の高い変異体を作製することを目的と
する。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 8】

本発明者らは、IgG2およびIgG3抗体が低pHにおいて不安定性であること、具体的には低 50

pHにおいて凝集体を作りやすいことを見出した。

【0009】

一般的に、抗体を医薬品として製造する際に、プロテインAを用いて、アフィニティー精製する方法が用いられる。このとき、プロテインAに結合した抗体を溶出するために、低pHの緩衝液を用いる場合が多い。また、ウイルス除去のためにも、一定時間、低pHで処理することが望ましい。この際に生成する凝集体が医薬品に混入することによって、インフュージョンリアクション、補体の活性化あるいは抗体依存性細胞障害作用が亢進することが報告されており、それらが副作用につながるものが容易に推定される。このため、凝集体の量をできるだけ低くすることは、非常に重要となる。

【0010】

そこで、IgG2およびIgG3抗体の重鎖定常領域の一部のアミノ酸構造をかえることにより、低pHにおける凝集体生成を抑制できることを見出した。

【0011】

本件発明における、ヒトIgG2およびIgG3抗体の改変についての基本的な考えかたを下記に詳述する。本発明の安定化されたヒトIgG2抗体は、その重鎖定常領域において、少なくともKabatらによるEUインデックス (Kabat et. al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition) により示される300番目のFがYに置換 (アルファベットはアミノ酸の一文字表記。数字はKabatらによるEUインデックス、以下同様。)、309番目のVがLに置換または339番目のTがAに置換されている。好ましくは、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される300番目のFがYに、および309番目のVがLに置換されている。また好ましくは、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される300番目のFがYに、および339番目のTがAに置換されている。また好ましくは、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される309番目のVがLに、および339番目のTがAに置換されている。更に好ましくは、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される300番目のFがYに、309番目のVがLに、および339番目のTがAに置換されている。

【0012】

また、本発明の安定化されたヒトIgG2抗体は、その重鎖定常領域において、少なくともCH2ドメインがIgG1重鎖のCH2ドメインに置換されている。例えばCH2ドメインがIgG1重鎖のCH2ドメインに、あるいはCH2およびCH3ドメインがIgG1重鎖のCH2およびCH3ドメインに置換されている。

【0013】

さらに、D270、K322、P329、P331をAに置換するか、あるいは、P331をSやGに変換することによって (アルファベットはアミノ酸の一文字表記。数字はKabatらによるEUインデックス (Kabat et. al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition) を示す)、安定性を改善し、かつCDC活性を低減させることができる。

【0014】

また、さらにL235をE、G237をAに置換することにより、安定性を改善し、かつADCC活性を低減させることができる。また、上記とは逆に、CDC活性および/またはADCC活性を増強させるための変異も適宜導入できる。

【0015】

本発明の安定化されたヒトIgG3抗体は、その重鎖定常領域において、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される392番目のNがKに置換または397番目のMがVに置換されている。好ましくは、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される392番目のNがKに、および397番目のMがVに置換されている。

【0016】

また、好ましくは、上述の392番目および/または397番目の置換に対して、更にKabatらによるEUインデックスにより示される300番目のFがYに置換されている。

【0017】

また、好ましくは、上述の392番目、397番目および300番目の置換に関して、更にKabatらによるEUインデックスにより示される435番目のRがHに置換されている。例えば、上記

10

20

30

40

50

の392および435番目が置換されているか、397および435番目が置換されているか、392、397および435番目が置換されているか、392、300および435番目が置換されているか、397、300および435番目が置換されているか、あるいは392、397、300および435番目が置換されている。435番目のRのHへの置換は、ヒトIgG3抗体のProteinAによる精製を可能とすることを目的としている (Ito S et. al., Exp Clin Immunogenet. 1990, 7(2):91-100.)。

【0018】

また、本発明の安定化されたヒトIgG3抗体は、その重鎖定常領域において、少なくともCH3ドメインがIgG1重鎖のCH3ドメインに置換されている。例えばCH3ドメインがIgG1重鎖のCH3ドメインに、あるいはCH2およびCH3ドメインがIgG1重鎖のCH2およびCH3ドメインに置換されている。

10

【0019】

さらに、上述の置換に対して、CDC活性および／またはADCC活性を低減または増強させるための変異をIgG3重鎖の定常領域に導入することができる。

【0020】

また、本発明は、上述置換を含む抗体の製造方法、あるいは上記置換を含む抗体の凝集抑制方法、あるいは上述の抗体を含有する組成物である。

【0021】

すなわち、本発明は以下の通りである。

【0022】

20

[1] ヒトIgG2重鎖の定常領域において、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される300番目のFがYに置換されているIgG重鎖。

【0023】

[2] ヒトIgG2重鎖の定常領域において、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される309番目のVがLに置換されているIgG重鎖。

【0024】

[3] ヒトIgG2重鎖の定常領域において、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される339番目のTがAに置換されているIgG重鎖。

【0025】

[4] 重鎖定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される331番目のPのSへの置換を含む、[1]～[3]のいずれかのIgG重鎖。

30

【0026】

[5] [1]～[4]のいずれかのIgG重鎖を含む、モノクローナル抗体。

【0027】

[6] ハイブリドーマKM341-1-19 (受託番号FERM BP-7759) が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する[1]～[4]のいずれかのIgG重鎖。

【0028】

[7] [6]のIgG重鎖およびハイブリドーマKM341-1-19 (受託番号FERM BP-7759) が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【0029】

40

[8] 配列番号2で示されるIgG重鎖の可変領域を有する[1]～[4]のいずれかのIgG重鎖。

【0030】

[9] [8]のIgG重鎖および配列番号4で示されるIgG軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【0031】

[10] 配列番号31で示されるポリペプチドからシグナル配列が除かれた部分からなる[4]のIgG重鎖。

【0032】

[11] [10]のIgG重鎖および配列番号33で示されるポリペプチドからシグナル配列

50

が除かれた部分からなるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【0033】

[12] 配列番号30で示されるポリヌクレオチド。

【0034】

[13] [12]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

【0035】

[14] [13]の発現ベクターを含む宿主。

【0036】

[15] [14]の宿主から産生される[4]のIgG重鎖。

【0037】

[16] [15]のIgG重鎖及び配列番号32で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生されるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【0038】

[17] ヒトIgG2重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される300番目のFをYに置換する工程を含む、IgG重鎖の製造方法。

【0039】

[18] ヒトIgG2重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される309番目のVをLに置換する工程を含む、IgG重鎖の製造方法。

【0040】

[19] ヒトIgG2重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される339番目のTをAに置換する工程を含む、IgG重鎖の製造方法。

【0041】

[20] [17]～[19]のいずれかのモノクローナル抗体の製造方法を含む製造方法。

【0042】

[21] 配列番号30で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体の重鎖を取得する工程を含む、IgG重鎖の製造方法。

【0043】

[22] 配列番号30で示されるポリヌクレオチドおよび配列番号32で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

【0044】

[23] 配列番号34で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からIgG重鎖を取得する工程を含む、IgG重鎖の製造方法。

【0045】

[24] 配列番号34で示されるポリヌクレオチドおよび配列番号36で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

【0046】

[25] [5]のモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

【0047】

[26] ヒトIgG2重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される300番目のFをYに置換することを特徴とする、モノクローナル抗体の凝集抑制方法。

【0048】

[27] ヒトIgG2重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される309番目のVをLに置換することを特徴とする、モノクローナル抗体の凝集抑制方法。

【0049】

[28] ヒトIgG2重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される39番目のTをAに置換することを特徴とする、モノクローナル抗体の凝集抑制方法。

【0050】

[29] [7]、[9]、[11]および[16]のいずれかのモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【0051】

[30] 腫瘍、病原体または自己免疫疾患の予防または治療に用いられる[29]の医薬組成物。

【0052】

[31] [7]、[9]、[11]および[16]のいずれかのモノクローナル抗体を含む組成物。

【0053】

[32] ヒトIgG3重鎖の定常領域において、少なくともKabatらによるEUインデックスにより示される397番目のMがVに置換されているIgG重鎖。

【0054】

[33] [32]のIgG重鎖を含む、モノクローナル抗体。

【0055】

[34] ヒトIgG3重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される392番目のNをKに置換する工程を含む、IgG重鎖の製造方法。

【0056】

[35] ヒトIgG3重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される397番目のMをVに置換する工程を含む、IgG重鎖の製造方法。

【0057】

[36] [34]または[35]のモノクローナル抗体の製造方法を含む製造方法。

【0058】

[37] [33]のモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

【0059】

[38] ヒトIgG3重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される392番目のNをKに置換することを特徴とする、モノクローナル抗体の凝集抑制方法。

【0060】

[39] ヒトIgG3重鎖の定常領域におけるKabatらによるEUインデックスにより示される397番目のMをVに置換することを特徴とする、モノクローナル抗体の凝集抑制方法。

【0061】

[40] [33]、[36]および[37]のいずれかのモノクローナル抗体を含む組成物。

【0062】

さらに、本発明は以下の態様を含む。

【0063】

[41] ハイブリドーマ2105（受託番号BP-8024）が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する[1]～[4]のいずれかのIgG重鎖。

【0064】

[42] [41]のIgG重鎖およびハイブリドーマ2105（受託番号BP-8024）が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【0065】

[43] 配列番号6で示されるIgG重鎖の可変領域を有する[1]～[4]のいずれかのIgG重鎖。

【0066】

[44] [43]のIgG重鎖および配列番号8で示されるIgG軽鎖の可変領域を有する軽鎖、

10

20

30

40

50

からなるモノクローナル抗体。

【0067】

[45] 配列番号35で示されるポリペプチドからシグナル配列が除かれた部分からなる[4]のIgG重鎖。

【0068】

[46] [45]のIgG重鎖および配列番号37で示されるポリペプチドからシグナル配列が除かれた部分からなるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【0069】

[47] 配列番号34で示されるポリヌクレオチド。

【0070】

[48] [47]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

【0071】

[49] [48]の発現ベクターを含む宿主。

【0072】

[50] [49]に記載の宿主から産生される[4]のIgG重鎖。

【0073】

[51] [50]のIgG重鎖及び配列番号36で示されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生されるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

【0074】

[52] [42]、[44]、[46]および[51]のいずれかのモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬組成物。

【0075】

[53] 腫瘍、病原体または自己免疫疾患の予防または治療に用いられる[52]の医薬組成物。

【0076】

[54] [42]、[44]、[46]および[51]のいずれかのモノクローナル抗体を含む組成物。

【発明の効果】

【0077】

IgG2重鎖のアミノ酸配列において、300番目のFをYへ、309番目のVをLへ、または339番目のTをAへ置き換えることによって安定性を改善した本発明の抗体は、抗原に対する結合性を保持しつつ、凝集体形成、特に低pHにおける凝集体形成が低減されているという特徴を備えている。従って、本発明の抗体は医薬品として安定的に製造することができる。さらに、被験体に投与した場合、抗体の凝集体の混入によって引き起こされる副作用を回避することが容易になり、安全に用いることができる。

【0078】

IgG3重鎖のアミノ酸配列において、392番目のNをKへ、397番目のMをVへ、または300番目のFをYへ置き換えることによって安定性を改善した本発明の抗体は、抗原に対する結合性を保持しつつ、凝集体形成、特に低pHにおける凝集体形成が低減されているという特徴を備えている。従って、本発明の抗体は医薬品として安定的に製造することができる。さらに、被験体に投与した場合、抗体の凝集体の混入によって引き起こされる副作用を回避することが容易になり、安全に用いることができる。

【0079】

さらに、上記の安定性の改善に加えて331番目のプロリンのセリンへの置換等によって、ADCCおよび/またはCDCが低減された抗体を得ることができ、被検体に投与した場合、ADCCおよび/またはCDCにより引き起こされる副作用を回避することができ、さらに医薬品として安全に用いることができる。

【0080】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2005-005794号の明細書および／

10

20

30

40

50

または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1A】抗CD40抗体KM341-1-19の変異体のRamos細胞に対する結合活性（Ramos細胞結合活性）を示す図である。

【図1B】抗CD40抗体KM341-1-19の変異体のRamos細胞に対する結合活性（Ramos細胞結合活性）を示す図である。

【図1C】抗CD40抗体KM341-1-19および2105の変異体のRamos細胞に対する結合活性（Ramos細胞結合活性）を示す図である。

【図2A】Ramos細胞における抗CD40抗体KM341-1-19の変異体によるCD95発現促進（Ramos細胞におけるCD95発現誘導活性）を示す図である。 10

【図2B】Ramos細胞における抗CD40抗体KM341-1-19の変異体によるCD95発現促進（Ramos細胞におけるCD95発現誘導活性）を示す図である。

【図2C】Ramos細胞における抗CD40抗体KM341-1-19および2105の変異体によるCD95発現促進（Ramos細胞におけるCD95発現誘導活性）を示す図である。

【図3】抗CD40抗体4D11の変異体のRamos細胞に対する結合活性（Ramos細胞結合活性）を示す図である。

【図4】Ramos細胞における抗CD40抗体4D11の変異体によるCD95発現抑制（アンタゴニスト活性評価）を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】 20

【0082】

1. IgG2抗体およびIgG3抗体の安定性の改善および物性の改善

IgG重鎖は、抗原への結合特異性を決定する可変領域および抗体のエフェクター機能発現に参与する定常領域の2つの領域からなる。可変領域は、それを構成する遺伝子の組換えと体細胞変異の導入により、抗原結合部位の配列が構造上異なる。このことが、非常に多くの外来抗原を認識することができるという特徴をもたらす。

【0083】

また、抗体は本来外来の微生物、ウイルスや癌に対する生体防御機能をつかさどる分子であるため、抗体が結合した細胞を殺傷して取り除く作用を兼ね備えており、これをエフェクター機能と呼ぶ。この殺傷機能は2種類あり、抗体依存性細胞性細胞傷害活性（Anti body-Dependent Cellular Cytotoxicity。以下、ADCCと略記）、及び補体依存性細胞傷害活性（Complement-Dependent Cytotoxicity。以下、CDCと略記）といわれている。ADCCは、Macrophage、NK細胞、好中球などがその表面に発現しているFcRを介して、抗体の定常領域と結合し、細胞が活性化することにより誘導される細胞障害活性のことをいう。一方、CDCは抗体が抗原と結合することによって、活性化された補体系によって引き起こされる細胞障害活性のことを言う。これらの活性は、抗体のサブクラスによって、その活性の強弱が異なることが解っている（Charles A. Janeway et. al. Immunobiology, 1997, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.）。 30

【0084】

本発明によれば、抗原への特異的結合性を保持しつつ、IgG2およびIgG3抗体の安定性を改善することができる。具体的には、IgG2重鎖のアミノ酸配列において、300番目のFをYへ、309番目のVをLへ、または339番目のTをAへ置き換えることによって抗体の安定性を改善することができる。これらの置換を単独で有していてもよいし、組合せて有していてもよい。また、IgG2重鎖のCH2ドメインをIgG1重鎖のCH2ドメインに、あるいはIgG2重鎖のCH2およびCH3ドメインをIgG1重鎖のCH2およびCH3ドメインに置換することによって抗体の安定性を改善することができる。また、本発明によればIgG3重鎖のアミノ酸配列において、392番目のNをKへ、397番目のMをVへ、または300番目のFをYへ、置き換えることによって抗体の安定性を改善することができる。これらの置換を単独で有していてもよいし、組合せて有していてもよい。また、IgG3重鎖のCH3ドメインをIgG1重鎖のCH3ドメインに、あるいはIgG3重鎖のCH2およびCH3ドメインをIgG1重鎖のCH2およびCH3ドメインに置換するこ 40 50

とによって抗体の安定性を改善することができる。

【0085】

本発明において、あるサブクラスのドメインを他のサブクラスのドメインに置換した変異抗体をドメインスワップ変異抗体とすることがある。

【0086】

本発明において、安定性を改善した抗体とは、酸性条件下すなわち低pH条件下、例えばpH4以下においても抗原への結合能が低下することなく、かつ凝集体を形成しにくい抗体をいう。または、ProteinAまたはProteinG親和カラムを用いて精製した場合、凝集体の含有量が低い抗体をいう。例えばpH3.5で10分間または60分間処理した場合に形成される凝集体の含有率が10%以下、好ましくは5%以下、さらに好ましくは1%以下である抗体をいう。凝集体の含有率は、例えば液体クロマトグラフィーにより測定することができる。

10

【0087】

また、本発明において物性を改善した抗体とは、安定性に加えて、ADCCおよび/またはCDCを所望の強さに調節した抗体、FcRへの結合能を所望の程度に調節した抗体をいい、ADCCおよび/またはCDCの調節、FcRへの結合能の調節は、抗体に変異を導入することにより行うことができる。

【0088】

安定性を改善した抗体に、更に適当な変異を導入することによって、ADCCおよび/またはCDCを低減または増強させることができる

たとえば、L235、D265、D270、K322、P331、P329（アルファベットはアミノ酸の一文字表記。数字はKabatらによるEUインデックス（Kabat et. al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition）を示す。以下同様。）は、ヒトIgGの補体活性化能に重要な役割を果たしていると考えられており、この部位を他のアミノ酸に置換することによって、CDC活性を低減できる（Esohe E. Idusogie et. al. J. Immunol. 2000, 164:4178-4184, Yuanyuan Xu et. al. J. Biol. Chem. 1994, 269:3469-3474, Brekke, O.H. et. al. Eur. J. Immunol. 1994, 24:2542, Morgan, A., et. al., Immunology 1995, 86:319, Lund, J., et. al., J. Immunol., 1996, 157:4963, Tao, M. H., et. al., J. Exp. Med. 1993, 178:661）。具体的には、D270、K322、P329、P331をAに置換することにより可能である。また、P331をSやGに変換することによっても可能である。

20

【0089】

また、Glu233-Ser239、Gly316-Lys338、Lys274-Arg301、Tyr407-Arg416、Asn297、Glu318、Leu234-Ser239、Asp265-Glu269、Asn297-Thr299およびAla327-Ile332はIgGとFcRの結合に関与していると考えられており（Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., and Winter, G. (1988) Nature 332, 563-564, Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A., and Schmidt, R. E. (1998) Ann. Hematol. 76, 231-248, Gavin, A., Hulett, M., and Hogarth, P. M. (1998) in The Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity (van de Winkel, J. G.J., and Hogarth, P. M., eds), pp. 11-35, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, The Netherlands, Sautes, C. (1997) in Cell-mediated Effects of Immunoglobulins (Fridman, W. H., and Sautes, C., eds), pp. 29-66, R. G. Landes Co., Austin, TX, D'aron, M. (1997) Annu. Rev. Immunol. 15, 203-234, Canfield, S. M., and Morrison, S. L. (1991) J. Exp. Med. 173, 1483-1491, Chappel, M. S., Isenman, D. E., Everett, M., Xu, Y.-Y., Dorrington, K. J., and Klein, M. H. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 9036-9040, Woof, J. M., Partridge, L. J., Jefferis, R., and Burton, D. R. (1986) Mol. Immunol. 23, 319-330, Wines, B. D., Powell, M. S., Parren, P. W.H.I., Barnes, N., and Hogarth, P. M. (2000) J. Immunol. 164, 5313-5318）、この領域に変異を導入することにより、ADCC活性の低減が可能であると考えられる。具体的にはL235をE、G237をAに置換することにより、FcRとの結合能を低減させることが可能である。

30

40

【0090】

50

また、上述の逆の変異を導入することにより、安定性を改善した抗体の、ADCCおよび/またはCDCを増強することも可能である。本発明の抗体は、ADCCおよび/またはCDCを増強した抗体も包含する。

【0091】

本発明の抗体は、上記のADCCおよび/またはCDC活性の増強または低減させるアミノ酸の変異を1以上、好ましくは1～20個、1～17個、1～16個、1～15個、1～14個、1～13個、1～12個、1～11個、1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個または1もしくは2個有する。

【0092】

IgG2抗体の重鎖の300番目のFがYへ、309番目のVがLへまたは339番目のTがAへ置換された安定性を改善した抗体またはこれらの置換を組合せて有し安定性を改善した抗体には制限はないが、例えば抗CD40抗体が挙げられる。より具体的には、ハイブリドーマKM341-1-19（受託番号BP-7759）が産生する抗体の軽鎖および重鎖の可変領域を有する抗体あるいはハイブリドーマ2105（受託番号BP-8024）が産生する抗体の軽鎖および重鎖の可変領域を有する抗体が例示される。またIgG3抗体の重鎖の392番目のNがKへ、397番目MがVへ、または300番目のFがYへ置換された安定性を改善した抗体またはこれらの置換を組合せて有し安定性を改善した抗体には制限はないが、例えば抗CD40抗体が挙げられる。

【0093】

2. 定義

本明細書で使用する用語の定義は以下のとおりである。

【0094】

「CD40」とは、クラークら（E. A. Clark et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986）又はスタメンコビックら（I. Stamenkovic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989）により示されているアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味し、特にB細胞、DC、マクロファージ、内皮細胞、上皮細胞、あるいはそれらの腫瘍細胞表面に発現する抗原ポリペプチドである。

【0095】

「抗CD40抗体」とは、細胞発現CD40、全長CD40又は部分長CD40に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を意味する。好ましくはモノクローナル抗体である。

【0096】

抗CD40抗体が有する「アゴニスト」作用とは、B細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現するCD40にそのリガンドが結合することを促進する作用、あるいは、CD40リガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を、CD40を発現する細胞に与える作用を意味し、「アゴニスティック抗体」とは、そのような作用を有する抗体を意味する。CD40発現細胞に与える影響の1つとして、例えばB細胞増殖促進あるいは抗体産生促進が挙げられる。

【0097】

抗CD40抗体が有する「アンタゴニスティック」作用とは、B細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現するCD40にそのリガンドが結合することを阻害する作用、あるいは、CD40リガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を中和する作用を意味し、「アンタゴニスティック抗体」とはそのような作用を有する抗体を意味する。CD40発現細胞に与える影響の1つとして、例えばB細胞増殖抑制あるいは抗体産生抑制が挙げられる。

【0098】

「抗体」とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域並びに軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域をコードする遺伝子（「抗体遺伝子」と総称する）に由来するものである。本発明の抗体には、いずれのイムノグロブリンクラス及びアイソタイプを有する抗体をも包含する。本発明の抗体が結合する蛋白質（抗原）には制限はなく、例えばCD40が挙げられる。

【0099】

「CH1ドメイン」、「ヒンジドメイン」、「CH2ドメイン」および「CH3ドメイン」とは

10

20

30

40

50

、抗体重鎖定常領域の一部を示しており、KabatらのEUインデックス (Kabat et. al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth edition) に基づいている。CH1ドメインはEUインデックス118から215、ヒンジドメインはEUインデックス216から237、CH2ドメインはEUインデックス238から340、CH3ドメインはEUインデックス341から446の配列からなる部分である。

【0100】

「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。これまでに知られているヒトIgG2としてはJ00230 (配列番号64)、AJ250170 (配列番号65)、AF449616 (配列番号66)、AF449617 (配列番号67)、AF449618 (配列番号68)、Z49802 (配列番号69) またはZ49801 (配列番号70) などが、またヒトIgG3としてはM12958、K01313 (配列番号71)、X16110 (配列番号72)、X99549 (配列番号73)、AJ390236 (配列番号74)、AJ390237 (配列番号75)、AJ390238 (配列番号76)、AJ390241 (配列番号77)、AJ390242 (配列番号78)、AJ390246 (配列番号79)、AJ390247 (配列番号80)、AJ390252 (配列番号81)、AJ390244 (配列番号82)、AJ390254 (配列番号83)、AJ390260 (配列番号84)、AJ390262 (配列番号85)、AJ390272 (配列番号86)、AJ390276 (配列番号87) またはAJ390279 (配列番号88) などが挙げられる (以上の記号は遺伝子のGenBankアクセッション番号である)。配列番号64から88に表される配列はそれぞれの塩基配列を示す。

10

【0101】

「ヒトIgG重鎖」とは、重鎖可変領域およびヒトIgGの重鎖定常領域からなる重鎖である。例えば「ヒトIgG2重鎖」は重鎖可変領域およびヒトIgG2の重鎖定常領域からなる重鎖である。

20

【0102】

「ヒトIgG抗体」とは、ヒトIgG重鎖およびヒト軽鎖からなる抗体である。例えば「ヒトIgG2抗体」はヒトIgG2重鎖およびヒト軽鎖からなる抗体である。

【0103】

本発明の抗体は、当業者に周知であるハイブリドーマからの抗体遺伝子の単離方法、上記の公知のヒト抗体遺伝子のヒト抗体定常領域の配列情報、遺伝子への部位特異的変異導入方法等を用いることにより適宜作製しうる。

【0104】

本発明の抗体は、抗体遺伝子を発現ベクターに組み込み、ベクターを適当な宿主細胞に導入し、細胞もしくは細胞の培養上清から回収、精製することにより得ることができる。

30

【0105】

ベクターには、宿主細胞で自律的に増殖し得るか、宿主細胞の染色体に組み込まれ得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミドDNAとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ等が挙げられる。

【0106】

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌 (大腸菌、枯草菌等)、酵母、動物細胞 (COS細胞、CHO細胞等)、昆虫細胞が挙げられる。

40

【0107】

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法 (例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等) が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ES細胞にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

【0108】

本発明において、「培養物」とは、(a) 培養上清、(b) 培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物、(c) 形質転換体の分泌物のいずれをも意味するものである。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる

50

培養法などが採用される。

【0109】

培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することにより抗体を採取する。また、目的抗体が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせる用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

【0110】

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である (Wright, G., et al. (1991) Bio/Technology 9, 830-834)。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特長、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地、あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

【0111】

3. 医薬組成物

また、本発明の抗体の精製された製剤を含有する医薬組成物もまた、本発明の範囲内に含まれる。このような医薬組成物は、好ましくは、抗体に加えて、生理学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、他の抗体または抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することに再構成して使用してもよい。投与経路は、経口ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内の注射または配薬を含む非経腸的ルートである。

【0112】

この場合、本発明の抗体の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得るキャリアとの組合せとして投与される有効量は、1回につき体重1kgあたり0.0001mg~100mgであり、2日から8週間間隔で投与される。

【0113】

本発明の抗体を含む医薬組成物を使用する場合は、アゴニスティック抗CD40抗体については、免疫賦活化剤（抗ウィルス剤、抗感染症剤）であり、病原体としてはA、B、C、D、またはE型肝炎ウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、パピローマウイルス、クラミジア、マイコプラズマ、トキソプラズマ、マラリア、トリパノソーマ、結核などが例示される。または抗腫瘍剤であり、対象腫瘍としては例えばCD40を発現した癌細胞を含む悪性腫瘍、例えばリンパ腫（例えばホジキンリンパ腫）、白血病、悪性黒色腫、膵臓癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、頭頸部癌が挙げられる。または自己免疫疾患治療剤であり、対象疾患としてはリウマチが例示される。または、これらの疾患が複数併発してもよい。あるいは、ガン特異的ペプチドなどのワクチンとアジュバントとして併用することもできる。

【0114】

4. 組成物

また、本発明の抗体を含有する組成物もまた、本発明の範囲内に含まれる。組成物は抗体以外に、他の成分たとえば緩衝剤（pH変化を穏やかにすることを目的とし、例えばグルタミン酸ナトリウムが挙げられる）、安定化剤（抗体の化学的あるいは物理的な安定性を

高めることを目的とし、例えばグリシンが挙げられる）、界面活性剤（例えば、ポリソルベートが挙げられる）あるいは防腐剤などを含む。組成物は、例えば、水溶液あるいは凍結乾燥である。当該組成物は、例えば、試薬として抗原の分析に使用することができる。本発明のアミノ酸またはドメイン置換が施された抗体は、それが施されていない抗体に比べて凝集体生成が抑制されているため、収率等の観点から効率的に組成物が製造できる。また、抗原分析での分析溶液中において、抗体の凝集が起りにくいので、精度の高い結果が得られる。

【実施例】

【0115】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0116】

実施例1 抗CD40抗体、IgG1/IgG2定常領域融合体の作製

WO02/088186に記載の抗CD40抗体のうち、ハイブリドーマKM341-1-19（受託番号BP-7759）が産生する抗体（以下、341-1-19抗体）の軽鎖および重鎖の可変領域を有する抗体およびハイブリドーマ2105（受託番号BP-8024）が産生する抗体（以下、2105抗体）の軽鎖および重鎖の可変領域を有する抗体を作製した。ハイブリドーマKM341-1-19（受託番号BP-7759）が産生する抗体およびハイブリドーマ2105（受託番号BP-8024）が産生する抗体はアゴニスティック抗体であることが分かっている。

【0117】

341-1-19抗体はハイブリドーマKM341-1-19の産生する抗体であり、ハイブリドーマKM341-1-19は、受託番号 FERM BP-7759で、2001年9月27日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に寄託されている。また、2105抗体はハイブリドーマ2105の産生する抗体であり、ハイブリドーマ2105は、受託番号 FERM BP-8024で、2002年4月17日付で、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に寄託されている。

【0118】

341-1-19抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする塩基配列並びに重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

【0119】

341-1-19抗体の重鎖塩基配列（配列番号1）における、シグナル配列は50番目のアデニン（A）から始まる。シグナル配列と可変領域の境界は109番目の[アデニン]（[A]）と110番目のシトシン（C）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は493番目のアデニン（A）と494番目のグアニン（G）の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0120】

341-1-19抗体の重鎖アミノ酸列（配列番号2）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のセリン（S）と21番目のグルタミン（Q）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は148番目のセリン（S）と149番目のアラニン（A）の間に位置する。

【0121】

以上より、341-1-19抗体の重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号1における110番目のシトシン（C）から493番目のアデニン（A）までである。また、341-1-19抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号2における21番目のグルタミン（Q）から148番目のセリン（S）までである。

【0122】

341-1-19抗体の軽鎖塩基配列（配列番号3）における、シグナル配列は、29番目のアデニン（A）から始まる。シグナル配列と可変領域の境界は88番目の[アデニン]（[A]）と89番目のグアニン（G）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は400番目のアデニン（A）と401

番目の[シトシン]([C])の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0123】

341-1-19抗体の軽鎖アミノ酸列（配列番号4）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のグリシン(G)と21番目のグルタミン酸(E)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は124番目のリジン(K)と125番目の[アルギニン]([R])の間に位置する。

【0124】

以上より、341-1-19抗体の軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号3における89番目のグアニン(G)から400番目のアデニン(A)までである。また、341-1-19抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号4における21番目のグルタミン酸(E)から124番目のリジン(K)までである。

【0125】

341-1-19 重鎖塩基配列（配列番号：1）

GTCGACGCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAGCCACCAGAGCTCCAGACAATGTCTGTCTCCTTCTCATCTTCCTGCCCG
TGCTGGGCTCCCATGGGGTGTCTGTACAGGTCCAAGTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACC
CTCTCACTACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTACTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATC
GAGAGACCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATCGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTCGAA
TAATCATCAACCCAGACACATCCAACAACAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCCGAGGACACGGCTATATAT
TACTGTACAAGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGATTACCCCTACTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG
CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT
CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTT
GTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCA
GCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGA
GATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCAGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGATCC

341-1-19 重鎖アミノ酸配列（配列番号：2）

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLSQLQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGRYYRSKWY
RDYVGSVKSRIIINPDTSNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPYYYSMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA
PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT
KVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDSGFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

341-1-19 軽鎖塩基配列（配列番号：3）

ACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATA
CCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGC
ATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCC
TAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACGAGCGTAGCAACACTTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATATCAAA
CGTACG

10

20

30

40

50

341-1-19 軽鎖アミノ酸配列（配列番号：4）

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNTFGPGTKVDIKRT

2105抗体の重鎖及び軽鎖可変領域をコードするDNA並びに重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

【0126】

2105抗体の重鎖塩基配列（配列番号5）における、シグナル配列は70番目のアデニン(A)から始まる。シグナル配列と可変領域の境界は126番目の[チミン]([T])と127番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は495番目のアデニン(A)と496番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

10

【0127】

2105抗体の重鎖アミノ酸配列（配列番号6）における、シグナル配列と可変領域の境界は19番目のシステイン(C)と20番目のグルタミン酸(E)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は142番目のセリン(S)と143番目のアラニン(A)の間に位置する。

【0128】

以上より、2105抗体の重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号5における127番目のグアニン(G)から495番目のアデニン(A)までである。また、2105抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6における20番目のグルタミン酸(E)から142番目のセリン(S)までである。

20

【0129】

2105抗体の軽鎖塩基配列（配列番号7）における、シグナル配列は、28番目のアデニン(A)から始まる。シグナル配列と可変領域の境界は87番目の[アデニン]([A])と88番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は405番目のアデニン(A)と406番目の[シトシン]([C])の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0130】

2105抗体の軽鎖アミノ酸配列（配列番号8）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のグリシン(G)と21番目のグルタミン酸(E)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は126番目のリジン(K)と127番目の[アルギニン]([R])の間に位置する。

30

【0131】

以上より、2105抗体の軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号7における88番目のグアニン(G)から405番目のアデニン(A)までである。また、2105抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号8における21番目のグルタミン酸(E)から126番目のリジン(K)までである。

【0132】

2105 重鎖塩基配列（配列番号：5）

CTGAACACAGACCCGTCGACTCCCAGGTGTTTCCATTTCAGTGATCAGCACTGAACACAGAGGACTCACCATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCTTTTGGCTATTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCAGTGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCTTGGTGCATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGCTATTTTCGGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG

40

2105 重鎖アミノ酸配列（配列番号：6）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSGISWNSGSLVHADS VKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDRLFRGVRRYGMVDVWGQTTTVTVSSASTK

50

2105 軽鎖塩基配列（配列番号：7）

CTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAC
CACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG
CCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA
TCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCT
AGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCCACTGGCTCACTTTCGGCGGGGGGACCAAGGTGGAGA
TCAAACGTACGGTG

2105 軽鎖アミノ酸配列（配列番号：8）

MEAPAQLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTV

本発明者らは、抗CD40抗体である4D11（IgG4サブクラスを有する）やその変異体である4D11PE（4D11抗体遺伝子の重鎖、軽鎖を含むDNA断片を、BglIII、NheIで消化、精製した後、N5KG4PEベクター（IDEC Pharmaceuticals）につなぎ換えて作製した。N5KG4PEはIgG4定常領域に、S228P及びL235E、N5KG4PはS228Pの点変異をそれぞれ含む。）の培養上清をProtein Aカラム（アマシャムバイオサイエンス社）にチャージし0.1Mクエン酸バッファー（pH2.7）により溶出した後37℃で1分間および10分間インキュベートした条件下において、約10%の凝集体が生成するのに対し、4D11の定常領域をIgG1とした4D114D11G1においては、ほとんど凝集体が生じないことを見出している（特願2003-431408）。同様に、IgG2においてもドメインスワップ変異抗体を用いて、低pHにおける凝集体形成抑制にかかわるIgG1の領域を特定するために、ドメインスワップ変異抗体IgG[1/1/2/2]（[1/1/2/2]は、左から順にCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインに関して、CH1ドメインはIgG1由来、ヒンジドメインはIgG1由来、CH2ドメインはIgG2由来およびCH3ドメインはIgG2由来であることを意味している。以下同様に解釈する。）、IgG[2/2/1/1]、IgG[2/2/1/2]、IgG[2/2/2/1]、を以下に述べるように作製した。

【0133】

IgG[1/1/2/2]は、N5KG1-Val Lark（IDEC Pharmaceuticals:以下N5KG1と略記）を鋳型として、プライマーlinkH: gggtagctcctcacattcagtgatcag（配列番号9）、24ch4: AGGGGTCCGGGAGATCATGAGAGTGTCTT（配列番号10）で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、抗体発現ベクターN5KG2（IDEC Pharmaceuticals, US Patent 6001358、「G2」は、重鎖定常領域がIgG2由来であることを示す（以下、同様）。）を鋳型として、プライマー24ch3: AAGGACTCTCATGATCTCCCGACCCCT（配列番号11）、linkH2: tgatcatagtagatatacggc（配列番号12）を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG1122と名づけた。

【0134】

IgG[2/2/1/1]は、N5KG2を鋳型として、プライマーlinkH: gggtagctcctcacattcagtgatcag（配列番号9）、24ch4: AGGGGTCCGGGAGATCATGAGAGTGTCTT（配列番号10）で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG1を鋳型として、プライマー24ch3: AAGGACTCTCATGATCTCCCGACCCCT（配列番号11）、linkH2: tgatcatagtagatatacggc（配列番号12）を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG2211と名づけた。

【0135】

IgG[2/2/1/2]は、上記のように作製したN5KG2211を鋳型として、プライマーlinkH: ggg tacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号 9)、CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (配列番号 1 3) で98℃ 1 秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーCH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (配列番号 1 4)、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (配列番号 1 2) を用いて、98℃ 1 秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1 秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG2212と名づけた。

10

【0136】

IgG[2/2/2/1]は、N5KG2を鋳型として、プライマーlinkH: ggg tacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号 9)、CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (配列番号 1 3) で98℃ 1 秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG1を鋳型として、プライマーCH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (配列番号 1 4)、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (配列番号 1 2) を用いて、98℃ 1 秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1 秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG2221と名づけた。

20

【0137】

それぞれの発現ベクターをBglII、NheIで消化し、341-1-19抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を挿入し発現ベクターを完成させた。

【0138】

また、ハイブリドーマKM341-1-19 (受託番号BP-7759) が産生する抗体の軽鎖および重鎖の可変領域を有する抗体およびハイブリドーマ2105 (受託番号BP-8024) が産生する抗体の軽鎖および重鎖の可変領域を有する抗体として341G2Serおよび2105G2Serを作製した。

【0139】

341G2Serの重鎖塩基配列 (配列番号 1 5) における、シグナル配列と可変領域の境界は60番目の[アデニン]([A])と61番目のシトシン (C) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は444番目のアデニン(A)と445番目のグアニン (G) の間に位置する (遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver.2) を使用)。

30

【0140】

341G2Serの重鎖アミノ酸配列 (配列番号 1 6) における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のセリン(S)と21番目のグルタミン(Q)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は148番目のセリン(S)と149番目のアラニン(A)の間に位置する。

【0141】

以上より、341G2Serの重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号 1 5 における61番目のシトシン (C) から444番目のアデニン(A)までである。また、341G2Serの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 における21番目のグルタミン(Q)から148番目のセリン(S)までである。

40

【0142】

341G2Ser重鎖全塩基配列 (配列番号: 1 5)

ATGTCGTGCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCCGTGCTGGGCCCTCCCATGGGGTGTCTGTACAGGTCCAACTGCAGCAGTC
AGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTG
CTACTTGAAGTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGACCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTAT
CGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTCGAATAATCATCAACCCAGACACATCCAACAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAA
CTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATATTACTGTACAAGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGATTACCCCTACTACTACA

50

GTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
 CCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
 GTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA
 GCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCACT
 CTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGA
 GCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAG
 GAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
 AGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAC
 CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTC
 CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
 TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

341G2Ser重鎖全アミノ酸配列（配列番号：16）

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLSQLQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGRITYYRSKWY
 RDYVGSVKSRILINPDTSNNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPYYYSMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA
 PCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNT
 KVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

341G2Serの軽鎖塩基配列（配列番号17）における、シグナル配列と可変領域の境界は60番目の[アデニン]([A])と61番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は372番目のアデニン(A)と373番目の[シトシン]([C])の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0143】

341G2Serの軽鎖アミノ酸配列（配列番号18）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のグリシン(G)と21番目のグルタミン酸(E)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は124番目のリジン(K)と125番目の[アルギニン]([R])の間に位置する。以上より、341G2Serの軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号17における61番目のグアニン(G)から372番目のアデニン(A)までである。また、341G2Serの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号18における21番目のグルタミン酸(E)から124番目のリジン(K)までである。

30

【0144】

341G2Ser軽鎖全塩基配列（配列番号：17）

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTC
 TCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAG
 CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC
 AGGTTCACTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
 CTGTCAGCAGCGTAGCAACACTTTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA
 TCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAATTCTATCCCAGAGAG
 GCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
 CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCA
 CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

40

341G2Ser軽鎖全アミノ酸配列（配列番号：18）

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
 RFGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRNTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

50

2105G2Serの重鎖塩基配列（配列番号19）における、シグナル配列と可変領域の境界は57番目の[チミン]([T])と58番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は426番目のアデニン(A)と427番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0145】

2105G2Serの重鎖アミノ酸配列（配列番号20）における、シグナル配列と可変領域の境界は19番目のシステイン(C)と20番目のグルタミン酸(E)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は142番目のセリン(S)と143番目のアラニン(A)の間に位置する。

【0146】

以上より、2105G2Serの重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号19における58番目のグアニン(G)から426番目のアデニン(A)までである。また、2105G2Serの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号20における20番目のグルタミン酸(E)から142番目のセリン(S)までである。

【0147】

2105G2Ser重鎖全塩基配列（配列番号：19）

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCTTTTGGCTATTTTAAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGC
ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCTTGGTGCATGCG
GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC
TGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGCTATTTCTGGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCC
AAGGGACCACGGTCAACGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC
TCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGC
TCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT
GAGCGCAAAATGTTGTGTCGAGTGGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA
ACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGG
TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGC
TTCCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA
AGGCCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

2105G2Ser重鎖全アミノ酸配列（配列番号：20）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSLVHA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDRLFGRVRYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
FRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

2105G2Serの軽鎖塩基配列（配列番号21）における、シグナル配列と可変領域の境界は60番目の[アデニン]([A])と61番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は378番目のアデニン(A)と379番目の[シトシン]([C])の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0148】

2105G2Serの軽鎖アミノ酸配列（配列番号22）における、シグナル配列と可変領域の境

10

20

30

40

50

界は20番目のグリシン(G)と21番目のグルタミン酸(E)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は126番目のリジン(K)と127番目の[アルギニン]([R])の間に位置する。以上より、2105G2Serの軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号 2 1 における61番目のグアニン(G)から378番目のアデニン(A)までである。また、2105G2Serの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 2 2 における21番目のグルタミン酸(E)から126番目のリジン(K)までである。

【0149】

2105G2Ser軽鎖全塩基配列（配列番号：2 1）

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTC
TCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAG
CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC
AGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
CTGTCAGCAGCGTAGCCACTGGCTCACTTTTCGGCGGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTG
TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG
AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA

10

2105G2Ser軽鎖全アミノ酸配列（配列番号：2 2）

MEAPQQLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

実施例 2 ドメインスワップ変異抗CD40抗体、及び、アミノ酸置換変異体抗体の発現・精製

実施例 1 で作製した発現ベクターDNAをEndoFree Plasmid Kit（キアゲン社）にて調製し、FreeStyle™ 293 Expression System（インビトロジェンライフテクノロジー社）を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って発現ベクターを浮遊性293細胞（インビトロジェンライフテクノロジー社）に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。孔径0.22 μmのメンブランフィルター（MILLIPORE製）で濾過した培養上清（IgGとして約500 μg）を抗体精製用アフニティーカラムであるHiTrap rProtein A FF（カラム体積1 ml）（アマシャムバイオサイエンス社）にチャージし、PBS(-)で洗浄後20mMクエン酸バッファー（pH3.4）により溶出し、200mMリン酸バッファー（pH7.0）を含むチューブに回収した。

30

【0150】

実施例 3 抗体溶液の凝集体の含有率の測定

抗体溶液の凝集体含有率は、高速液体クロマトグラフ装置（島津社製）及びTSK-G3000 SWカラム（東ソー社製）と、溶媒として20mMリン酸ナトリウム、500mM NaCl pH7.0を用いて分析を行った。溶出位置をゲルろ過HPLC用分子量マーカー（オリエンタル酵母社）（Cat No.40403701）と比較することで、抗体蛋白の単量体とそれ以上の凝集体のピークを同定して、それぞれのピーク面積から凝集体の含有率を算出した。

40

【0151】

実施例 4 ドメインスワップ変異抗CD40抗体の安定性の評価

実施例 2 に示す方法で精製完了した各抗体サンプルの凝集体の含有率は、実施例 3 の方法で測定したところ、全試料とも0%であった。それら精製した抗体サンプル300 μlに対し、200mMクエン酸ナトリウム、50mM NaClから成るバッファー（pH2.7）60 μlを添加してpH3.5に調整し、37℃で10分間あるいは60分間インキュベートした後、その低pH処理溶液150 μlに対して500mMリン酸ナトリウムバッファー（pH8.0）を37.5 μl加えることにより中

50

和した。低pH処理後の抗体溶液の凝集体含有率は、実施例3に示す方法で測定した。

【0152】

その結果、少なくともCH2ドメインがIgG1由来（IgG[2/2/1/1]或はIgG[2/2/1/2]）であれば、定常領域全体がIgG1である場合と同程度に低pHで安定であることが判明した（表1）。表1は、IgG2/IgG1ドメインスワップ変異抗体の低pHにおける安定性を示す。

【表1】

精製抗体	凝集体 (%)	
	10 分間*	60 分間*
341-G1	0.00	0.00
341-G2Ser	1.25	4.96
341-G [1/1/2/2]	0.73	3.10
341-G [2/2/1/1]	0.00	0.00
341-G [2/2/1/2]	0.00	0.00
341-G [2/2/2/1]	1.33	4.58

*低pHにおけるインキュベーション時間

10

【0153】

20

実施例5 IgG2のCH2ドメインの1アミノ酸変異体の作製

実施例4で341-G2Ser抗体の定常領域のCH2ドメインをIgG1としたドメインスワップ変異抗体IgG[2/2/1/2]において、ほとんど凝集体が生じないことを見出したので、更に凝集体形成抑制に寄与しているアミノ酸残基を絞り込むために、341G2Ser抗体のCH2ドメイン内に存在するIgG1とIgG4間で異なるアミノ酸残基6箇所（KabatらによるEUインデックスにより示される274、296、300、309、327、339番目）に注目して、IgG2のアミノ酸残基からIgG1のアミノ酸残基に変換した各変異体（341-G2Ser[Q274K]（274番目のGln残基をLysへ変換、以下同様）、341-G2Ser[F296Y]、341-G2Ser[F300Y]、341-G2Ser[V309L]、341-G2Ser[G327A]、341-G2Ser[T339A]）を作製した。抗CD40抗体の341-G2Ser発現ベクター（N5KG2 Ser-341）のDNAを鋳型として、GeneEditorTM in vitro Site-Directed Mutagenesis System（プロメガ社）を用いた部位特異的変異導入法により、定常領域のアミノ酸置換体をコードする各種の変異DNAを調製した。変異導入用オリゴヌクレオチド（5'末端リン酸化済み）としては、Q274K：AGACCCCGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT G（配列番号23）、F296Y：CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTTCC（配列番号24）、F300Y：AGTTCAACAG CACGTACCGT GTG GTCAGC（配列番号25）、V309L：GCGTCCTCAC CGTTCTGCAC CAGGACTGG（配列番号26）、G327A：AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC CCAGCCTCC（配列番号27）、T339A：GAAAACCATC TCCAAA GCCA AAGGGCAGCC C（配列番号28）の各オリゴヌクレオチドを用いた。目的の変異導入用オリゴヌクレオチドと上記キット付属のSelection Oligonucleotideを鋳型DNAとアニーリングさせて変異導入鎖を合成した後、GeneEditorTM Antibiotic Selection Mix存在下では変異体のみが増殖することを利用して変異体を選択した。より具体的には、dsDNAテンプレートをアルカリ条件下（0.2M NaOH、0.2mMEDTA（最終濃度））室温で5分間インキュベートした後、2M酢酸アンモニウム（pH4.6）を10分の1容量加えて中和してからエタノール沈殿により回収した。6種類に変異体ごとに別のチューブ中で、アルカリ変性処理した鋳型DNAに、変異導入用オリゴヌクレオチドと新しい抗生物質耐性獲得用Selection Oligonucleotide（Top Select Oligo、5'末端リン酸化）、及び、キット添付のアニーリングバッファーを加えた後、75℃で5分間保温し、37℃にゆっくり下げることによりアニーリングを行なった。次に、変異鎖の合成と連結のために、キット付属のSynthesis 10×buffer、T4 DNA Polymerase、及びT4 DNA ligaseを加えて、37℃で90分反応を行なった。GeneEditorTM Antibiotic Selection Mix存在下でコンピテントセルBMH 71-18 mutSに形

30

40

50

質転換して培養した形質転換体大腸菌よりプラスミドDNAを調製し、更にそのDNAによりコンピテントセルJM109を形質転換後、GeneEditor™ Antibiotic Selection Mixを含むLBプレートに播種した。各変異体について、プレートに生じた形質転換体を培養して、プラスミドDNAを精製してDNA塩基配列を解析した。DNA塩基配列の結果、目的とするアミノ酸変異が導入された6種類の抗CD40抗体変異体の発現ベクターを取得した。それら抗CD40抗体の1アミノ酸置換変異体蛋白を発現するプラスミドDNAをN5KG2Ser-341-Q274K、N5KG2Ser-341-F296Y、N5KG2Ser-341-F300Y、N5KG2Ser-341-V309L、N5KG2Ser-341-G327A、N5KG2Ser-341-T339Aと命名した。

【0154】

10

実施例6 1アミノ酸変異体の凝集体形成抑制評価

実施例5の1アミノ酸変異体の抗体発現ベクターを用いて、実施例2に従って発現、精製し、実施例4に従って低pH処理を行い、実施例3に従って、凝集体の含有率を測定した。

【0155】

その結果、1アミノ酸変異により、IgG1やIgG[2/2/1/2]のレベルまで低pHにおける凝集体の生産が抑制される変異体は見出されなかったが、341-G2Ser[F300Y]、341-G2Ser[V309L]、及び341-G2Ser[T339A]では完全ではないが、一部抑制されることが確認された(表2)。表2は、IgG2のCH2ドメインにIgG1の1アミノ酸置換を導入した時の低pHにおける安定性を示す。

20

【表2】

精製抗体	凝集体 (%)	
	10 分間*	60 分間*
341-G2Ser [Q274K]	1.31	4.79
341-G2Ser [F296Y]	0.93	3.88
341-G2Ser [F300Y]	0.00	2.24
341-G2Ser [V309L]	0.00	2.61
341-G2Ser [G327A]	0.94	4.35
341-G2Ser [T339A]	0.00	3.66
341-G1	0.00	0.00
341-G2Ser	0.97	4.80

*低pHにおけるインキュベーション時間

30

【0156】

実施例7

実施例6に示したように、341G2Ser抗体のCH2ドメインの1アミノ酸置換体を用いた検討から、凝集体の生成が一部分抑制される変異体(341-G2Ser[F300Y]、341-G2Ser[V309L]、及び341-G2Ser[T339A])が見出せたので、更に凝集体形成抑制を促進するために、その3箇所の1アミノ酸変異のいずれか2つ、或は全て組み合わせて有する変異体を作製した。作製した変異体は、341-G2Ser[F300Y/V309L](300番目のアミノ酸残基であるFをY、更に309番目のVをLへ変換、以下同様)、341-G2Ser[F300Y/T339A]、341-G2Ser[V309L/T339A]、341-G2Ser[F300Y/V309L/T339A](300番目のFをY、309番目のVをL、及び339番目のTをAへ変換)の4種類である。変異体発現ベクターの作製法は、複数箇所の変異導入を行なうために、新たに作製したより長い変異導入用オリゴヌクレオチド、或はそれらオリゴヌクレオチドを2つ以上同時に鋳型となるベクターDNAにアニーリングさせた以外は、実施例5のGeneEditor™ in vitro Site-Directed Mutagenesis System(プロメガ社)による部

40

50

位特異的変異導入法に従って実施した。変異導入用オリゴヌクレオチドとしては、341-G2Ser[F300Y/V309L]作製にはF300YV309L：AGTTCAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTCACCGT TCTGCACCAG GACTGG (配列番号29)を、341-G2Ser[F300Y/T339A]作製には実施例5で用いたF300Y及びT339Aを、341-G2Ser[V309L/T339A]作製にはV309L及びT339Aを、341-G2Ser[F300Y/V309L/T339A]作製にはF300YV309L及びT339Aを使用した。実施例5で示した部位特異的変異導入法を行い、得られた各変異抗体発現ベクターの候補プラスミドDNAについてDNA塩基配列解析による選択を実施して、目的とするアミノ酸変異が導入された4種類の抗CD40抗体変異体の発現ベクターを取得した。それら抗CD40抗体の変異体蛋白を発現するプラスミドDNAをN5KG2Ser-341-F300Y/V309L、N5KG2Ser-341-F300Y/T339A、N5KG2Ser-341-V309L/T339A、N5KG2Ser-341-F300Y/V309L/T339Aと命名した。

10

【0157】

341-G2Ser [F300Y/V309L/T339A]の重鎖をコードする塩基配列並びに重鎖のアミノ酸配列を以下に示す。

【0158】

341-G2Ser [F300Y/V309L/T339A] 重鎖塩基配列 (配列番号：30)

ATGTCGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCCGTGCTGGGCCCTCCCATGGGGTGTCTGTCAAGGTCCAAGTGCAGCAGTC
AGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTG
CTACTTGAAGTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGACCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTAT
CGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTCGAATAATCATCAACCCAGACACATCCAACAACAGTTCTCCCTGCAGCTGAA
CTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATATTACTGTACAAGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGATTACCCCTACTACTACA
GTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG
CCCTGTCTCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
GTCGTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGT
CTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAG
GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
AGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAATAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

20

30

配列番号30における、シグナル配列と可変領域の境界は60番目のアデニン(A)と61番目のシトシン(C)の間に位置する(遺伝子配列予測ソフトウェア(Signal P ver.2)を使用)。

【0159】

40

341-G2Ser [F300Y/V309L/T339A] 重鎖アミノ酸配列 (配列番号：31)

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLSQLQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGRYYRSKWY
RDYVGSVKSRILINPDTSNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPYYYSMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA
PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT
KVDKTVVERKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号31における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のセリン(S)と21

50

番目のグルタミン(Q)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0160】

341-G2Ser [F300Y/V309L/T339A]の軽鎖をコードする塩基配列並びに軽鎖のアミノ酸配列を以下に示す。

【0161】

341-G2Ser [F300Y/V309L/T339A] 軽鎖塩基配列（配列番号：32）

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTC
TCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAG
CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC
AGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
CTGTCAGCAGCGTAGCAACACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA
TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG
GCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

10

配列番号32における、シグナル配列と可変領域の境界は60番目のアデニン(A)と61番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

20

【0162】

341-G2Ser [F300Y/V309L/T339A] 軽鎖アミノ酸配列（配列番号：33）

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号33における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のグリシン(G)と21番目のグルタミン酸(E)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

30

【0163】

実施例8 341G2Serの変異体の凝集体形成抑制評価

実施例7の341G2Serの変異体発現ベクターを用いて、実施例2に従って発現、精製し、実施例4に従って低pH処理を行い、実施例3に従って凝集体の含有率を測定し低pHにおける安定性を評価した。

【0164】

その結果、341-G2Ser[F300Y/V309L/T339A]において最も低pHにおける凝集体の生産が抑制されることが確認された（表3）。

40

【表 3】

精製抗体	凝集体 (%)	
	10 分間*	60 分間*
341-G2Ser [F300Y/V309L]	0.00	1.31
341-G2Ser [F300Y/T339A]	0.00	1.62
341-G2Ser [V309L/T339A]	0.00	2.04
341-G2Ser [F300Y/V309L/T339A]	0.00	0.46
341-G1	0.00	0.00
341-G2Ser	1.03	3.70

*低 pH におけるインキュベーション時間

10

【0165】

実施例 9 2105G2Serの低pHによる凝集体形成抑制の検証

341G2Serと同じく2105G2Serについても、CH2ドメインの3つのアミノ酸をIgG1のアミノ酸に変換したF300YV309LT339Aの変異を持つIgG2の定常領域を持たせた場合、低pH条件下での凝集体形成が抑制可能であるか検討した。N5KG2Ser-341-F300Y/V309L/T339Aの軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含むDNA断片をBglII、NheIで消化することにより切り出し、その代わりに2105の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を挿入した。得られた2105抗体の変異体蛋白を発現するプラスミドDNAをN5KG2Ser-2105-F300YV309LT339Aと命名した。

20

【0166】

2105-G2Ser [F300Y/V309L/T339A]のH鎖全長をコードするDNA並びにH鎖のアミノ酸配列を以下に示す。

【0167】

2105-G2Ser [F300Y/V309L/T339A] 重鎖塩基配列 (配列番号: 34)

30

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
 GGGAGGCTTGTTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGC
 ACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCTTGGTGCATGCG
 GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGC
 TGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGCTATTTCTGGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCC
 AAGGGACCACGGTCAACGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC
 TCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGC
 TCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
 CCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT
 GAGCGCAAAATGTTGTGTCGAGTGGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAA
 ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGG
 TCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGC
 TACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA
 AGGCCTCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCC
 CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
 CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
 ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

40

50

配列番号 34 における、シグナル配列と可変領域の境界は 57 番目のチミン(T)と 58 番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0168】

2015-G2Ser [F300Y/V309L/T339A] 重鎖アミノ酸配列（配列番号：35）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSLVHA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDRLFRGVRYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
SESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV
ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 35 における、シグナル配列と可変領域の境界は 19 番目のシステイン(C)と 20 番目のグルタミン酸(E)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0169】

2105-G2Ser [F300Y/V309L/T339A] の軽鎖をコードする塩基配列並びに軽鎖のアミノ酸配列を以下に示す。

20

【0170】

2105-G2Ser [F300YV309LT339A] 軽鎖塩基配列（配列番号：36）

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGAGAAATTGTGTTGACACAGTC
TCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAG
CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC
AGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
CTGTCAGCAGCGTAGCCACTGGCTCACTTTCGGCGGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTG
TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG
AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

30

配列番号 36 における、シグナル配列と可変領域の境界は 60 番目のアデニン(A)と 61 番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0171】

2105-G2Ser [F300YV309LT339A] 軽鎖アミノ酸配列（配列番号：37）

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

配列番号 37 における、シグナル配列と可変領域の境界は 20 番目のグリシン(G)と 21 番目のグルタミン酸(E)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0172】

同発現ベクター、及び、対象としてN5KG2Ser-2105とN5KG1-2105の各発現ベクターを用いて、実施例2の方法で抗体を発現・精製し、実施例4及び実施例3の方法で、低pHの安

50

定性を調べた。

【0173】

その結果、2105抗体においては定常領域がIgG1の抗体でさえ凝集体の生成が高く341G2Serの場合ほどの効果はみられなかったが、2105-G2Serとその変異体である2105-G2Ser[F300YV309LT339A]を比較すると、後方で安定性が高まることを確認した（表4）。

【表4】

精製抗体	凝集体（％）	
	10 分間*	60 分間*
2105-G1	0.00	13.4
2105-G2Ser	2.33	48.9
2105-G2Ser[F300YV309LT339A]	1.07	37.3

10

【0174】

実施例10 抗CD40抗体のRamos細胞に対する結合活性

実施例2で作製したドメインスワップ変異抗体および実施例5で作製した変異体抗体が、もとの抗体と同等の結合活性を示すかどうか調べるために、CD40を発現するRamos[ATCC]細胞への結合活性を測定した。

20

【0175】

2×10^6 /mlの濃度でRamos細胞株を0.1%NaN₃、2%FCS含有PBSの染色バッファー（SB）に浮遊させた。細胞浮遊液（100 μ l／ウェル）を96-well丸底プレート（ベクトンディッキンソン社製）に分注した。各々のハイブリドーマの培養上清（50 μ l）を加え、氷温下30分間インキュベートした。陰性コントロールとしてヒト血清アルブミンに対するヒトIgG1抗体を用い、ハイブリドーマ培養培地で2 μ g/mlの濃度に調製し、50 μ l添加後氷温下15分間インキュベートした。SBで洗浄した後、250倍希釈したR-PE蛍光標識抗ヒト抗体(Southern Biotechnology社製)50 μ lを加え、氷温下15分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、300～500 μ lのFACS緩衝液に懸濁し、FACS（FACSort、FACScan、ベクトンディッキンソン社製）で各細胞の蛍光強度を測定した。

30

【0176】

その結果、ドメインスワップ変異抗体および変異体抗体で結合性は変化無かった（図1A、B、C）。図1A、B、Cにおいて、縦軸の抗体結合の単位は平均蛍光強度である。図1A、BおよびCにおけるisotype controlの値はそれぞれ7.15、7.15および5.01である。

【0177】

実施例11 Ramos細胞における抗CD40抗体によるCD95発現促進

341-1-19、2105はアゴニスト抗体として知られている。抗体の持つアゴニスト活性が、定常領域の構造変化による影響を調べた。Ramos細胞は、CD40リガンドを添加することにより、CD95の発現上昇が観察される。この細胞に、抗体を添加することにより、CD95の発現が上昇するかを指標に、抗体のアゴニスト活性を評価した。

40

【0178】

1.0×10^6 個/mlのRamos細胞懸濁液を96ウェルプレートに50 μ l/wellで播種した。培養上清又は精製抗体を、96ウェルプレートに100 μ l/well添加した。一晚培養後、細胞を集めR-PE標識抗CD95抗体（Pharmingen NJ）を用い、FACSを使って解析した。

【0179】

その結果、定常領域の構造変化によって、抗体のアнтаゴニスト活性に変化は見られなかった（図2A、B、C）。図2A、B、Cにおいて、縦軸のCD95発現量の単位は平均蛍光強度

50

である。図 2 A、B および C における isotype control の値はそれぞれ 7.58、7.58 および 6.29 である。

【0180】

実施例 12 抗CD40抗体、IgG1/IgG3 定常領域融合体の作製

W002/088186 に記載の抗CD40抗体のうち、4D11抗体の軽鎖および重鎖の可変領域を用いて抗体を作製した。なお、これら2つの抗体はアンタゴニストとして作用することが分かっている。

【0181】

4D11抗体はハイブリドーマ4D11の産生する抗体であり、ハイブリドーマ4D11は、受託番号 FERM BP-7758 で、2001年9月27日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に寄託されている。

【0182】

4D11抗体の重鎖可変領域、及び軽鎖可変領域をコードする塩基配列並びに重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

【0183】

4D11抗体の重鎖核酸配列（配列番号38）における、シグナル配列と可変領域の境界は93番目の[シトシン]([C])と94番目のシトシン(C)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は456番目のアデニン(A)と457番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0184】

4D11抗体の重鎖アミノ酸配列（配列番号39）における、シグナル配列と可変領域の境界は26番目のセリン(S)と27番目のグルタミン(Q)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は147番目のセリン(S)と148番目のアラニン(A)の間に位置する。

【0185】

以上より、4D11抗体の重鎖可変領域の核酸配列は、配列番号38における94番目のシトシン(C)から456番目のアデニン(A)までである。また、4D11の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号39における27番目のグルタミン(Q)から147番目のセリン(S)までである。

【0186】

4D11抗体の軽鎖核酸配列（配列番号40）における、シグナル配列と可変領域の境界は124番目の[チミン]([T])と125番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は442番目のアデニン(A)と443番目の[シトシン]([C])の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0187】

4D11抗体の軽鎖アミノ酸配列（配列番号41）における、シグナル配列と可変領域の境界は22番目のシステイン(C)と23番目のアラニン(A)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は128番目のリジン(K)と129番目の[アルギニン]([R])の間に位置する。

【0188】

以上より、4D11抗体の軽鎖可変領域の核酸配列は、配列番号40における125番目のグアニン(G)から442番目のアデニン(A)までである。また、4D11の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号41における23番目のアラニン(A)から128番目のリジン(K)までである。

【0189】

4D11 重鎖塩基配列（配列番号：38）

ATATGTCGACGAGTCATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCCAG
ATGGGTCCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA
CTGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
ATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTC

10

20

30

40

50

CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGACACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGACCTGTAGTAC
GATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC

4D11 重鎖アミノ酸配列（配列番号：39）

MDLMCKMKHLLWFFLLLVAAPRWLSQLQLQESGPGLLKPSSETLSLTCTVSGGSISSPGYYGGWIRQPPGKGLEWIGSIY
KSGSTYHNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPPVVRVFGWFDPPWGQGLVTVSSAS

4D11 軽鎖塩基配列（配列番号：40）

AGATCTTAAGCAAGTGTAACAACCTCAGAGTACGCGGGGAGACCCACTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC
AGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCT
GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAA
ACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAATTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGGCAGTG
GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAAT
AGTTACCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTACG

10

4D11 軽鎖アミノ酸配列（配列番号：41）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPTFGQGTKVEIKRT

IgG2抗体と同様に、IgG3抗体においてもドメインスワップ変異抗体を用いて、低pHにお
ける凝集体形成抑制にかかわるIgG1の領域を特定するために、ドメインスワップ変異抗体
IgG[1/1/3/3]（[1/1/3/3]は、左から順にCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインお
よびCH3ドメインに関して、CH1ドメインはIgG1由来、ヒンジドメインはIgG1由来、CH2ド
メインはIgG3由来およびCH3ドメインはIgG3由来であることを意味している。以下同様に
解釈する。）、IgG[3/3/1/1]、IgG[3/3/1/3]、IgG[3/3/3/1]、を以下に述べるように作製
した。

20

【0190】

IgG[1/1/3/3]は、N5KG1-Val Lark（IDEC Pharmaceuticals:以下N5KG1と略記）を鋳型と
して、プライマーlinkH: gggtagctcctcacattcagtgatcag（配列番号9）、13ch1-R: GTCTT
CGTGGCTCAGTCCACCACCACGCA（配列番号42）で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15
回行った。同時に、抗体発現ベクターN5KG3（IDEC Pharmaceuticals, US Patent 6001358
、「G3」は、重鎖定常領域がIgG3由来であることを示す（以下、同様）。）を鋳型として
、プライマー13ch1: TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC（配列番号43）、linkH2: tgatc
atacgtagatatcacggc（配列番号12）を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を
15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等
量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、l
inkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクター
のIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG1133と名づけた。

30

【0191】

IgG[3/3/1/1]は、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH: gggtagctcctcacattcagtgatca
g（配列番号9）13ch1-R: GTCTTCGTGGCTCAGTCCACCACCACGCA（配列番号42）で98℃1秒、
60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG1を鋳型として、プライマー13ch1
: TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC（配列番号43）、linkH2: tgatcatacgtagatatcacgg
c（配列番号12）を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅
したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、
98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、1
5回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と
置き換えた。この発現ベクターをN5KG3311と名づけた。

40

【0192】

50

IgG[3/3/1/3]は、上記のように作製したN5KG3311を鋳型として、プライマーlinkH: ggg tacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号 9)、CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (配列番号 13) で98℃ 1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG3を鋳型として、プライマーCH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (配列番号 14)、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (配列番号 12) を用いて、98℃ 1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3313と名づけた。

10

【0193】

IgG[3/3/3/1]は、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH: ggg tacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号 9)、CH3consR: GGTGTACACCTGTGGCTCTCGGGGCTGCCC (配列番号 13) で98℃ 1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG1を鋳型として、プライマーCH3cons: GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC (配列番号 14)、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (配列番号 12) を用いて、98℃ 1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3331と名づけた。

20

【0194】

それぞれの発現ベクターをBglII、NheIで消化し、4D11の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を挿入し発現ベクターを完成させた。

【0195】

実施例 13 IgG3のCD40抗体の発現・精製、及び精製品の凝集体含有率の測定

作製した発現ベクターDNAを実施例2に従って発現を行い、得られた培養上清 (IgGとして約300 μg) を抗体精製用アフィニティーカラムであるHiTrap rProtein G HP (カラム体積 1 ml) (アマシャムバイオサイエンス社) にチャージし、PBS(-)で洗浄後20 mMクエン酸バッファー (pH2.7) により溶出し、200mMリン酸バッファー (pH7.0) を含むチューブに回収した。精製後の各抗体サンプルの凝集体の含有率を表5に示した。4D11-G3抗体は凝集体の含量が20%以上であるのに対して、定常領域のCH3領域をIgG1に変換したドメインスワップ変異抗体 (4D11-G[3311]、及び4D11-G[3331]) においては、凝集体の割合が非常に少なく、IgG1レベルまで改善することが見出された。

30

【表5】

精製抗体	凝集体 (%)
4D11-G1	1.4
4D11-G3	23.4
4D11-G[1133]	25.2
4D11-G[3311]	0.0
4D11-G[3313]	23.4
4D11-G[3331]	0.0

40

【0196】

50

実施例 1 4 IgG3とIgG1のドメインスワップ変異抗CD40抗体の低pH安定性の評価

4D11-G[3331]において抗体精製用アフィニティークラム精製後の凝集体の生成が顕著に抑制されることが示されたので、さらに低pH安定性を調べる目的で、実施例 1 3 の4D11-G[331]及び4D11-G[3311]ドメインスワップ変異抗体の精製抗体を用いて、実施例 4 に従って低pH処理後、実施例 3 に従って凝集体の含有率を測定した。

【0197】

その結果、4D11-G[3311]ドメインスワップ変異抗体は、低pH処理条件においても定常領域全体がIgG1である場合と比較して同等以上に安定であることが判明した（表6）。また、4D11-G[3331]についても60分間のインキュベーション処理においても3%以下の凝集体含量に抑えられており、低pHでの安定性が確認された。表6は、IgG3/IgG1ドメインスワップ変異抗体の低pHにおける安定性を示す。

【表6】

精製抗体	凝集体 (%)	
	10 分間*	60 分間*
4D11-G[3331]	0.85	2.51
4D11-G[3311]	0.00	0.72
4D11-G1	2.01	1.80

*低pHにおけるインキュベーション時間

【0198】

実施例 1 5 IgG3のCH3定常領域1アミノ酸変異体の作製

ドメインスワップ変異体を用いた解析結果から、ProteinGを用いたアフィニティークラム精製においてはIgG3の凝集形成に関与するのは、主にCH3であることが解ったため、CH3ドメイン内に存在するIgG1とIgG3間で異なるアミノ酸残基6箇所（KabatらによるEUインデックスにより示される356、358、392、397、422、435番目）に注目して、IgG3のアミノ酸残基からIgG1のアミノ酸残基に変換した各変異体（4D11-G3[E356D]（356番目のE残基をDへ変換、以下同様）、4D11-G3[M358L]、4D11-G3[N392K]、4D11-G3[M397V]、4D11-G3[I422V]、4D11-G3[R435H]）を作製した。

【0199】

IgG3[E356D]は、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag（配列番号9）E356D-r: CTTGGTCATCTCATCCCGGGATGGGGG（配列番号44）で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、抗体発現ベクターN5KG3を鋳型として、プライマーE356D: CCCCCATCCCGGGATGAGATGACCAAG（配列番号45）、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc（配列番号12）を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3-E356Dと名づけた。

【0200】

IgG3[M358L]は、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag（配列番号9）M358L-r: CTGGTTCTTGGTCAGCTCCTCCCGGGA（配列番号46）で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、抗体発現ベクターN5KG3を鋳型として、プライマーM358L: TCCCGGGAGGAGCTGACCAAGAACCAG（配列番号47）、linkH2: tgatcatcacg

tagatatcacggc（配列番号12）を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3-M358Lと名づけた。

【0201】

IgG3[N392K]は、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag（配列番号9）N392K-r: GGGAGGCGTGGTCTTGTAGTTGTTCTC（配列番号48）で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、抗体発現ベクターN5KG3を鋳型として、プライマーN392K: GAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC（配列番号49）、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc（配列番号12）を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3-N392Kと名づけた。

【0202】

IgG3[I422V]は、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag（配列番号9）I422V-r: GGAGCATGAGAAGACGTTCCCTGCTG（配列番号50）で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、抗体発現ベクターN5KG3を鋳型として、プライマーI422V: CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC（配列番号51）、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc（配列番号12）を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3-I422Vと名づけた。

【0203】

IgG3[R435H]は、N5KG3を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag（配列番号9）R435H: CCCGATCCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTCTGCGTGTAGTGGTTGTG（配列番号52）で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を30回行った。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。この発現ベクターをN5KG3-R435Hと名づけた。

【0204】

それぞれの発現ベクターをBglII、NheIで消化し、4D11の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を挿入し発現ベクターを完成させた。

【0205】

4D11-G3[M397V]については、実施例5に示したGeneEditor™ in vitro Site-Directed Mutagenesis System（プロメガ社）を用いた部位特異的変異導入法により、N5KG3-4D11のDNAを鋳型として変異DNAを調製した。変異導入用オリゴヌクレオチド（5'末端リン酸化済み）としては、M397V: CACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGAC（配列番号53）のオリゴヌクレオチドを用いた。部位特異的変異導入法により得られた変異抗体発現ベクターの候補プラスミドDNAについて、DNA塩基配列解析による選択を実施して、目的とするアミノ酸変異が導入された変異体の発現ベクターを取得した。この発現ベクターをN5KG3-M397Vと名づけた。

【0206】

実施例16 4D11-G3の変異体の凝集体形成抑制評価

IgG3のアミノ酸残基からIgG1のアミノ酸残基に変換した各変異体（4D11-G3[E356D]、4D11-G3[M358L]、4D11-G3[N392K]、4D11-G3[M397V]、4D11-G3[I422V]、4D11-G3[R435H]）について、各発現ベクターDNAを実施例2に従って発現を行い、得られた培養上清（IgGとして約500 μg）から、実施例13に従って精製を実施した。精製後の各抗体サンプルの凝集

体の含有率を表7に示した。表7に示すように、4D11-G[N392K]、及び4D11-G[M397V]においては、4D11-G3抗体、及び、他の1アミノ酸残基変異体の凝集体の含量が20%以上であるのに対して、10%前後と凝集体の割合が減少することが見出された。

【表7】

精製抗体	凝集体 (%)
4D11-G1	1.4
4D11-G3	24.7
4D11-G[3331]	0.0
4D11-G3[E356D]	23.6
4D11-G3[M358L]	23.4
4D11-G3[N392K]	12.4
4D11-G3[M397V]	7.2
4D11-G3[I422V]	27.7
4D11-G3[R435H]	25.1

10

【0207】

20

実施例17 4D11-G3の変異体の凝集体形成抑制評価(2)

実施例16に示したように、IgG3抗体の定常領域の1アミノ酸置換体を用いた検討から、凝集体の生成が一部分抑制される変異体(4D11-G3[N392K]及び4D11-G3[M397V])が見出せたので、更に凝集体形成抑制効果を高めることを目的に、この2箇所のアミノ酸変異をあわせ持つ変異体(4D11-G3[N392KM397V])を作製した。変異体発現ベクターの作製法は、実施例5のGeneEditorTM in vitro Site-Directed Mutagenesis System(プロメガ社)による部位特異的変異導入法に従って、変異導入用オリゴヌクレオチド(5'末端リン酸化済み)としては、N392KM397V:GGGCAGCCGG AGAACAAC TA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCC GA CGGCTCC(配列番号54)のオリゴヌクレオチドを用いた。得られた変異抗体発現ベクターの候補プラスミドDNAについてDNA塩基配列解析による選択を実施して、目的とするアミノ酸変異が導入された抗CD40抗体変異体の発現ベクターを取得した。抗CD40抗体の変異体蛋白を発現するプラスミドDNAをN5KG3-4D11-N392KM397Vと命名した。

30

【0208】

実施例18 4D11-G3の変異体の凝集体形成抑制評価(3)

実施例13及び実施例14において、IgG3重鎖のCH3ドメインをIgG1重鎖のCH3ドメインに、あるいはIgG3重鎖のCH2ドメインおよびCH3ドメインをIgG1重鎖のCH2ドメインおよびCH3ドメインに、置換することによって抗体の安定性を改善することができることが確認できたことから、更に凝集体形成抑制に寄与しているアミノ酸残基を絞り込むために、IgG3抗体のCH2ドメイン内に存在するIgG1とIgG3間で異なるアミノ酸残基の中で、さらに実施例6で示したIgG2の凝集体形成抑制に関与することが判明したアミノ酸残基2箇所(KabatらによるEUインデックスにより示される300、309番目)に注目して、4D11-G[3331]のアミノ酸残基からIgG1のアミノ酸残基に変換した各変異体を作製した。作製した変異体は、4D11-G[3331][F300Y](ドメインスワップ変異体4D11-G[3331]の300番目のアミノ酸残基であるFをYへ変換、以下同様)、4D11-G[3331][T339A]、4D11-G[3331][F300YT339A](300番目のFをY、及び339番目のTをAへ変換)の3種類である。変異体発現ベクターの作製法は、4D11-G[3331][F300YT339A]の場合に2種類のオリゴヌクレオチドを同時に鋳型となるベクターDNAにアニーリングさせた以外は、実施例5のGeneEditorTM in vitro Site-Directed Mutagenesis System(プロメガ社)による部位特異的変異導入法に従って実施した。

40

50

変異導入用オリゴヌクレオチドとしては、4D11-G[3331][F300Y]作製にはG3_F300Y：CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC（配列番号 5 5）を、4D11-G[3331][T339A]作製にはG3_ T339A：GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGACAGCC C（配列番号 5 6）を、341-G2Ser[V309L/T339A]作製にはG3_F300Y及びG3_ T339Aを使用した。実施例 5 で示した部位特異的変異導入法を行い、得られた各変異抗体発現ベクターの候補プラスミドDNAについてDNA塩基配列解析による選択を実施して、目的とするアミノ酸変異が導入された 3 種類の抗CD40抗体変異体の発現ベクターを取得した。それら抗CD40抗体の変異体蛋白を発現するプラスミドDNAをN5KG[3331]-4D11-F300Y、N5KG[3331]-4D11-T339A、N5KG[3331]-4D11-F300YT339Aと命名した。

【0209】

10

実施例 19 アミノ酸置換変異体抗体の発現・精製、及び精製品の凝集体含有率の測定

実施例 17 及び 18 で作製した発現ベクターDNAを実施例 2 に従って発現を行い、得られた培養上清（IgGとして約300 µg）から、実施例 13 で示した抗体精製用アフニティークラムであるHiTrap rProtein G HPによる精製を実施した。精製後の各抗体サンプルの凝集体の含有率を表 8 に示した。4D11-G3抗体は凝集体の含量が30%程度であるのに対して、いずれの変異体とも凝集体は検出されなかった。

【表 8】

精製抗体	凝集体（%）
4D11-G3	29.7
4D11-G3[N392KM397V]	0.0
4D11-G[3331][F300Y]	0.0
4D11-G[3331][T339A]	0.0
4D11-G[3331][F300YT339A]	0.0

20

【0210】

30

実施例 20 アミノ酸置換変異体抗体の低pH安定性の評価

4D11-G[3331]にCH2ドメイン内にアミノ酸置換を加えた変異体 3 種類について、低pH安定性を確認した。実施例 19 の精製抗体を用いて、実施例 4 に従って低pH処理後、実施例 3 に従って凝集体の含有率を測定した。

【0211】

その結果、4D11-G[3331]のアミノ酸置換体は、精製後の凝集体精製が抑制されるだけでなく、低pH処理条件においても凝集体の生成が抑制されており、安定性が改善されることが確認された。表 9 は、IgG3/IgG1ドメインスワップ変異抗体の低pHにおける安定性を示す。

40

【表 9】

精製抗体	凝集体 (%)	
	10 分間*	60 分間*
4D11-G[3311]	0.00	0.00
4D11-G[3331][F300Y]	0.00	0.00
4D11-G[3331][T339A]	0.00	1.78
4D11-G[3331][F300YT339A]	0.00	0.00

*低 pH におけるインキュベーション時間

10

【0 2 1 2】

実施例 2 1 IgG3 の定常領域アミノ酸変異体の作製

IgG3 と IgG1 のドメインスワップ変異抗体と各種アミノ酸変異体の安定性改善に関する解析結果を総合的に考慮して、IgG3 抗体の安定性を最も改善できる抗体として 4D11-G3 [N392KM397V][R435H]、及び 4D11-G3 [F300Y][N392KM397V][R435H] を作製し、その評価を行なった。4D11-G3 [N392KM397V][R435H] は、IgG3 抗体の 392 番目のアミノ酸残基である N を K に、397 番目のアミノ酸残基である M を V に、そして 435 番目のアミノ酸残基である R を H に変換した 3 アミノ酸残基の変異体である。また、4D11-G3 [F300Y][N392KM397V][R435H] は、4D11-G3 [N392KM397V][R435H] に加えて、更に 300 番目のアミノ酸残基の F を Y に変換した 4 アミノ酸残基変異体である。ただし、両変異体とも R435H のアミノ酸残基の変異は、抗体蛋白質の ProteinA による精製を可能とするために導入した (Ito S et. al., Exp Clin Immunogenet. 1990, 7(2):91-100.)。変異体発現ベクターの作製法は、実施例 1 2 に示した N5KG3-R435H 発現ベクター DNA を鋳型とした以外は、実施例 5 の GeneEditor™ in vitro Site-Directed Mutagenesis System (プロメガ社) による部位特異的変異導入法に従って実施した。変異導入用オリゴヌクレオチドとしては、4D11-G3 [N392KM397V][R435H] 作製には N392KM397V : GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCC (配列番号 5 7) を、4D11-G3 [F300Y][N392KM397V][R435H] 作製には G3_F300Y : CAGTACAACA GC ACGTACCG TGTGGTCAGC (配列番号 5 8) 及び N392KM397V の複数のオリゴヌクレオチドを同時に鋳型となるベクター DNA にアニーリングさせた。実施例 5 で示した部位特異的変異導入法を行い、得られた各変異抗体発現ベクターの候補プラスミド DNA について DNA 塩基配列解析による選択を実施して、目的とするアミノ酸変異が導入された 2 種類の抗 CD40 抗体変異体の発現ベクターを取得した。それら抗 CD40 抗体の変異体蛋白を発現するプラスミド DNA を N5KG3-4D11-[N392KM397V][R435H]、N5KG3-4D11-[F300Y][N392KM397V][R435H]、と命名した。

20

30

【0 2 1 3】

4D11-G3 [F300Y][N392KM397V][R435H] の重鎖をコードする塩基配列並びに重鎖のアミノ酸配列を以下に示す。

40

【0 2 1 4】

4D11-G3 [F300Y][N392KM397V][R435H] 重鎖塩基配列 (配列番号 : 5 9)

ATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCAGATGGGTCCTGTCCCA
GCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGCGGCT
CCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTAT
AAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGAGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGACCTGTAGTACGATATTTTGGGTGGT
TCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCC

50

TGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC
GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA
GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGTTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAGAGTTGAGCTCAAAACCCCACTTGGTGACACAACTCACACATGCCCACGGTGCCCAGAGCCCAATCTTG
TGACACACCTCCCCCGTGCCACGGTGCCCAGAGCCCAATCTTGACACACCTCCCCATGCCCACGGTGCCCAGAGC
CCAAATCTTGACACACCTCCCCGTGCCAAGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGATACCTTATGATTTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
CCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCTGCGGGAGGAGCAGTACA
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGACAGCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

配列番号 59 における、シグナル配列と可変領域の境界は 78 番目のシトシン(C)と 79 番目のシトシン(C)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0215】

20

4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H] 重鎖アミノ酸配列（配列番号：60）
MDLMCKMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLPSETLSLTCTVSGGSISSPGYGGWIRQPPGKLEWIGSIY
KSGSTYHNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRVYFGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP
CSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTK
VDRKVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKLREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 60 における、シグナル配列と可変領域の境界は 26 番目のセリン(S)と 27 番目のグルタミン(Q)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0216】

30

4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H]の軽鎖をコードする塩基配列並びに重鎖のアミノ酸配列を以下に示す。

【0217】

4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H] 軽鎖塩基配列（配列番号：61）
ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGAC
CCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTG
CTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAATTTGGAAAGTGGGGTC
CCATCAAGGTTACAGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGAAC
TTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGACGTTCCGGCCAAAGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCAC
CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCA
GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

40

配列番号 61 における、シグナル配列と可変領域の境界は 66 番目のチミン(T)と 67

50

番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0218】

4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H] 軽鎖アミノ酸配列（配列番号：62）
MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGV
PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号62における、シグナル配列と可変領域の境界は22番目のシステイン(C)と23番目のアラニン(A)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver.2）を使用）。

【0219】

実施例22 4D11-G3 [N392KM397V][R435H]、及び4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H]抗体の精製品の凝集体形成抑制評価

4D11-G3 [N392KM397V][R435H]、及び4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H]について、発現ベクターDNAを実施例2に従って発現を行い、得られた培養上清（IgGとして約400μg）から、実施例2に示した方法でHiTrap rProtein A FFを用いて精製を行なった。精製後の各抗体サンプルの凝集体の含有率を表10に示した。実施例10や実施例13に示したように、4D11-G3抗体の凝集体の含量が20%以上であるのに対して、これら変異体においては、IgG1抗体並に凝集体の割合が1%以下に減少し、大幅に凝集体の生成が抑制されることが見出された。

【表10】

精製抗体	凝集体 (%)
4D11-G1	0.84
4D11-G[3311]	0.00
4D11-G[3331]	0.30
4D11-G3 [N392KM397V][R435H]	0.00
4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H]	0.44

【0220】

実施例23 4D11-G3 [N392KM397V][R435H]、及び4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H]抗体の低pH安定性の評価

4D11-G3 [N392KM397V][R435H]、及び4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H]抗体について、低pH安定性を確認した。実施例15の精製抗体を用いて、実施例4に従って低pH処理後、実施例3に従って凝集体の含有率を測定した。

【0221】

その結果、これらのアミノ酸置換体は、精製後の凝集体生成が抑制されるだけでなく、低pH処理条件においても凝集体の生成が抑制されており、安定性が改善されることが確認された。表11は、IgG3/IgG1ドメインスワップ変異抗体の低pHにおける安定性を示す。

【表 1 1】

精製抗体	凝集体 (%)	
	10 分間*	60 分間*
4D11-G1	0.13	0.00
4D11-G[3311]	0.00	0.00
4D11-G[3331]	0.79	3.79
4D11-G3 [N392KM397V][R435H]	0.00	1.50
4D11-G3[F300Y][N392KM397V][R435H]	0.00	0.00

*低 pH におけるインキュベーション時間

10

【0 2 2 2】

実施例 2 4 抗CD40抗体のRamos細胞に対する結合活性

実施例 1 2 および 1 3 で作製したドメインスワップ変異抗体および 1 アミノ酸置換変異体抗体が、もとの抗体と同等の結合活性を示すかどうか調べるために、CD40が発現するRamos[ATCC]細胞への結合活性を測定した。

20

【0 2 2 3】

2×10^6 /ml の濃度で Ramos 細胞株を 0.1%NaN₃、2%FCS 含有 PBS の染色バッファー (SB) に浮遊させた。細胞浮遊液 (100 μ l / ウェル) を 96-well 丸底プレート (ベクトンディッキンソン社製) に分注した。各々のハイブリドーマの培養上清 (50 μ l) を加え、氷温下 30 分間インキュベートした。陰性コントロールとしてヒト血清アルブミンに対するヒト IgG1 抗体を用い、ハイブリドーマ培養培地で 2 μ g/ml の濃度に調製し、50 μ l 添加後氷温下 15 分間インキュベートした。SB で洗浄した後、250 倍希釈した R-PE 蛍光標識抗ヒト抗体 (Southern Biotechnology 社製) 50 μ l を加え、氷温下 15 分間インキュベートした。SB で 2 回洗浄した後、300~500 μ l の FACS 緩衝液に懸濁し、FACS (FACSort、FACScan、ベクトンディッキンソン社製) で各細胞の蛍光強度を測定した。

30

【0 2 2 4】

その結果、ドメインスワップ変異抗体および変異体抗体で結合性は変化無かった (図 3)。図 3 中、縦軸の抗体結合量の単位は平均蛍光強度である。isotype control の値は 5.01 である。

【0 2 2 5】

実施例 2 5 Ramos 細胞における抗 CD40 抗体による CD95 発現抑制

4D11 および KM281-1-10 はアンタゴニスト抗体として知られている。抗体の持つアンタゴニスト活性が、定常領域の構造変化による影響を調べた。Ramos 細胞は、CD40 リガンドを添加することにより、CD95 の発現上昇が観察される。このとき、抗体を添加することにより、CD95 の発現上昇が抑制できるかどうかを指標に、抗体のアンタゴニスト活性を評価した。

40

【0 2 2 6】

1.0×10^6 個/ml の Ramos 細胞懸濁液を 96 ウェルプレートに 50 μ l / well で播種した。培養上清又は精製抗体を 2 μ g/ml に培地で調整し、96 ウェルプレートに 100 μ l / well 添加した。可溶性 CD40 リガンド (ALEXIS CORPORATION) を 4 μ g/ml と抗 FLAG 抗体 (M2、シグマ) 4 μ g/ml とを培地に添加し、96 ウェルプレートに 50 μ l / well 添加した。一晚培養後、細胞を集め R-PE 標識抗 CD95 抗体 (Pharmingen NJ) を用い、FACS を使って解析した。

【0 2 2 7】

50

その結果、定常領域の構造変化によって、抗体のアンタゴニスト活性に変化は見られなかった（図4）。図4中、縦軸のCD95発現量の単位は平均蛍光強度である。isotype controlおよびCD40(-)の値は、それぞれ27.17および6.59である。

【0228】

ヒトIgG3重鎖定常領域には多型が存在し、以下がコンセンサス配列である。本発明の変異を下記コンセンサス配列（配列番号63）に適用した重鎖定常領域を有する抗体も本発明に含まれる。下記配列中、例えば下線を付した300番目のF、399番目のT、392番目のN、397番目のMおよび435番目のRを変異させることにより、本発明の安定化抗体を得ることができる。

【0229】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNRF^TQKSLSLSPGK

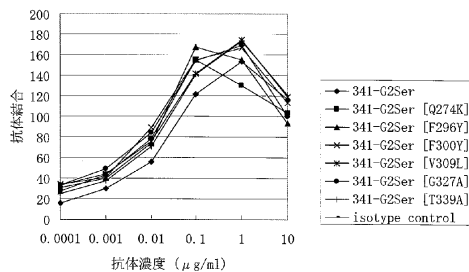
本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【配列表フリーテキスト】

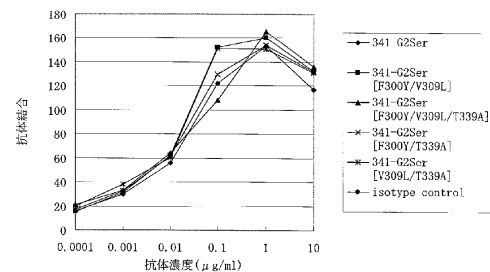
【0230】

配列番号9～14、23～29および42～58 プライマー

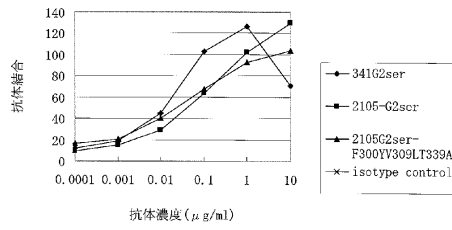
【図1A】



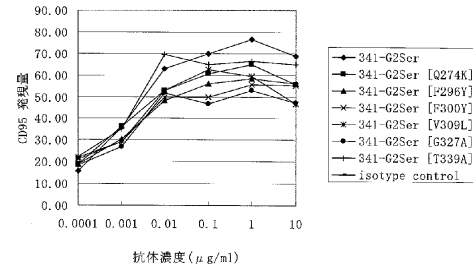
【図1B】



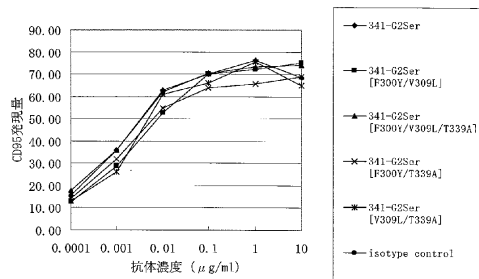
【図 1 C】



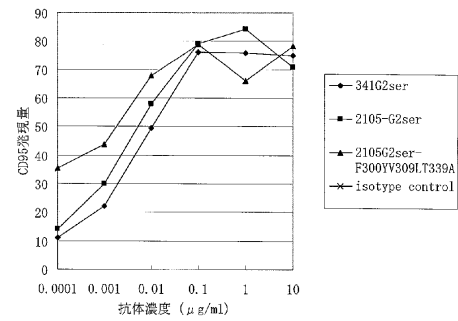
【図 2 A】



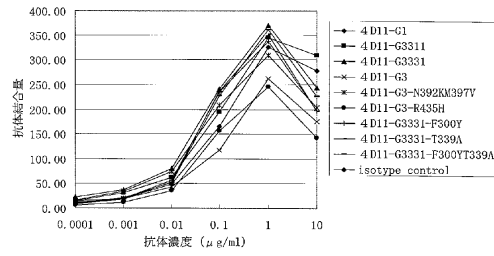
【図 2 B】



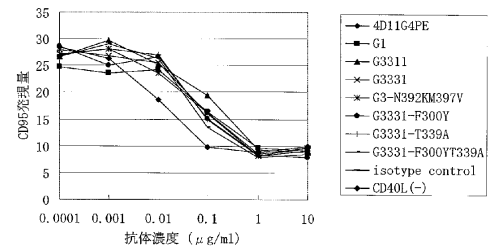
【図 2 C】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0004986633000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(72)発明者 吉田 英明
群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0191265 (US, A1)
国際公開第02/088186 (WO, A1)
国際公開第2005/063981 (WO, A1)
PNAS, 1991年, Vol.88, pp.9036-9040
The Journal of Biological Chemistry, 1993年, Vol.268, No.33, pp.25124-25131
J. Exp. Med., 1993年, pp.661-667
The Journal of Immunology, 2000年, Vol.164, pp.4178-4184

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)