

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-107018

(P2019-107018A)

(43) 公開日 令和1年7月4日(2019.7.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-36646 (P2019-36646)	(71) 出願人	517031177
(22) 出願日	平成31年2月28日 (2019.2.28)		アケソ・バイオフーマ・インコーポレイ
(62) 分割の表示	特願2017-525666 (P2017-525666)		テッド
原出願日	平成27年7月31日 (2015.7.31)		中華人民共和国、528437・ガンドン
(31) 優先権主張番号	201410377352.9		、ゾンシャン、トーチ・ディベロップメン
(32) 優先日	平成26年8月1日 (2014.8.1)		タル・ゾーン、シェンノン・ブルバード
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		・ 6
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100114188
1. T W E E N		弁理士	小野 誠
		(74) 代理人	100119253
		弁理士	金山 賢敦
		(74) 代理人	100124855
		弁理士	坪倉 道明
		(74) 代理人	100129713
		弁理士	重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 C T L A 4 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片、医薬組成物および使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】腫瘍処置および分子免疫学の分野で用いるモノクローナル抗体であって、C T L A 4 が B 7 に結合するのを阻止し、それにより、宿主における C T L A 4 の免疫抑制効果を排除し、T リンパ球を活性化するモノクローナル抗体の提供。

【解決手段】特定のアミノ酸配列を含む H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、ならびに／または、特定のアミノ酸配列を含む L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、から選択される C D R を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって：

- a. 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む H C D R 1、
- b. 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む H C D R 2 および
- c. 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む H C D R 3、

および／または

- d. 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む L C D R 1、
- e. 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む L C D R 2 および

f. 配列番号 32、配列番号 33 および配列番号 34 から選択されるアミノ酸配列を含む L C D R 3

から選択される相補性決定領域（C D R）を含む、

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

前記モノクローナル抗体の重鎖可変領域（V H）のアミノ酸配列が、配列番号 6、配列番号 10、配列番号 14 および配列番号 18 から選択され；

および／または

前記モノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V L）のアミノ酸配列が、配列番号 8、配列番号 12、配列番号 16、配列番号 20、配列番号 22 および配列番号 24 から選択される、

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

請求項 3 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

前記モノクローナル抗体が、

- （1）配列番号 6 で規定される V H および配列番号 8 で規定される V L ；
- （2）配列番号 10 で規定される V H および配列番号 12 で規定される V L ；
- （3）配列番号 14 で規定される V H および配列番号 16 で規定される V L ；
- （4）配列番号 18 で規定される V H および配列番号 20 で規定される V L ；
- （5）配列番号 14 で規定される V H および配列番号 22 で規定される V L ；または
- （6）配列番号 14 で規定される V H および配列番号 24 で規定される V L

を含み、

具体的には、配列番号 6、配列番号 10 および配列番号 14 の位置 18 のメチオニンが、ロイシン、バリン、イソロイシンまたはアラニンから選択されるアミノ酸で独立して置換される、

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

F a b、F a b'、F（a b'）₂、F d、F v、d A b、相補性決定領域断片、1 本鎖抗体（例えば s c F v）、ヒト化抗体、キメラ抗体およびダイアボディから選択される、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片から選択される、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記モノクローナル抗体が、約 10^{-5} M 未満、例えば約 10^{-6} M 未満、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M または 10^{-10} M 以下の K_D で C T L A 4 タンパク質と結合する、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記モノクローナル抗体が非 C D R 領域を含み、前記非 C D R 領域が、マウス以外の種、例えばヒトの抗体由来である、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

単離核酸分子であって、
抗体の重鎖可変領域をコードすることが可能な核酸配列を含み、
前記抗体の重鎖可変領域が、配列番号 27 から 29 のアミノ酸配列を有する CDR を含み；

具体的に、前記抗体の重鎖可変領域が、配列番号 6、配列番号 10、配列番号 14 または配列番号 18 で規定されるようなアミノ酸配列を有し；

より具体的には、前記核酸分子が、配列番号 5、配列番号 9、配列番号 13 または配列番号 17 で規定されるようなヌクレオチド配列を有する、

単離核酸分子。

10

【請求項 8】

抗体の軽鎖可変領域をコードすることが可能な核酸配列を含む単離核酸分子であって、
前記抗体の軽鎖可変領域が、

1) 配列番号 30 から 32 のアミノ酸配列を有する CDR；

2) 配列番号 30、配列番号 31 および配列番号 33 のアミノ酸配列を有する CDR；

3) 配列番号 30、配列番号 31 および配列番号 34 のアミノ酸配列を有する CDR；

を含み、

具体的に、前記抗体の軽鎖可変領域が、配列番号 8、配列番号 12、配列番号 16、配列番号 20、配列番号 22 または配列番号 24 で規定されるようなアミノ酸配列を有し；

より具体的には、前記核酸分子が、配列番号 7、配列番号 11、配列番号 15、配列番号 19、配列番号 21 または配列番号 23 で規定されるようなヌクレオチド配列を有する、

20

単離核酸分子。

【請求項 9】

請求項 7 および／または請求項 8 に記載の単離核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 10】

請求項 7 および／または請求項 8 に記載の単離核酸分子または請求項 9 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を調製する方法であって、請求項 10 に記載の宿主細胞を適切な条件下で培養し、前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を細胞培養物から回収する段階を含む、方法。

30

【請求項 12】

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片および複合部分を含む複合物であって、前記モノクローナル抗体が、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であり、前記複合部分が検出可能な標識であり；具体的には前記複合部分が放射性同位体、蛍光物質、発光性物質、発色物質または酵素である、複合物。

【請求項 13】

請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または請求項 12 に記載の複合物を含むキットであって；

40

具体的に、前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を特異的に認識する二次抗体をさらに含み；前記二次抗体が、検出可能な標識、例えば放射性同位体、蛍光物質、発光性物質、発色物質または酵素をさらに含んでもよい、

キット。

【請求項 14】

試料中の CTLA 4 の存在またはそのレベルを検出することにおける使用のためのキットの調製における、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の使用。

【請求項 15】

請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片ま

50

たは請求項 1 2 に記載の複合物を含む医薬組成物であって、医薬的に許容可能な担体および／または賦形剤をさらに含んでもよい、医薬組成物。

【請求項 1 6】

腫瘍の、予防および／または処置および／または補助療法および／または診断での使用のための薬剤の調製における、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または請求項 1 2 に記載の複合物の使用であって；具体的に、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍／腎腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結直腸癌、消化管の癌および肝臓癌／肝癌から選択される、使用。

【請求項 1 7】

次の薬剤：

試料（s a m p l）中で C T L A 4 のレベルを検出する薬剤、
B 7 への C T L A 4 の結合を阻止する薬剤、
C T L A 4 の活性または C T L A 4 のレベルを制御（例えば下方制御）する薬剤、
C T L A 4 による身体における免疫抑制を緩和する薬剤、
T リンパ球を活性化する薬剤、または
T リンパ球における I L - 2 の発現を増加させる薬剤
の調製における、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または請求項 1 2 に記載の複合物の使用。

【請求項 1 8】

有効量の、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または請求項 1 2 に記載の複合物を細胞に投与する段階を含む、インビボまたはインビトロの方法であって、

試料中の C T L A 4 のレベルを検出する方法、
B 7 への C T L A 4 の結合を阻止する方法、
C T L A 4 の活性または C T L A 4 のレベルを制御（下方制御）する方法、
C T L A 4 による身体における免疫抑制を緩和する方法、
T リンパ球を活性化する方法、または
T リンパ球における I L - 2 の発現を増加させる方法
から選択される、インビボまたはインビトロの方法。

【請求項 1 9】

有効量の、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または請求項 1 2 に記載のモノクローナル抗体複合物を投与する段階を含む、腫瘍の、予防および／または処置および／または補助療法および／または診断の方法であって；具体的に、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍／腎腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結直腸癌、消化管の癌および肝臓癌／肝癌から選択される、方法。

【請求項 2 0】

腫瘍の、予防および／または処置および／または補助療法および／または診断での使用のための、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって；具体的に、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍／腎腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結直腸癌、消化管の癌および肝臓癌／肝癌から選択される、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 1】

B 7 への C T L A 4 の結合を阻止すること、
C T L A 4 の活性または C T L A 4 のレベルを制御（例えば下方制御）すること、
C T L A 4 による身体における免疫抑制を緩和すること、または
T リンパ球を活性化するかもしくは T リンパ球における I L - 2 の発現を増加させる薬剤

における使用のための、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、腫瘍治療および分子免疫学の分野に属する。本発明は、抗CTLA4モノクローナル抗体またはその抗原結合断片、それらの医薬組成物、それらのコード配列および前記のものを使用した、診断、予防、治療および／または補助療法の方法およびそれらにおける使用に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞傷害性Tリンパ球結合抗原4（CTLA4と略される。）は、遺伝子構造、染色体位置、配列相同性および遺伝子発現においてCD28分子と非常に密接な関係を有する。これらは両者とも、活性化T細胞の表面上で主に発現される同時刺激性分子B7に対する受容体である。しかし、リンパ球活性化の同時刺激シグナルとして、CTLA4は、CD28とは反対の機能を有する。B7への結合後、CTLA4は、マウスおよびヒトT細胞の活性化を阻害し得、T細胞の活性化における負の制御の役割を果たす。

【0003】

CTLA4 mAbまたはCTLA4リガンドは、CTLA4がそのネイティブリガンドに結合するのを防ぎ得、それによってCTLA4によるT細胞負制御シグナルの伝達を阻止し、様々な抗原へのT細胞の応答性を促進する。この点において、インビボおよびインビトロ実験からの結果は、実質的に呼応している。現在のところ、いくつかのCTLA4 mAb（10D1、11.2.2）が、前立腺癌、膀胱癌、結直腸癌、消化管の癌、肝臓癌、悪性メラノーマなどを処置することについて、臨床試験で試験されている（CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Grosso JF., Jure-Kunkel MN., Cancer Immun. 2013; 13:5. Epub 2013 Jan 22; 米国特許第6984720号明細書; および米国特許第6682736号明細書）。とりわけ、10D1および11.2.2は、最良の効果を有する抗CTLA4モノクローナル抗体とみなされる。

【0004】

インターロイキン2（IL-2）はT細胞により産生される。これはT細胞のサブグループを制御する増殖因子（factor）である。これは、免疫反応を調整する重要な因子でもある。これは、B細胞の増殖を促進し、活性化し得、抗体反応、血球新生および腫瘍監視に関連する。組み換えヒトIL-2は、悪性腫瘍（メラノーマ、腎臓腫瘍などを含む。）の処置について米国FDAにより承認されている。これは、慢性ウイルス感染を処置する臨床試験中でもある（Pharmacologic administration of interleukin-2. Chavez, A. R. ら、Ann N Y Acad Sci, 2009. 1182:14-27）。

【0005】

T細胞の機能に影響を及ぼす重要な因子として、CTLA4およびCTLA4 mAbは、身体中の免疫微小環境に干渉することによって疾患において特定の治療効果を生み出し得る。これらは、高い効力を有し、従来の投薬の欠陥を修正し、遺伝子治療の新規経路を開く。CTLA4およびCTLA4 mAbは、実験および臨床試験の様々なステージで試験されている。例えば、自己免疫疾患において、これらは、喘息の動物モデルにおいて気道過敏症を効果的に抑制し、リウマチ疾患の発症を防ぎ、身体において同種移植片への免疫寛容に介在するなどした。一方で、生物学的遺伝子治療は短期臨床試験で悪影響が全く示されなかったものの、長期適用後の潜在的影響に注意を払うべきである。例えば、CTLA4 mAbによるCTLA4-B7シグナル伝達の過剰な阻止の結果、自己免疫疾患を発症し得る。抗体はそれらのリガンドに特異的に結合し、標的細胞の溶解を誘導するか、または病態の進行を阻止し得るので、抗体、特にヒト化抗体に基づく薬物の開発および利用は、ヒトにおける悪性腫瘍および他の免疫疾患の臨床処置において重要な意義を有する。

【0006】

現在、B7へのCTLA4の結合を阻止する新規抗体およびそれらのヒト化抗体を開発する必要がなお存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許第6984720号明細書

【特許文献2】米国特許第6682736号明細書

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Grosso JF., Jure-Kunkel MN., Cancer Immun. 2013;13:5. Epub 2013 Jan 22 10

【非特許文献2】Chavez, A. R. ら、Ann N Y Acad Sci, 2009. 1182:14-27

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

発明者らによる集中的な研究および独創的な取り組みの後、哺乳動物細胞発現系を用いて組み換えCTLA4を発現させ、免疫マウスへの抗原として使用した。マウス脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させることによりハイブリドーマ細胞を得た。発明者らによる非常に多くの試料のスクリーニング後、CTLA4に特異的に結合し、B7へのCTLA4の結合を非常に効率的に阻止し得る特異的なモノクローナル抗体を分泌し、産生することが可能なハイブリドーマ細胞株を得た。さらに、ヒト化抗体を作製した。したがって、次の発明を提供する。 20

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明のある態様は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片に関し、ここで、本モノクローナル抗体は、
配列番号27のアミノ酸配列を含むHCDR1、
配列番号28のアミノ酸配列を含むHCDR2および
配列番号29のアミノ酸配列を含むHCDR3、 30
および／または
配列番号30のアミノ酸配列を含むLCDR1、
配列番号31のアミノ酸配列を含むLCDR2および
配列番号32、配列番号33および配列番号34から選択されるアミノ酸配列を含むLCDR3
から選択される相補性決定領域(CDR)を含む。

【0011】

本発明の実施形態の何れか1つによる、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

本モノクローナル抗体の重鎖可変領域(VH)のアミノ酸配列は、配列番号6、配列番号10、配列番号14および配列番号18から選択され； 40

および／または

本モノクローナル抗体の軽鎖可変領域(VL)のアミノ酸配列は、配列番号8、配列番号12、配列番号16、配列番号20、配列番号22および配列番号24から選択されるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【0012】

本発明の実施形態の何れか1つによる、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、本モノクローナル抗体は、

(1) 配列番号6で規定されるVHおよび配列番号8で規定されるVL；

(2) 配列番号10で規定されるVHおよび配列番号12で規定されるVL； 50

- (3) 配列番号14で規定されるVHおよび配列番号16で規定されるVL；
(4) 配列番号18で規定されるVHおよび配列番号20で規定されるVL；
(5) 配列番号14で規定されるVHおよび配列番号22で規定されるVL；または
(6) 配列番号14で規定されるVHおよび配列番号24で規定されるVL
を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【0013】

本発明において、上記の群(1)から(6)は、それぞれ8D2/8D2(Re)、8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0014】

具体的に、配列番号6、配列番号10および配列番号14の位置18のメチオニン(Met)は、独立に、ロイシン(Leu)、バリン(Val)、イソロイシン(Ile)またはアラニン(Ala)から選択されるアミノ酸で置換される。

【0015】

抗体、特にモノクローナル抗体(MAB)に基づく治療薬は、一部の疾患の処置において優れた効能を達成した。このような治療用抗体を得るための従来法は、抗原で動物に免疫付与し、免疫付与動物からの抗原に対する抗体を得ること、または親和性成熟によって抗原に対する親和性が低い抗体を改善することである。しかし、このような方法は、時間がかかり、労力を要し、抗原上の特異的なエピトープを標的とすることができないことが多い。

【0016】

抗原結合は、軽鎖および重鎖の可変領域に依存し；各鎖の可変領域は、相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる3個の超可変領域を含む(重鎖(H)はHCDR1、HCDR2およびHCDR3、軽鎖(L)はLCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み；定義については、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition(1991), Vol. 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Mdを参照のこと。)。

【0017】

当業者にとって周知の技術的手段によって、例えばVBASE2データベース分析によって、上記実施形態(1)から(6)のモノクローナル抗体配列におけるCDRのアミノ酸配列を分析した。結果を以下で提供する。

【0018】

- (1) 重鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

HCDR1：GFTFSDNW (配列番号27)、
HCDR2：IRNKPYNYET (配列番号28)、
HCDR3：TAQFAY (配列番号29)。

【0019】

- 軽鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

LCDR1：ENIYGG (配列番号30)、
LCDR2：GAT (配列番号31)、
LCDR3：QNVLRSPFT (配列番号32)。

【0020】

- (2) 重鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

HCDR1：GFTFSDNW (配列番号27)、
HCDR2：IRNKPYNYET (配列番号28)、
HCDR3：TAQFAY (配列番号29)。

【0021】

- 軽鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

LCDR1：ENIYGG (配列番号30)、

L C D R 2 : G A T (配列番号 3 1)、
L C D R 3 : Q N V L R S P F T (配列番号 3 2)。

【0022】

(3) 重鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

H C D R 1 : G F T F S D N W (配列番号 2 7)、
H C D R 2 : I R N K P Y N Y E T (配列番号 2 8)、
H C D R 3 : T A Q F A Y (配列番号 2 9)。

【0023】

軽鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

L C D R 1 : E N I Y G G (配列番号 3 0)、
L C D R 2 : G A T (配列番号 3 1)、
L C D R 3 : Q N V L R S P F T (配列番号 3 2)。

10

【0024】

(4) 重鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

H C D R 1 : G F T F S D N W (配列番号 2 7)、
H C D R 2 : I R N K P Y N Y E T (配列番号 2 8)、
H C D R 3 : T A Q F A Y (配列番号 2 9)。

【0025】

軽鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

L C D R 1 : E N I Y G G (配列番号 3 0)、
L C D R 2 : G A T (配列番号 3 1)、
L C D R 3 : Q N V L R S P F T (配列番号 3 2)。

20

【0026】

(5) 重鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

H C D R 1 : G F T F S D N W (配列番号 2 7)、
H C D R 2 : I R N K P Y N Y E T (配列番号 2 8)、
H C D R 3 : T A Q F A Y (配列番号 2 9)。

【0027】

軽鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

L C D R 1 : E N I Y G G (配列番号 3 0)、
L C D R 2 : G A T (配列番号 3 1)、
L C D R 3 : Q N V L S R H P G (配列番号 3 3)。

30

【0028】

(6) 重鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

H C D R 1 : G F T F S D N W (配列番号 2 7)、
H C D R 2 : I R N K P Y N Y E T (配列番号 2 8)、
H C D R 3 : T A Q F A Y (配列番号 2 9)。

【0029】

軽鎖可変領域の3個のCDRのアミノ酸配列を以下で示す：

L C D R 1 : E N I Y G G (配列番号 3 0)、
L C D R 2 : G A T (配列番号 3 1)、
L C D R 3 : Q N V L S S R P G (配列番号 3 4)。

40

【0030】

本発明の実施形態の何れか1つによる、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、本モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F v、d A b、相補性決定領域断片、1本鎖抗体（例えばs c F v）、ヒト化抗体、キメラ抗体またはダイアボディから選択されるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【0031】

本発明の実施形態の何れか1つによる、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片で

50

あって、本モノクローナル抗体は、約 10^{-5} M 未満、例えば約 10^{-6} M 未満、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M または 10^{-10} M 以下の K_D で C T L A 4 タンパク質と結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【0032】

本発明の実施形態の何れか 1 つによる、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、本モノクローナル抗体は、非 C D R 領域を含み、この非 C D R 領域は、マウス以外の種、例えばヒトの抗体由来であるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【0033】

本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、C T L A 4 に特異的に結合し得る、抗 C T L A 4 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片である。

10

【0034】

腫瘍の、予防および／または治療および／または補助療法および／または診断での使用のための、本発明の実施形態の何れか 1 つによる、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片；具体的には、この腫瘍は、メラノーマ、腎臓腫瘍／腎腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結直腸癌、消化管の癌および肝臓癌／肝癌から選択される。

【0035】

B 7 への C T L A 4 の結合を阻止すること、
C T L A 4 の活性または C T L A 4 のレベルを制御（例えば下方制御）すること、
C T L A 4 による身体における免疫抑制を緩和すること、または
T リンパ球を活性化するかもしくは T リンパ球における I L - 2 の発現を増加させる薬
剤

20

における使用のための、本発明の実施形態の何れか 1 つによるモノクローナル抗体。

【0036】

本発明の別の態様は、単離核酸分子に関し、この単離核酸分子は、抗体の重鎖可変領域をコードすることが可能な核酸配列を含み、

抗体の重鎖可変領域は、配列番号 27 から 29 のアミノ酸配列を有する C D R を含み；

具体的に、本抗体の重鎖可変領域は、配列番号 6、配列番号 10、配列番号 14 または配列番号 18 で規定されるようなアミノ酸配列を有し；

より具体的には、本核酸分子は、配列番号 5、配列番号 9、配列番号 13 または配列番号 17 で規定されるようなヌクレオチド配列を有する。

30

【0037】

本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする単離核酸分子をさらに提供する。このような核酸分子は、ハイブリドーマ細胞から単離され得るか、または遺伝子操作の組み換え技術もしくは化学合成法の方法を通じて得ることができる。

【0038】

本発明のさらなる態様は、単離核酸分子に関し、この単離核酸分子は、抗体の軽鎖可変領域をコードすることが可能な核酸配列を含み、

本抗体の軽鎖可変領域は、

1) 配列番号 30 から 32 のアミノ酸配列を有する C D R ；

40

2) 配列番号 30、配列番号 31 および配列番号 33 のアミノ酸配列を有する C D R ；
または

3) 配列番号 30、配列番号 31 および配列番号 34 のアミノ酸配列を有する C D R ；
を含み、

具体的に、本抗体の軽鎖可変領域は、配列番号 8、配列番号 12、配列番号 16、配列番号 20、配列番号 22 または配列番号 24 で規定されるようなアミノ酸配列を有し；

より具体的には、本核酸分子は、配列番号配列番号 7、配列番号 11、配列番号 15、配列番号 19、配列番号 21 または配列番号 23 で規定されるようなヌクレオチド配列を有する。

【0039】

50

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによる単離核酸分子を含むベクターに関する。本発明のベクターは、クローニングベクターまたは発現ベクターであり得る。好ましい実施形態において、本発明のベクターは、例えばプラスミド、コスミド、バクテリオファージ、コエミド (c o e m i d) などである。

【0040】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つの単離核酸分子または本発明によるベクターを含む宿主細胞に関する。このような宿主細胞としては、原核細胞、例えばE. コリ (E. c o l i) 細胞など、および真核細胞、例えば酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞および動物細胞 (例えば、マウス細胞、ヒト細胞などを含む哺乳動物細胞など) が挙げられるが限定されない。本発明の細胞は、293T細胞などの細胞株でもあり得る。

10

【0041】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによる、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を調製する方法に関し、この方法は、本発明の宿主細胞を適切な条件下で培養し、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を細胞培養物から回収する段階を含む。

【0042】

本発明のさらなる態様は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片および複合部分を含む複合物に関し、ここで本モノクローナル抗体は、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であり、複合部分は検出可能な標識である。具体的に、複合部分は、放射性同位体、蛍光物質、発光性物質、発色物質または酵素 (例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ) である。

20

【0043】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片または本発明による複合物を含むキットに関し；

具体的に、本キットは、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を特異的に認識する二次抗体をさらに含み；この二次抗体は、検出可能な標識、例えば放射性同位体、蛍光物質、発光性物質、発色物質または酵素 (例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ) をさらに含んでもよい。

【0044】

本発明のさらなる態様は、試料中のCTLA4の存在またはそのレベルを検出することにおける使用のためのキットの調製における、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の使用に関する。

30

【0045】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片または本発明による複合物を含む医薬組成物に関し、これは、医薬的に許容可能な担体および／または賦形剤をさらに含んでもよい。

【0046】

本発明のさらなる態様は、腫瘍の、予防および／または治療および／または補助療法および／または診断における使用のための薬剤の調製における、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片または本発明による複合物の使用に関し；具体的に、この腫瘍は、メラノーマ、腎臓腫瘍／腎腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結直腸癌、消化管の癌および肝臓癌／肝癌から選択される。

40

【0047】

本発明のさらなる態様は、次の薬剤：

試料中でCTLA4の存在またはそのレベルを検出する薬剤、

B7へのCTLA4の結合を阻止する薬剤、

CTLA4の活性またはCTLA4のレベルを制御 (例えば下方制御) する薬剤、

CTLA4による身体における免疫抑制を緩和する薬剤、

Tリンパ球を活性化する薬剤、または

Tリンパ球におけるIL-2の発現を増加させる薬剤

50

の調製における、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片または本発明による複合物の使用に関する。

【0048】

本発明のさらなる態様は、有効量の本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片または本発明による複合物を細胞に投与する段階を含む、インビボまたはインビトロ法に関し、この方法は：

試料中のCTLA4の存在またはそのレベルを検出する方法、

B7へのCTLA4の結合を阻止する方法、

CTLA4の活性またはCTLA4のレベルを制御（例えば下方制御）する方法、

CTLA4による身体における免疫抑制を緩和する方法、

Tリンパを活性化する方法、または

Tリンパ球におけるIL-2の発現を増加させる方法

から選択される。

【0049】

この方法は、診断もしくは治療目的または非診断もしくは非治療目的（例えば試料が、患者からの試料ではなく、細胞試料である場合）のために使用し得る。

【0050】

本発明のさらなる態様は、有効量の本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片または本発明による複合物を対象に投与することを含む、腫瘍の、予防および／または治療および／または補助療法および／または診断の方法に関し；具体的に、この腫瘍は、メラノーマ、腎臓腫瘍／腎腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結直腸癌、消化管の癌および肝臓癌／肝癌から選択される。

【0051】

本発明において、別段の指定のない限り、本明細書中で使用される科学用語および技術用語は、当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。さらに、本明細書中で使用される細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、免疫学の手順は、関連技術分野で広く利用される方法である。一方で、本発明をより理解する目的のために、関連用語の定義および説明を以下で提供する。

【0052】

本明細書中で使用される場合、CTLA4タンパク質（細胞傷害性Tーリンパ球抗原4）のアミノ酸配列について申し述べる場合、これは、CTLA4タンパク質の全長またはCTLA4の細胞外断片、CTLA4ECD（配列番号2）またはCTLA4ECDを含む断片を含み；これはまた、CTLA4ECDの融合タンパク質、例えばマウスIgGのFcタンパク質断片（mFc）（配列番号3）と融合される断片も含む。しかし、当業者により理解されるように、突然変異または変異（置換、欠失および／または付加を含むが限定されない。）は、その生物学的機能に影響を及ぼすことなく、CTLA4タンパク質のアミノ酸配列において天然に生じるかまたはCTLA4タンパク質のアミノ酸配列に人工的に導入され得る。したがって、本発明において、「CTLA4タンパク質」という用語は、配列番号2で規定されるような配列ならびにそのネイティブもしくは人工的変異体を含め、全てのこのような配列を含むべきである。さらに、CTLA4タンパク質の配列断片について申し述べる場合、これは配列番号2の配列断片を含むだけでなく、そのネイティブまたは人工的変異体の対応する配列断片も含む。

【0053】

本明細書中で使用される場合、具体的に指定されない限り、B7はB7-1および／またはB7-2を指し；それらの具体的なタンパク質配列は、当技術分野で公知の配列を指す。先行技術またはGenBankの文献、例えばB7-1（CD80、NCBI Gene ID：941）、B7-2（CD86、NCBI Gene ID：942）で開示される配列を参照し得る。

【0054】

本明細書中で使用される場合、EC₅₀という用語は、最大効果の50％に対する濃度

、すなわち最大効果の50%を引き起こす濃度を指す。

【0055】

本明細書中で使用される場合、「抗体」という用語は、一般に2対のポリペプチド鎖（各対は「軽」（L）鎖および「重」（H）鎖を有する。）からなる免疫グロブリン分子を指す。抗体軽鎖は、 κ および λ 軽鎖として分類され得る。重鎖は μ 、 δ 、 γ 、 α または ϵ として分類され得、抗体のアイソタイプはそれぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして定められる。軽鎖および重鎖内で、可変領域および定常領域は、約12個以上のアミノ酸の「J」領域を介して連結され、重鎖は約3個以上のアミノ酸の「D」領域をさらに含む。各重鎖は、重鎖可変領域（ V_H ）および重鎖定常領域（ C_H ）からなる。重鎖定常領域は、3個のドメイン（ C_{H1} 、 C_{H2} および C_{H3} ）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ V_L ）および軽鎖定常領域（ C_L ）からなる。軽鎖定常領域は C_L ドメインからなる。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）および古典的な補体系（C1q）の第一の構成成分を含め、宿主組織また因子への免疫グロブリンの結合に介在し得る。 V_H および V_L 領域は、比較的保存されるフレームワーク領域（FR）と呼ばれる領域に散在する高い可変性を有する領域（相補性決定領域（CDR）と呼ばれる。）にさらに細かく分けられ得る。各 V_H または V_L は、アミノ末端からカルボキシ末端へと次の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で並んでいる、3個のCDRおよび4個のFRからなる。重鎖／軽鎖の各対の可変領域（ V_H および V_L ）は抗体結合部位をそれぞれ形成する。各領域またはドメインに対するアミノ酸の割り当ては、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987および1991))またはChothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothiaら (1989) Nature 342: 878-883で提供される定義に従う。「抗体」という用語は、抗体を作製するための何らかの具体的な方法に限定されない。例えば、これは、特に、組み換え抗体、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む。抗体は、異なるアイソタイプの抗体、例えばIgG（例えばIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4サブタイプ）、IgA1、IgA2、IgD、IgEまたはIgM抗体であり得る。

【0056】

本明細書中で使用される場合、抗体の「抗原結合断片」という用語は、全長抗体により結合される抗原に特異的に結合し、および／または抗原への特異的な結合について全長抗体と競合する能力を保持する全長抗体の断片を含むポリペプチドを指す。これは、「抗原結合部分」とも呼ばれる。全般的には、全ての目的に対してその全体において参照により本明細書中に組み込まれる、Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W. ed., Second Edition, Raven Press, N. Y. (1989))を参照のこと。抗体の抗原結合断片は、組み換えDNA技術またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的切断により作製され得る。いくつかの場合において、抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAbおよび相補性決定領域（CDR）断片、1本鎖抗体（例えばscFv）、キメラ抗体、ダイアボディおよび、ポリペプチドに特異的な抗原結合能を付与するのに十分な抗体の少なくとも一部を含むこのようなポリペプチドを含む。

【0057】

本明細書中で使用される場合、「Fd断片」という用語は、 V_H および C_{H1} ドメインからなる抗体断片を指し；「Fv断片」という用語は、抗体のシングルアームの V_L および V_H ドメインからなる抗体断片を指し；「dAb断片」という用語は、 V_H ドメインからなる抗体断片を指し（Wardら、Nature 341: 544-546 (1989)）；「Fab断片」という用語は、 V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H1} ドメインからなる抗体断片を指し；「F(ab')₂断片」という用語は、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結される2つのFab断片を含む抗体断片を指す。

【0058】

いくつかの場合において、抗体の抗原結合断片は、1本鎖抗体（例えばs c F v）であり、ここでV_LおよびV_Hドメインは互いに対して、1個分子を形成させるために1本のポリペプチド鎖の生成を可能にするリンカーを介して対形成する（例えば、Birdら、Science 242:423-426（1988）およびHustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883（1988）を参照のこと。）。このようなs c F v分子は、一般構造：NH₂-V_L-リンカー-V_H-COOHまたはNH₂-V_H-リンカー-V_L-COOHを有し得る。先行研究からの適切なリンカーは、反復GGGGSアミノ酸配列またはその変異体からなる。例えば、アミノ酸配列（GGGGS）₄を有するリンカーを使用し得るが、その変異体も使用し得る（Holligerら（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448）。本発明において有用な他のリンカーは、Alft hanら（1995）Protein Eng. 8:725-731；Choiら（2001）Eur. J. Immunol. 31:94-106；Huら（1996）Cancer Res. 56:3055-3061；Kipriyanovら（1999）J. Mol. Biol. 293:41-56およびRooversら（2001）Cancer Immunolに記載されている。

10

【0059】

いくつかの場合において、抗体の抗原結合断片は、ダイアボディ（2個抗体）であり、ここでV_HおよびV_Lドメインは、単一ポリペプチド鎖上で発現される。しかし、利用されるリンカーは、短すぎて同じ鎖上の2個のドメインが互いに対形成できず、別の鎖上の相補的なドメインと対形成せざるを得ない。このようにして、2個の抗原結合部位が形成される（例えば、Holliger P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448（1993）およびPoljak R. J.ら、Structure 2:1121-1123（1994）を参照のこと。）。

20

【0060】

抗体の抗原結合断片（例えば上記の抗体断片）は、当業者にとって公知の従来技術（例えば、組み換えDNA技術または酵素的もしくは化学的切断法）を用いて、ある種の抗体（例えば本発明において提供されるモノクローナル抗体4B3、13A10、12B9または4H4）から得ることができ、インタクト抗体の場合と同じように特異性についてスクリーニングし得る。

30

【0061】

本明細書中で、文脈において明らかに指定されない限り、「抗体」という用語について申し述べる場合、インタクトな抗体を含むだけでなく、抗体の抗原結合断片も含む。

【0062】

本明細書中で使用される場合、「mAb」または「モノクローナル抗体」という用語は、非常に均一な抗体分子の集団からの抗体または抗体断片を指し、すなわち、この集団を含む個々の抗体は、可能性のある天然の突然変異を除き、同一である。モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに非常に特異的である。モノクローナル抗体とは対照的に、ポリクローナル抗体調製物は、一般的には、抗原上の異なるエピトープを認識する少なくとも2つ以上の異なる抗体を含む。モノクローナル抗体は、一般に、最初にKohlerらにより記載されたハイブリドーマ技術（Nature, 256:495, 1975）を用いて得ることができるか、または組み換えDNA技術（例えば米国特許第4,816,567号明細書を参照のこと。）を使用して得ることができる。

40

【0063】

本明細書中で使用される場合、番号とともに述べられるモノクローナル抗体は、同じ番号の付いたハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体と同一である。例えば、モノクローナル抗体4B3（または13A10、12B9または4H4）は、ハイブリドーマ細胞株4B3（または13A10、12B9または4H4）またはそのサブクローンまたは子孫細胞から得られる抗体と同一である。

50

【0064】

本明細書中で使用される場合、「キメラ抗体」という用語は、標的抗原への結合のための活性を保持する限り、軽鎖および／または重鎖の部分が（特定の種由来であり得るかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属し得る）抗体由来であり、一方で軽鎖および／または重鎖の別の部分が、（同一であるまたは異なる種由来であり得るか、または同一であるまたは異なる抗体クラスもしくはサブクラスに属し得る）別の抗体由来であるような抗体を指す（Cabillyらに対する米国特許第4,816,567号明細書；Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855（1984））。

【0065】

本明細書中で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）の全てのまたは一部のCDRを非ヒト抗体（ドナー抗体）のCDRで置き換えた後に得られる抗体または抗体断片を指し、ドナー抗体は、所望の特異性、親和性または反応性を有する非ヒト（例えばマウス、ラットまたはウサギ）抗体であり得る。さらに、レシピエント抗体のフレームワーク領域（FR）の一部のアミノ酸残基は、抗体の性能をさらに向上させるかまたは最適化するために非ヒト抗体の対応するアミノ酸残基または他の抗体のアミノ酸残基で置き換えられ得る。ヒト化抗体に関するより詳細な説明については、例えばJonesら、Nature, 321:522-525（1986）；Reichmannら、Nature, 332:323-329（1988）；Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596（1992）；およびClark, Immunol. Today 21:397-402（2000）を参照のこと。

【0066】

本明細書中で使用される場合、「中和抗体」は、標的ウイルスの病原性（例えば細胞に感染する能力）を取り除き得るかまたは顕著に低下させ得る、抗体または抗体断片を指す。

【0067】

本明細書中で使用される場合、「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたは抗体により特異的に結合される抗原上の部分（part）を指す。当技術分野において、「エピトープ」は「抗原決定基」とも呼ばれる。エピトープまたは抗原決定基は一般に、分子の化学的に活性のある表面基、例えばアミノ酸または炭水化物化合物または糖側鎖となり、一般に特異的な三次元構造特性および特異的な電荷特性を有する。例えば、エピトープは一般に、別個の（distinct）空間的な高次構造において、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の連続または非連続アミノ酸を含む。これは、「直鎖状」または「高次構造的」エピトープであり得る。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed.（1996）を参照のこと。直鎖状エピトープにおいて、タンパク質と相互作用分子（例えば抗体）との間の相互作用点は全て、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って一列に存在する。高次構造的エピトープにおいて、相互作用点は、互いから離れているタンパク質のアミノ酸残基にわたるように存在する。

【0068】

本明細書中で使用される場合、「単離される」という用語は、人工的手段によってネイティブ状態から得られていることを意味する。「単離される」物質または構成成分が天然に生じる場合、その天然の環境が変化しているか、またはその物質が天然の環境から単離されているか、またはその両方であると考えられる。例えば、単離されていないポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、インビボで生きている動物中に天然に存在し、このような天然の状態から単離される高純度の同一であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離されている」ものとされる。「単離される」という用語は、人工的または合成物質との混合物を排除せず、物質の活性に影響を与えない他の不純物の存在を排除しない。

【0069】

本明細書中で使用される場合、「E. コリ (E. coli) 発現系」という用語は、E. コリ (E. coli) (ステイン (stain)) およびベクターからなる発現系を意味し、E. コリ (E. coli) (株) は、例えば市販の株由来であるが、GI698、ER2566、BL21 (DE3)、B834 (DE3) およびBLR (DE3) に限定されない。

【0070】

本明細書中で使用される場合、「ベクター」という用語は、ポリヌクレオチドが挿入され得る核酸保有ツールを指す。ベクターが、挿入されたポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の発現を可能にする場合、そのベクターは、発現ベクターと呼ばれる。ベクターは、ベクターにより保有される遺伝物質構成要素が宿主細胞で発現されるように、形質転換、形質導入または遺伝子移入によって宿主細胞に導入することができる。ベクターは、当業者にとって周知であり、プラスミド；ファージミド；コスミド；人工染色体、例えば酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC) またはP1-由来人工染色体 (PAC)；バクテリオファージ、例えばλファージまたはM13ファージならびに動物ウイルスなどが含まれるが限定されない。ベクターとして使用し得る動物ウイルスとしては、レトロウイルス (レンチウイルスを含む。)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス (例えば単純ヘルペスウイルス)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス (例えばSV40) が挙げられるが限定されない。ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択構成要素およびレポーター遺伝子を含むが限定されない、発現を調節するためのいくつかの構成要素を含み得る。さらに、ベクターは、複製開始部位も含み得る。

【0071】

本明細書中で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、ベクターの導入のために使用し得る細胞を指し、原核細胞、例えばE. コリ (E. coli) またはバチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) など、真菌細胞、例えば酵母細胞またはアスペルギルス (*Aspergillus*) など、昆虫細胞、例えばS2ショウジョウバエ細胞もしくはSf9など、または動物細胞、例えば線維芽細胞、CHO細胞、COS細胞、NSO細胞、HeLa細胞、BHK細胞、HEK293細胞またはヒト細胞が含まれるが限定されない。

【0072】

本明細書中で使用される場合、「同一性」という用語は、2つのポリペプチド間または2つの核酸間で一致する配列を述べるために使用される。比較した2つの配列における対応する位置に同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットが存在する場合 (例えば、2つのDNA分子における対応する位置に両方ともアデニンが存在するか、または2つのポリペプチドにおける対応する位置に両方ともリジンが存在する場合)、これらの分子はその位置で同一である。2つの配列間の「パーセント同一性」は、これらの2つの配列が共有する、一致する位置の数を比較した位置の数で除して100をかけた関数である。例えば、2つの配列の10カ所の位置のうち6カ所が一致する場合、これらの2つの配列は60%同一性を有する。例えば、DNA配列CTGACTおよびCAGGTTは、50%同一性を共有する (全体で6カ所のうち3カ所が一致する。)。一般に、アライメント後に2つの配列を比較して、同一性が最大になるようにする。例えば、このようなアライメントは、Needlemanら (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453の方法により、コンピュータプログラム、例えばAlignプログラム (DNASTAR, Inc.) を用いて都合よく達成され得る。さらに、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を決定するために、PAM120ウェイトレジデューテーブル (weight residue table)、12のギャップ長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーを用いて、ALIGNプログラム (バージョン2.0) に組み込まれる、E. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) を使用し得る。さらに、GCGパッケージ (ww

10

20

30

40

50

w. g c g. c o mで利用可能) の G A P プログラムに組み込まれる N e e d l e m a n および W u n s c h のアルゴリズム (J M o l B i o l . 4 8 : 4 4 4 - 4 5 3 (1 9 7 0)) は、 B l o s s u m 6 2 マトリクスまたは P A M 2 5 0 マトリクス、ギャップウェイト (g a p w e i g h t) 1 6、1 4、1 2、1 0、8、6 または 4 および長さウェイト (l e n g t h w e i g h t) 1、2、3、4、5 または 6 を用いて、2 つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を決定するために使用し得る。

【0073】

本明細書中で使用される場合、「保存的置換」という用語は、不都合な影響を及ぼさないかまたはそのアミノ酸配列を含むタンパク質／ポリペプチドの必須の特性を変更しないアミノ酸置換を指す。例えば、保存的置換は、当技術分野で公知の標準的技術、例えば部位特異的突然変異誘発および P C R 介在型突然変異誘発などにより導入し得る。保存的アミノ酸置換としては、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基、例えば、物理または機能について対応するアミノ酸残基 (例えば、同様のサイズ、形態、電荷、共有結合または水素結合の形成能を含む化学的特性などを有する。) と同様の残基で置換されるものが挙げられる。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖 (例えば、リジン、アルギニンおよびヒスチジン)、酸性側鎖 (例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸)、非荷電極性側鎖 (例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システインおよびトリプトファン)、非極性側鎖 (例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニンおよびメチオニン)、ベーター分岐状側鎖 (例えばスレオニン、バリンおよびイソロイシン) および芳香族側鎖 (例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびヒスチジン) を有するアミノ酸を含む。したがって、対応するアミノ酸残基を同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換することが好ましい。アミノ酸保存的置換を同定する方法は当技術分野で周知である (例えば、参照により本明細書中に組み込まれる、B r u m m e l l ら、B i o c h e m . , 3 2 : 1 1 8 0 - 1 1 8 7 (1 9 9 3) ; K o b a y a s h i ら、P r o t e i n E n g . 1 2 (1 0) : 8 7 9 - 8 8 4 (1 9 9 9) ; および B u r k s ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 4 : 4 1 2 - 4 1 7 (1 9 9 7) を参照のこと)。

【0074】

本明細書中で使用される場合、「免疫原性」という用語は、特異的な抗体を産生させるために、またはリンパ球を感作するために身体を刺激する能力を指す。これは、免疫細胞の、活性化、増殖および分化ならびに最終的には抗体などの免疫エフェクター物質の産生を誘導するために特異的な免疫細胞を刺激し得、リンパ球を感作し得る抗原の特性を指すだけでなく、抗原による身体の刺激後に、抗体を産生させるかまたは T リンパ球を感作するための、身体の免疫系による特異的な免疫反応も指す。免疫原性は、抗原の最も重要な特性である。抗原が宿主における免疫反応の誘導に成功し得るか否かは、3 つの要因：抗原の性質、宿主の反応性および免疫付与方式に依存する。

【0075】

本明細書中で使用される場合、「特異的な結合」という用語は、2 つの分子間の非無作為結合反応、例えば抗体とその標的抗原との間の反応などを指す。いくつかの実施形態において、抗原に特異的に結合する抗体 (または抗原に特異的な抗体) は、抗体が約 10^{-5} M 未満、例えば約 10^{-6} M 未満、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M または 10^{-10} M 以下の親和性 (K_D) で抗原に結合することを意味する。

【0076】

本明細書中で使用される場合、「 K_D 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指し、これは、抗体と抗原との間の結合親和性を述べるために使用される。平衡解離定数が小さいほど、抗体-抗原結合が堅固であり、抗体と抗原との間の親和性が高い。一般に、抗体 (例えば、本発明のモノクローナル抗体 4 B 3、1 3 A 1 0、1 2 B 9 または 4 H 4) は、B I A C O R E 機器上で表面プラズモン共鳴 (S P R) を使用して決定した場合、約 10^{-5} M 未満、例えば約 10^{-6} M 未満、 10^{-7} M、 10^{-8} M、

10^{-9} Mまたは 10^{-10} M以下の解離平衡定数 (K_D) で抗原 (例えば L1 タンパク質) と結合する。

【0077】

本明細書中で使用される場合、「モノクローナル抗体」および「mAb」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用され得る。また、「ポリクローナル抗体」および「pAb」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用され得る。また、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用され得る。さらに、本発明において、アミノ酸は一般に、当技術分野で周知の、1文字または3文字略号により表される。例えば、アラニンはAまたはAlaで表し得る。

【0078】

本明細書中で使用される場合、「ハイブリドーマ」および「ハイブリドーマ細胞株」という用語は、交換可能に使用され得る。さらに、「ハイブリドーマ」または「ハイブリドーマ細胞株」という用語について申し述べる場合、これは、ハイブリドーマのサブクローンおよび子孫細胞も含む。例えば、ハイブリドーマ細胞株4B3について申し述べる場合、これは、ハイブリドーマ細胞株4B3のサブクローンおよび子孫細胞も含む。

【0079】

本明細書中で使用される場合、「医薬的に許容可能なベクターおよび／または賦形剤」という用語は、薬理学および／または生理学において対象および活性のある構成要素に適合するベクターおよび／または賦形剤を指し、これらは当技術分野で周知であり (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Genaro AR編, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995を参照のこと。)、これらには、pH調整剤、界面活性剤、アジュバント、イオン強度促進剤が含まれるが限定されない。例えば、pH調整剤としてはリン酸緩衝液が挙げられるが限定されず；界面活性剤としては陽イオン性、陰イオン性または非イオン性界面活性剤、例えばTween-80が挙げられるが限定されず；イオン強度促進剤としては塩化ナトリウムが挙げられるが限定されない。

【0080】

本明細書中で使用される場合、「アジュバント」という用語は、非特異的な免疫促進剤を指し、これは、抗原に対する身体の免疫反応を促進し得るかまたは抗原と一緒にもしくは身体に予め送達される場合、免疫反応のタイプを変化させ得る。アルミニウムアジュバント (例えば水酸化アルミニウム)、フロイントアジュバント (例えば完全フロイントアジュバントおよび不完全フロイントアジュバント)、コリネバクテリウム・パルブム (*Corynebacterium parvum*)、リポ多糖類、サイトカインなどを含むが限定されない多くのアジュバントがある。フロイントアジュバントは、現在のところ動物試験において最も一般的に使用されるものであり、水酸化アルミニウムは臨床実験で広く使用されるものである。

【0081】

本明細書中で使用される場合、「有効量」という用語は、所望の効果を達成するかまたは少なくとも一部達成するのに十分な量を指す。例えば、疾患 (例えば、B7へのCTLA4の過剰な結合またはCTLA4活性が関連する疾患、例えば腫瘍など) に対する予防的有効量は、疾患 (例えば、B7へのCTLA4の過剰な結合またはCTLA4活性が関連する疾患、例えば腫瘍など) の発症を防ぐか、抑止するかまたは遅延させるのに十分である量を指し；疾患に対する治療的有効量は、疾患に罹患している患者において疾患およびその合併症を治癒させるか少なくとも部分的に抑止するのに十分な量を指す。このような有効量を決定することは十分に当業者の技術の範囲内である。例えば、治療的有効量は、処置しようとする疾患の重症度、患者の免疫系の全般的状況、患者の全般的状況、例えば年齢、体重および性別、薬剤の投与形式、同時に行われる他の治療などに依存する。

【発明の効果】

【0082】

本発明のモノクローナル抗体8D2およびそのヒト化抗体は、CTLA4と非常によく

10

20

30

40

50

特異的に結合し得る。中でも、抗体 8 D 2 および 8 D 2 (R e) は、対照抗体 1 0 D 1 (A l a n J. K o r m a n , E d w a r d L. H a l k ら、H U M A N C T L A - 4 A N T I B O D I E S 、米国特許第 6 9 8 4 7 2 0 号明細書) および 1 1 . 2 . 1 (D o u g l a s C h a r l e s H a n s o n , M a r k J o s e p h N e v e u ら、H u m a n m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s t o C T L A - 4 、米国特許第 6 8 2 7 3 6 号明細書) よりも良好な結合効率でマウス C T L A 4 抗原に結合する。ヒト化抗体 8 D 2 H 1 L 1 は、対照抗体 1 0 D 1 よりも良好で、1 1 . 2 . 1 に匹敵する結合効率でマウス C T L A 4 抗原に結合する。ヒト化抗体 8 D 2 H 2 L 2 は、1 0 D 1 に匹敵する結合効率でヒト C T L A 4 抗原に結合する。ヒト化抗体 8 D 2 H 2 L 2 および 8 D 2 H 3 L 3 は、1 0 D 1 に匹敵する結合効率でサル C T L A 4 抗原に結合する。抗体 8 D 2 H 2 L 1 5 および 8 D 2 H 2 L 1 7 は、対照抗体 1 0 D 1 および 1 1 . 2 . 1 よりも良好な結合効率でヒト C T L A 4 抗原に結合する。

10

【0083】

抗体 8 D 2 、8 D 2 (R e) および 8 D 2 ヒト化抗体 8 D 2 H 1 L 1 、8 D 2 H 2 L 2 、8 D 2 H 3 L 3 、8 D 2 H 2 L 1 5 および 8 D 2 H 2 L 1 7 は、抗原 C T L A 4 への結合について B 7 と競合し得る。中でも、8 D 2 、8 D 2 (R e) 、8 D 2 H 1 L 1 および 8 D 2 H 2 L 2 は、C T L A 4 への結合についての B 7 - 2 との競合において 1 0 D 1 よりも強力であり；8 D 2 H 1 L 1 、8 D 2 H 2 L 2 、8 D 2 H 3 L 3 、8 D 2 H 2 L 1 5 および 8 D 2 H 2 L 1 7 は、全て、C T L A 4 への結合についての B 7 - 1 および B 7 - 2 との競合において抗体 1 0 D 1 および 1 1 . 2 . 1 よりも強力である。

20

【0084】

本発明のモノクローナル抗体 8 D 2 およびそのヒト化抗体は、B 7 への C L T A 4 の結合を阻止し得、具体的には、C T L A 4 による身体上の免疫抑制を緩和し、非常に効率的に T リンパ球を活性化する。中でも、8 D 2 H 2 L 2 および 8 D 2 H 2 L 1 5 は、T リンパ球を活性化することにおいて、対照抗体 1 0 D 1 および 1 1 . 2 . 1 よりも強力である。

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図 1】C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質の S D S - P A G E の結果。4 つのレーンでの試料およびそれらのローディング量は、左から右へ、次のとおりであった：M、マーカー、1 0 μ L ；C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質、1 μ g ；C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質、2 μ g ；C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質、3 μ g 。

30

【図 2】8 D 2 抗体の S D S - P A G E の結果。4 つのレーンでの試料およびそれらのローディング量は、左から右へ、次のとおりであった：M、マーカー、1 0 μ L ；タンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、0 . 3 μ g ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液、2 μ L ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、0 . 3 μ g 。

【図 3】8 D 2 組み換え抗体 (8 D 2 (R e)) の S D S - P A G E の結果。4 つのレーンでの試料およびそれらのローディング量は、左から右へ、次のとおりであった：M、マーカー、1 0 μ L ；タンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、1 μ g ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液、2 μ L ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、1 μ g 。

40

【図 4】8 D 2 、8 D 2 H 1 L 1 のヒト化抗体の S D S - P A G E の結果。4 つのレーンでの試料およびそれらのローディング量は、左から右へ、次のとおりであった：M、マーカー、1 0 μ L ；タンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、1 μ g ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液、2 μ L ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、1 μ g 。

【図 5】8 D 2 、8 D 2 H 2 L 2 のヒト化抗体の S D S - P A G E の結果。4 つのレーンでの試料およびそれらのローディング量は、左から右へ、次のとおりであった：M、マ

50

カー、 $10\ \mu\text{L}$ ；タンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、 $1\ \mu\text{g}$ ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、 $1\ \mu\text{g}$ 。

【図6】8D2、8D2H3L3のヒト化抗体のSDS-PAGEの結果。4つのレーンでの試料およびそれらのローディング量は、左から右へ、次のとおりであった：M、マーカー、 $10\ \mu\text{L}$ ；タンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、 $1\ \mu\text{g}$ ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、 $1\ \mu\text{g}$ 。

【図7】8D2、8D2H2L15のヒト化抗体のSDS-PAGEの結果。試料およびそれらのローディング量は、次のとおりであった：M、マーカー、 $10\ \mu\text{L}$ ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、 $1\ \mu\text{g}$ ；タンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、 $1\ \mu\text{g}$ 。

【図8】8D2、8D2H2L17のヒト化抗体のSDS-PAGEの結果。試料およびそれらのローディング量は、次のとおりであった：M、マーカー、 $10\ \mu\text{L}$ ；タンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、 $1\ \mu\text{g}$ ；タンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液中の抗体試料、 $1\ \mu\text{g}$ 。

【図9】mAb 8D2の動的特性パラメーター決定の結果。

【図10】8D2H1L1の動的特性パラメーター決定の結果。

【図11】8D2H2L2の動的特性パラメーター決定の結果。

【図12】8D2H3L3の動的特性パラメーター決定の結果。

【図13】8D2H2L15の動的特性パラメーター決定の結果。

【図14】8D2H2L17の動的特性パラメーター決定の結果。

【図15】フローサイトメトリーを使用して検出した場合の、非標識293F細胞、アイソタイプ対照および293F-CTLA4細胞における、CTLA4の発現を示すヒストグラム（細胞数-蛍光（FITC））。

【図16】フローサイトメトリーを使用して検出した場合の、非標識293F細胞、アイソタイプ対照および293F-CTLA4細胞における、CTLA4の発現の平均蛍光強度（MFI）。

【図17】標識293F-CTLA4細胞に対するmAb 8D2の結合の EC_{50} の結果。

【図18】標識293F-CTLA4細胞に対する8D2（Re）抗体の結合の EC_{50} の結果。

【図19】標識293F-CTLA4細胞に対する8D2H1L1の結合の EC_{50} の結果。

【図20】標識293F-CTLA4細胞に対する8D2H2L2の結合の EC_{50} の結果。

【図21】標識293F-CTLA4細胞に対する8D2H3L3の結合の EC_{50} の結果。

【図22】ELISA法を用いたCTLA4への抗体8D2、8D2H1L1および8D2（Re）の結合の判定。

【図23】ELISA法を用いたヒトCTLA4への組み換え抗体8D2H2L2および8D2H3L3の結合の判定。

【図24】ELISA法を用いたサルCTLA4への組み換え抗体8D2H2L2および8D2H3L3の結合の判定。

【図25】ELISA法を用いたサルCTLA4への組み換え抗体8D2H2L15および8D2H2L17の結合の判定。

【図26】B7-1との抗体8D2、8D2H1L1および8D2（Re）の競合に対するELISAの結果。

【図27】B7-2との抗体8D2、8D2H1L1および8D2（Re）の競合に対するELISAの結果。

10

20

30

40

50

【図28】B7-1との8D2H2L2および8D2H3L3抗体の競合に対するELISAの結果。

【図29】B7-2との8D2H2L2および8D2H3L3抗体の競合に対するELISAの結果。

【図30】B7-1との8D2H2L15および8D2H2L17抗体の競合に対するELISAの結果。

【図31】B7-2との8D2H2L15および8D2H2L17抗体の競合に対するELISAの結果。

【図32】末梢血単核細胞(PBMC)、Raji細胞およびそれぞれヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2または8D2H3L3との72時間の同時培養後の、ELISA法により検出した場合のTリンパ球によるIL-2分泌レベルに対する効果。結果から、mAb8D2のヒト化抗体が、CTLA4の受容体を妨害することによって、Tリンパ球によるIL-2分泌を増加させたことが示される。

10

【図33】末梢血単核細胞(PBMC)、Raji細胞およびそれぞれヒト化抗体8D2H2L15または8D2H2L17との72時間の同時培養後の、ELISA法により検出した場合のTリンパ球によるIL-2分泌レベルに対する効果。結果から、mAb8D2のヒト化抗体が、CTLA4の受容体を妨害することによって、Tリンパ球によるIL-2分泌を増加させたことが示される。

【図34】8D2H2L2で処置したhu-SCID-rajiモデルにおける皮下移植腫瘍の増殖曲線。

20

【発明を実施するための形態】

【0086】

以下で実施例を参照して本発明の実施形態を詳述する。当業者は、次の実施例が単に本発明を例示するために提供されることを理解しよう。これらは、何であれ、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきものではない。具体的な技術または条件が記載されない実施例は、当技術分野の文献で開示される技術または条件を使用して（例えば、J. Sambrookら著、Peitang HUANGら訳、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Science Press）、または製品とともに提供される説明書に従い、行った。供給者が示されていない試薬および機器は、市販の従来製品である。

30

【0087】

本発明の次の実施例において、BALB/Cマウスは、Guangdong Medical Laboratory Animal Centerから購入した。

【0088】

本発明の次の実施例において、使用したT細胞は、Akeso Biopharma Inc., Zhongshanから入手した。

【0089】

対照抗体、10D1は米国特許第6984720号明細書に従い調製し；11.2.1は米国特許第6682736号明細書に従い調製した。

【0090】

40

〔実施例1〕CTLA4-8D2ハイブリドーマ細胞株LT001の作製およびモノクローナル抗体8D2の調製

抗原としてマウスに免疫付与するために、哺乳動物細胞発現系において、組み換えCTLA4を発現させ、マウス脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させることによってハイブリドーマ細胞を得た。多数の試料をスクリーニングした後、ハイブリドーマ細胞株（CTLA4-8D2ハイブリドーマ細胞株LT001）を得た。前記の細胞株は、CTLA4に特異的に結合するモノクローナル抗体8D2を分泌し得た。具体的な方法を以下に記載する。

【0091】

1. CTLA4ECD-mFc遺伝子の合成

設計（配列番号3）に従い、CTLA4遺伝子（細胞傷害性Tリンパ球抗原4、NC

50

B I 遺伝子 I D : 1 4 9 3、配列番号 1) の細胞外断片 (C T L A 4 E C D) に対応するアミノ酸配列 (配列番号 2) をマウス I g G の F c タンパク質断片 (m F c) に融合させたが、m F c は、配列番号 3 の下線部により示されるようなアミノ酸配列を有するマウス I g G の F c タンパク質断片を指す。

【 0 0 9 2 】

2 9 3 f 細胞発現系における関心のある遺伝子の発現効率を上昇させるために、コドン選択性、G C 含量、m R N A の二次構造および反復配列などを主に考慮して、配列番号 3 タンパク質配列をコードする核酸配列を G e n s c r i p t C o . で最適化した。C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質をコードする最終的な最適化遺伝子は次の配列 (配列番号 4) を有し、G e n s c r i p t C o . で合成された。

10

【 0 0 9 3 】

C T L A 4 E C D 遺伝子の配列 (3 7 5 b p) :

GCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAG

CCGAGGCATCGCCAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCA

AAGCCACTGAGGTCCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAG

CCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATGGGGAAT

GAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAG

20

TGGAAATCAAGTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGG

ACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCG

CCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTAAT

TGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGAC (SEQ ID NO: 1)

C T L A 4 E C D によりコードされるタンパク質の配列 (1 2 5 a a) :

AMHVAQPAVVCLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS

QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT

GLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS (SEQ ID NO:

2)

30

C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質の配列 (3 6 4 a a) :

ここで、C T L A 4 E C D 部分に波線を付し、m F c 部分に実線を付す。

【 0 0 9 4 】

AMHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYASPGKATEVRVTVL RQADS
QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLT IQGLRAMDT
GLYICKVELMYPPPYL GIGNGTQIYVIDPEPCPDS DENLYFQGPRG
PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVS
EDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QD
WMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLP PPEEEM
TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGS
YFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

10

(SEQ ID NO: 3)

C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質に対応する遺伝子のコード配列 (1 0 9 2 b p) :

ここで、C T L A 4 E C D 部分に波線を付し、m F c 部分に実線を付す。

【 0 0 9 5 】

GCAATGCATGTCGCACAGCCTGCAGTGGTCCTGGCAAGCTC
CAGGGGAATCGCTAGCTTCGTGTGCGAATACGCTTCCCCAGGCA
AGGCAACCGAGGTCCGGGTGACAGTCCTGAGACAGGCCGACAG
CCAGGTGACAGAAGTCTGCGCCGCTACTTATATGATGGGCAACG
AGCTGACCTTTCTGGACGATAGCATTTGTACCGGGACATCTAGT
GGAAACCAAGTGAATCTGACCATCCAGGGCCTGCGCGCTATGG
ACACAGGGCTGTACATTTGTAAAGTGGAGCTGATGTATCCCCCT
CCATACTATCTGGGAATCGGCAACGGGACCCAGATCTACGTGAT
TGATCCTGAACCATGCCCCGACTCCGATGAGAATCTGTATTTCC
AGGGACCACGAGGCCCCACAATTAAGCCATGTCCCCCTTGCAA
TGTCCTGCACCAAACCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTTCATCTT
TCCACCCAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTCACTGAGCCCCA
TTGTGACCTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCGAGGACGATCCTGA
TGTGCAGATCAGTTGGTTCGTCAACAATGTGGAAGTCCACACAG
CTCAGACTCAGACCCATAGGGAGGATTACAATAGTACTCTGCGC
GTCGTGTCAGCACTGCCCATTCAGCACCAGGACTGGATGAGCG
GCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGATCTGCCCCG
ACCTATCGAGAGAACTATTTCCAAGCCTAAAGGGTCTGTGAGGG
CCCCACAGGTGTATGTCCTGCCTCCACCCGAGGAAGAGATGACT
AAGAAACAGGTGACACTGACTTGTATGGTCACCGACTTCATGCC
CGAAGATATCTACGTGGAGTGGACTAACAATGGGAAGACCGAA
CTGAACTATAAAAATACAGAGCCTGTGCTGGACTCAGATGGAAG
CTACTTTATGTATAGCAAGCTGCGAGTGGAAAAGAAAACTGGG
TCGAGCGGAACAGCTACTCTTGTAGTGTGGTCCACGAAGGGCTG
CATAATCACCACACCACTAAATCATTCTCCCGAACTCCAGGCAA

10

20

30

40

A (SEQ ID NO: 4)

2. pUC57simple-CTLA4ECD-mFcプラスミドの作製

Genscript Co. でpUC57 simple発現ベクター (Genscript Co. より提供) への合成CTLA4ECD-mFc融合遺伝子 (配列番号4) のクローニングが行われ、その結果、pUC57simple-CTLA4ECD-mFcプラスミドが得られた。

【0096】

3. pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc組み換えプラスミドの構築

エンドヌクレアーゼXbaIおよびBamHIを用いてpUC57simple-CTLA4ECD-mFcプラスミドを消化した。電気泳動を介してCTLA4ECD-mFc

50

c融合遺伝子断片を回収し、p c D N A 3. 1 発現ベクター (I n v i t r o g e n C o. より購入) に連結させた。得られたp c D N A 3. 1 - C T L A 4 E C D - m F c プラスミドを使用して、E. コリ (E. c o l i) の D H 5 a 株のコンピテント細胞 (T I A N G E N C o. より購入) に遺伝子移入した。説明書に従って、遺伝子移入および培養を行った。p c D N A 3. 1 - C T L A 4 E C D - m F c について陽性の E. コリ (E. c o l i) コロニーをスクリーニングして選び出し、従来法に従い増殖させた。次いで、キット (T i a n g e n B i o t e c h (B e i j i n g) C o. L T D, D P 1 0 3 - 0 3 より購入) を使用して、キットとともに提供される説明書に従い、p c D N A 3. 1 - C T L A 4 E C D - m F c 組み換えプラスミドを抽出した。

【0097】

10

4. リポフェクタミン遺伝子移入キット (I n v i t r o g e n C o. より購入) を使用して、p c D N A 3. 1 - C T L A 4 E C D - m F c 組み換えプラスミドを用いて 2 9 3 F の細胞 (I n v i t r o g e n C o. より購入) に遺伝子移入した。

【0098】

5. 2 9 3 F 細胞に p c D N A 3. 1 - C T L A 4 E C D - m F c 組み換えプラスミドを用いて遺伝子移入してから7日後、高速遠心、細孔フィルター膜を通じた真空ろ過および H i T r a p プロテイン A H P カラムクロマトグラフィーによって、C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質を培養液から精製した。精製後、試料を採取し、タンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液に添加し、S D S - P A G E 電気泳動によって試験した。図1で示されるように、関心のあるタンパク質は、約 4 5 k D のバンドとして示される。

20

【0099】

6. C T L A 4 - 8 D 2 ハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 1 の作製

確立された方法 (例えば、B a s i c M e t h o d s i n a n t i b o d y P r o d u c t i o n a n d C h a r a c t e r i z a t i o n 中の、S t e w a r t , S. J. , 「M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n」、E d s. G. C. H o w a r d および D. R. B e t h e l l, B o c a R a t o n : C R C P r e s s, 2 0 0 0) に従い、抗原として C T L A 4 E C D - m F c 融合タンパク質を用いて、免疫付与 B A L B / C マウス (G u a n g d o n g M e d i c a l L a b o r a t o r y A n i m a l C e n t e r より購入) からの脾臓細胞をマウス骨髓腫細胞と融合させることによって、ハイブリドーマ細胞を得た。

30

【0100】

E L I S A プレートを被覆するために抗原として C T L A 4 を使用し、間接的 E L I S A スクリーニングによって、C T L A 4 に特異的に結合する新規抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を得た。競合 E L I S A スクリーニングによって、間接的 E L I S A スクリーニングで得られたハイブリドーマ細胞から、C T L A 4 への結合についてリガンド B 7 - 1 (C D 8 0、N C B I 遺伝子 I D : 9 4 1) または B 7 - 2 (C D 8 6、N C B I 遺伝子 I D : 9 4 2) と競合したモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株を得た。限界希釈を介して、安定したハイブリドーマ細胞株を得た。このハイブリドーマ細胞株は C T L A 4 - 8 D 2 ハイブリドーマ細胞株と名付け、限界希釈を介して C T L A 4 - 8 D 2 安定細胞株を得た (本発明において L T 0 0 1 とも呼ぶ ; これにより分泌されるモノクローナル抗体を 8 D 2 と名付けた。) 。

40

【0101】

7. 抗体 8 G 2 の調製

1 0 % 低 I g G のウシ胎仔血清を補給した培地中で本発明の C T L A 4 - 8 D 2 (L T 0 0 1) 細胞株を培養した。7日後、抗体 8 D 2 を精製するために、細胞培養の上清を回収した。

【0102】

8. S D S - P A G E による 8 D 2 抗体の検出

精製試料をタンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液およびタンパク質電気泳

50

動用の非還元性ローディング緩衝液に添加した。沸騰後、検出を行った。この結果から、関心のあるタンパク質が、還元性タンパク質試料の場合は約50kDおよび25kDの2本のバンドとして、または、非還元性タンパク質試料の場合は約150kDのバンドとして示されることが分かる（図2）。

【0103】

〔実施例2〕モノクローナル抗体8D2の軽鎖および重鎖配列の決定

培養細胞／細菌Total RNA Extraction Kit（Tiangen, Cat. No. DP430）の説明書に従い、実施例1で作製したCTLA4-8D2ハイブリドーマ細胞株（LT001細胞）からmRNAを抽出した。

【0104】

RT-PCRキット用のInvitrogen SuperScript（登録商標）III First-Strand Synthesis Systemの説明書に従い、cDNAを合成し、PCRにより増幅させた。pEASY-T1 Cloning Kit（TransGen, Cat. No. CT101）の説明書に従い、PCR増幅産物をすぐにTAクローニングに供した。TAクローニングの産物をすぐに配列決定に供し、配列決定の結果を以下で提供する。

【0105】

重鎖可変領域のDNA配列決定の結果（345bp）：

GAGGTGAACTGGACGAACTGGCGGGGGGCTGGTGCAGC
CCGGACGACCTATGAAGCTGTCATGCGTCGCCAGCGGCTTCACC
TTTAGCGACAACTGGATGAATTGGGTGAGGCAGAGCCCAGAGA
AGGGGCTGGAATGGCTGGCTCAGATCCGCAACAAACCCTACAAT
TATGAGACCTACTATTCTGACAGTGTGAAGGGCCGGTTCACAAT
TTCCAGAGACGATTCTAAAAGCTCCGTCTACCTGCAGATGAACA
ATCTGAGAGGGCGAAGATATGGGGATCTACTATTGCACAGCACAG
TTCGCTTATTGGGGACAGGGCACTCTGGTCACAGTCTCCGCC
（SEQ ID NO: 5）

それによりコードされるタンパク質配列（115aa）：

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDNWMNWVRQSP
EKGLEWLAQIRNKPYNYYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNN
LRGEDMGIYYCTAQFAYWGQGLVTVSA（SEQ ID NO: 6）

軽鎖可変領域のDNA配列決定の結果（318bp）：

10

20

30

40

GACATTCAGATGACACAGAGTCCTGCTTCCCTGAGTGCCTC
AGTGGGGGAGACCGTCACAATCACTTGCGGCACCTCTGAAAACA
TCTACGGCGGGGCTGAATTGGTATCAGCGGAAGCAGGGCAAAAG
TCCCCAGCTGCTGATCTTCGGAGCAACAAACCTGGCCGACGGCA
TGAGCTCCCGGTTTAGCGGGTCCGGATCTGGCAGACAGTACAG
CCTGAAGATTTCTAGTCTGCACCCAGACGATGTGGCTACTTACT
ATTGCCAGAATGTCCTGAGGAGTCCCTTCACCTTTGGGTCAGGA
ACAAAGCTGGAGATC (SEQ ID NO: 7)

10

それによりコードされるタンパク質配列 (106aa) :

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGTSENIYGGLNWFYQQRKQGS
PQLLIFGATNLADGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQN
VLRSPFTFGSGTKLEI (SEQ ID NO: 8)

20

[実施例3] ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の軽鎖および重鎖配列の設計

CTLA4タンパク質の三次元結晶構造 (Nat. Struct. Biol. (1997) 4, p. 527) および実施例2で得られた8D2抗体の配列に基づき、コンピュータ上で抗体の構造をモデル化した。抗体配列および構造モデル (抗体の定常領域配列はNCBIデータベース由来) に基づいて、抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の可変領域配列を設計した。可変領域配列を以下で提供する。

【0106】

1. モノクローナル抗体8D2H1L1の軽鎖および重鎖配列

重鎖可変領域のDNA配列 (345bp) :

30

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGCAGC
CAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACC
TTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGGCACCAGGAA
AGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAACAAACCTTACAA
CTACGAAACTTACTACAGCGACTCCGTGAAGGGGGCGGTTCACCA
TTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGTGTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAAGACCGAGGATACAGGAGTCTACTATTGTACCGCACA
GTTTGCTTATTGGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA
(SEQ ID NO: 9)

40

それによりコードされるタンパク質配列 (115aa) :

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAP
GKGLEWLAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKNSVYLMNS
LKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)

50

軽鎖可変領域のDNA配列（321bp）：

**GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCAAGCCTGTCCGCATC
TGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATGCAGAACCTCCGAGAACA
TCTACGGCGGGCTGAATTGGTATCAGCGAAAGCAGGGGAAAAG
TCCCAAGCTGCTGATCTACGGGGCAACAAACCTGGCCAGCGGA
ATGAGCTCCAGATTCAGTGGATCAGGCAGCGGGACAGATTATAC
TCTGAAAATTTCTAGTCTGCACCCAGACGATGTGGCAACCTACT
ATTGCCAGAATGTCCTGAGGTCACCCTTCACCTTTGGAAGCGGC
ACAAAACCTGGAGATCAAG（SEQ ID NO: 11）**

10

それによりコードされるタンパク質配列（107aa）：

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRTSENIYGGLNWFYQRKQKGS
PKLLIYGATNLSGMSSRFSGSGSGTDYTLKISSLHPDDVATYYCQN
VLRSPFTFGSGTKLEIK（SEQ ID NO: 12）**

20

2. 8D2ヒト化モノクローナル抗体8D2H2L2の軽鎖および重鎖配列
重鎖可変領域のDNA配列（345bp）：

**GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGCAGC
CAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACC
TTCAGCGACAACTGGATGAATTGGGTCAGGCAGGCACCAGGAA
AGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAACAAACCTTACAA
CTACGAAACTTACTACAGCGCCTCCGTGAAGGGGGCGGTTCACCA
TTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGTGTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAAGACCGAGGATACAGGAGTCTACTATTGTACCGCACA
GTTTGCTTATTGGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA
（SEQ ID NO: 13）**

30

それによりコードされるタンパク質配列（115aa）：

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAP
GKGLEWLAQIRNKPYNYETYYSASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNS
LKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGLVTVSS（SEQ ID NO: 14）**

40

軽鎖可変領域のDNA配列（321bp）：

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCAAGCCTGAGTGCCTC

AGTGGGAGACCGGGTCACCATCACATGCAGAACCAGCGAGAAC
ATCTACGGCGGCCTGAACTGGTATCAGCGAAAGCCAGGCAAGA
GCCCCAAGCTGCTGATCTACGGGGCAACCAACCTGGCCTCTGGA
GTGAGCTCCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGGACCGACTATA
CTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAAGATGTGGCAACATAC
TATTGCCAGAATGTCCTGAGGTCCCCATTCACCTTTGGATCTGG
CACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 15)

10

それによりコードされるタンパク質配列 (107aa) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRTSENIYGGLNWFYQRKPGKSP
KLLIYGATNLASGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQNV
LRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)

3. 8D2ヒト化モノクローナル抗体8D2H3L3の軽鎖および重鎖配列
重鎖可変領域のDNA配列 (345bp) :

20

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGCCTGGTGCAGC
CCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCAC
CTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTGAGGCAGGCACCCGGG
AAGGGGCTGGAGTGGGTGCTCAGATCCGCAACAAACCTTACA
ATTATGAGACAGAATACGCAGCCTCTGTGAAGGGGCGGTTCACT
ATTAGTAGAGACGATAGCAAGAACAGCGCCTATCTGCAGATGAA
TAGCCTGAAGACCGAAGATACAGCCGTCTACTATTGTACAGCTC
AGTTTGCATACTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTGACCGTCAGCTCC
(SEQ ID NO: 17)

30

それによりコードされるタンパク質配列 (115aa) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAPG
KGLEWVAQIRNKPNYETETEAASVKGRFTISRDDSKNSAYLQMNSL
KTEDTAVYYCTAQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 18)

40

軽鎖可変領域のDNA配列 (321bp) :

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCTTCTCTGTCCGCATCT
GTGGGAGACCGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAGAACA
TCTACGGCGGCCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAAGC
TCCCAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACCTCCCTGGCATCTGGAG
TGCCATCCCGGTTTCAGTGGATCAGGCAGCGGGACCGACTATACT
CTGACCATTAGCTCCCTGCAGCCTGAAGACTTCGCCACATACTA
TTGCCAGAACGTGCTGAGGTCCCCATTACCTTTGGATCTGGCA
CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 19)

10

それによりコードされるタンパク質配列 (107aa) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYGGLNWWYQQKPGKA
PKLLIYGATSLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQNV
LRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)

20

4. 8D2ヒト化モノクローナル抗体8D2H2L15の軽鎖および重鎖配列
重鎖可変領域のDNA配列 (345bp) :

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGC
AGCCAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
CTTCACCTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGG
CACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAA
CAAACCTTACAACCTACGAACTTACTACAGCGCCTCCGTGA
AGGGGCGGTTACCATTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGT
GTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACCGAGGATACAGG
AGTCTACTATTGTACCGCACAGTTTGCTTATTGGGGGCAGG
GCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 13)

30

それによりコードされるタンパク質配列 (115aa) :

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVR
QAPGKGLEWLAQIRNKPYNYYETYYSSASVKGRFTISRDDSKNSV
YLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID
NO: 14)

40

軽鎖可変領域のDNA配列 (321bp) :

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCCAGCTCCCTGTCCGC
TTCTGTGGGCGATCGGGTCACTATCACCTGTAGAACCAGCG
AGAACATTTACGGCGGACTGAATTGGTATCAGAGGAAGCCC
GGGAAAAGTCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACAAACCT
GGCCTCCGGCGTGTCTAGTCGCTTCAGTGGATCAGGCAGCG
GGACCGACTATACACTGACTATTTCAAGCCTGCAGCCAGAG
GATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGAGCCGGCA
CCCCGGATTTGGCTCAGGGACCAAACTGGAAATTAAG (SEQ
ID NO: 21)

10

それによりコードされるタンパク質配列 (107aa) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSENIYGGLNWDYQRP
GKSPKLLIYGATNLSGVSSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDVAT
YYCQNVLSRHPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)

20

5. 8D2ヒト化モノクローナル抗体8D2H2L17の軽鎖および重鎖配列
重鎖可変領域のDNA配列 (345bp) :

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGC
AGCCAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
CTTCACCTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGG
CACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAA
CAAACCTTACAACCTACGAACTTACTACAGCGCCTCCGTGA
AGGGGCGGTTACCATTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGT
GTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACCGAGGATACAGG
AGTCTACTATTGTACCGCACAGTTTGCTTATTGGGGGCAGG
GCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 13)

30

それによりコードされるタンパク質配列 (115aa) :

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVR
QAPGKGLEWLAQIRNKPYNLYETYYASVKGRFTISRDDSKNSV
YLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
NO: 14)

40

軽鎖可変領域のDNA配列 (321bp) :

**GACATCCAGATGACTCAGTCACCCAGCTCCCTGAGTG
CTTCAGTGGGCGATCGGGTCACTATCACCTGTAGAACCAGC
GAGAACATTTACGGCGGACTGAATTGGTATCAGAGGAAGCC
CGGGAAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACAAACC
TGGCCTCCGGCGTGTCTAGTCGCTTCAGCGGCAGCGGCTCT
GGAACCGACTATACTGACTATTTCAAGCCTGCAGCCAGA
GGATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGTCCTCTC
GACCCGGATTTGGCAGTGGGACCAAACCTGGAAATTAAG
(SEQ ID NO: 23)**

10

それによりコードされるタンパク質配列 (107aa) :

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRTSENIYGGLNWDYQRP
GKSPKLLIYGATNLSGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT
YYCQNVLSSRPFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 24)**

20

〔実施例4〕8D2組み換え抗体、8D2 (Re) および8D2ヒト化抗体、8D2H1L1、8D2H2L3、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の調製およびSDS-PAGEによる検出

1. 8D2組み換え抗体、8D2 (Re) の調製およびSDS-PAGEによる検出

8D2の、重鎖のcDNA配列 (その可変領域配列は配列番号5で示す。) および軽鎖のcDNA配列 (その可変領域配列は配列番号7で示す。) をpUC57simpleベクター (Genscript Co. により提供) にそれぞれクローニングし、その結果、プラスミドpUC57simple-8D2HおよびpUC57simple-8D2Lを得た。

30

【0107】

プラスミドpUC57simple-8D2HおよびpUC57simple-8D2Lをエンドヌクレアーゼ (HindIIIおよびEcoRI) でそれぞれ消化した。電気泳動を介して回収した重鎖および軽鎖をコードする断片を個別にpCDNA3.1ベクターにサブクローニングした。組み換えプラスミドを抽出し、293Fの細胞に同時遺伝子移入した。細胞培養7日後、培養液を高速遠心、細孔フィルター膜を通じた真空ろ過およびHiTrapプロテインA HPカラム上での精製に供した。精製試料をタンパク質電気泳動用の還元性ローディング緩衝液およびタンパク質電気泳動用の非還元性ローディング緩衝液に添加した。沸騰後、SDS-PAGEにより検出を行った。図3で示されるように、関心のあるタンパク質が、還元性タンパク質試料の場合は約50kDおよび25kDの2本のバンドとして、または、非還元性タンパク質試料の場合は約150kDのバンドとして示されることが分かる。

40

【0108】

2. 8D2ヒト化抗体、8D2H1L1、8D2H2L2および8D2H3L3の調製およびSDS-PAGEによる検出

8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の、重鎖のcDNA配列 (それらの可変領域配列は、それぞれ配列番号9、配列番号13、配列番号17、配列番号13、配列番号13で示される。) および軽鎖のcDNA配列 (それらの可変領域配列は、それぞれ配列番号11、配列番号15、配列番号19、配列番号21、配列番号23で示される。) をpUC57simpleベクター (G

50

enscript Co. により提供) にそれぞれクローニングし、その結果、プラスミド pUC57 simple-8D2H1L1、pUC57 simple-8D2H2L2、pUC57 simple-8D2H3L3、pUC57 simple-8D2H2L15 および pUC57 simple-8D2H2L17 を得た。8D2 (Re) に対する上記の手順に従い、これらを個別に pCDNA3.1 ベクターにサブクローニングした。

【0109】

組み換えプラスミドを 293F の細胞に遺伝子移入した。8D2 (Re) に対する上記の手順に従い精製した後、293F 細胞の培養液を検出に供した。結果は、図 4、図 5、図 6、図 7 および図 8 で示す。還元性タンパク質試料は、約 50 kD および 25 kD の 2 本のバンドとして関心のあるタンパク質を示し、非還元性タンパク質試料は、約 150 kD のバンドとして関心のあるタンパク質を示した。

10

【0110】

この実施例に記載の手順に従い、次の実施例で使用する 8D2 組み換え抗体、8D2 (Re) および 8D2 ヒト化抗体、8D2H1L1、8D2H2L3、8D2H3L3、8D2H2L15 および 8D2H2L17 を調製した。

【0111】

〔実施例 5〕 抗体の動的パラメーターの決定

Fortebio 分子相互作用分析装置を使用して、抗原 CTLA4 (配列番号 25 で示されるようなコード核酸配列および配列番号 26 で示されるようなコードされるアミノ酸配列を有する、NCBI 遺伝子 ID: 1493) に対する抗体 8D2 およびヒト化 8D2H1L1、8D2H2L2 および 8D2H3L3 の結合の動的パラメーターを決定した。

20

【0112】

1. CTLA4-mFc タンパク質 (CTLA4 ECD-mFc の合成について実施例 1 に記載のものと同一方法に従い、CTLA4-mFc を作製した。) を TEV プロテアーゼで切断し、カラム上での精製によって CTLA4 抗原を得た。

【0113】

CTLA4 遺伝子の配列 (636 bp) :

ATGGGCGTCCTGCTGACTCAGAGAACCCTGCTGTCCCTGGT
GCTGGCACTGCTGTTTCCTTCAATGGCTTCAATGGCTATGCATG
TGGCTCAGCCAGCAGTGGTCCTGGCAAGCTCCAGGGGGGATCGC
CAGTTTCGTGTGCGAGTACGCCTCACCTGGAAAGGCTACAGAAG
TCCGGGTGACTGTCCTGAGACAGGCTGACTCTCAGGTGACCGA
GGTCTGCGCCGCTACATATATGATGGGCAACGAACTGACCTTTC
TGGACGATTCCATTTGTACTGGCACCTCTAGTGGGAACCAAGTG
AATCTGACTATCCAGGGACTGCGAGCAATGGACACCGGACTGTA
CATTTGCAAAGTGGAGCTGATGTATCCCCCTCCATACTATCTGG
GCATCGGGAATGGAACACAGATCTACGTGATTGATCCCGAACCT
TGTCCAGACAGCGATTTCCCTGCTGTGGATTCTGGCAGCCGTGTC
AAGCGGCCTGTTCTTTTATAGCTTTCTGCTGACTGCCGTCTCCCT
GTCTAAGATGCTGAAGAAACGATCCCCCCTGACCACAGGGGTG
GTCGTGAAAATGCCACCTACCGAGCCCGAGTGCGAAAAACAGTT

10

20

CCAGCCATACTTTATCCCTATCAAT (SEQ ID NO: 25)

コードされる対応するアミノ酸配列 (212aa) :

MGVLLTQRLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGI
ASFVCEYASPGKATEVRVTVLRLQADSQVTEVCAATYMMGNELTFL
DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIG
NGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLK
KRSPLTTGVVVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO: 26)

30

2. アミノカップリングにより、AR2Gセンサーの表面上に、抗体8D2およびそのヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17を固定し、エタノールアミンでブロッキングした。PBST中での平衡化後、結合のためにCTLA4抗原を添加した。CTLA4をPBST中で連続2x希釈し、次の濃度：300、150、75、37.5、18.75、9.38、4.69、0nMを得た。PBST中で解離が起こった。8D2と同じ方法によって、ヒト化抗体8D2H1L1、H2L2、H3L3、H2L15およびH2L17を検出し、抗原濃度は、180、90、45、22.5、11.25、5.625、2.813、0nMであった。

40

【0114】

抗体8D2およびそのヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の動的パラメーターを表1で提供し、動的特性パラメーターを決定した結果は、それぞれ図9から14で示す。

【表 1】

表1. 抗体8D2、8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の動的パラメーター

抗体名	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	K_o エラー	K_{dis} (1/s)	K_{dis} エラー
8D2	1.66E-10	1.42E+05	1.22E+03	2.36E-05	2.09E-06
8D2 H1L1	6.08E-10	3.40E+05	1.17E+04	2.07E-04	1.81E-05
8D2 H2L2	9.55E-10	4.07E+05	1.59E+04	3.88E-04	1.60E-05
8D2 H3L3	1.05E-09	3.12E+05	1.01E+04	3.27E-04	1.41E-05
8D2	1.02E-09	4.54E+05	8.18E+03	4.65E-04	9.50E-06
H2L15					
8D2	7.66E-10	4.59E+05	8.21E+03	3.52E-04	8.30E-06
H2L17					
10D1	1.21E-09	4.67E+05	1.15E+04	5.65E-04	1.51E-05
11.2.1	9.03E-10	3.87E+05	5.46E+03	3.49E-04	7.32E-06

K_D 、親和性定数； k_{on} 、抗原-抗体結合速度； k_{dis} 、抗原-抗体解離速度； $K_D=k_{dis}/k_{on}$ 。

【0115】

結果から、6種類の抗体の全てが抗原に対して良好な親和性を有し、対照抗体10D1および11.2.1に匹敵するかまたはこれよりさらに優れていることが明らかになる。

【0116】

〔実施例6〕フローサイトメトリーによる、ハイブリドーマ細胞株の表面上の抗原CTLA4に結合するための抗体の活性の判定

最初に、CTLA4抗原を発現する293F宿主細胞を作製し、それぞれ本発明において調製した、モノクローナル抗体8D2（実施例1）および8D2（Re）および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2および8D2H3L3（実施例4）で標識した。次いで、フローサイトメトリーにより、細胞表面上のネイティブ高次構造を有する抗原への抗体の特異的結合能を確認した。

【0117】

具体的な段階を以下で提供する。

【0118】

1. CTLA4抗原を発現する293F宿主細胞の作製

リポフェクタミン遺伝子移入キット（Invitrogen Co. より購入）を使用して、CTLA4に対するプラスミドpLenti6.3-CTLA4（ベクターpLenti6.3はInvitrogen Co. より購入）を用いて293Fの細胞に遺伝子移入した。スクリーニング後、CTLA4（293F-CTLA4）を安定に発現する細胞のクローン集団（293F-CTLA4）を得た。

【0119】

2. 抗体での標識およびフローサイトメーターを用いた検出

従来法に従い、上記段階により得られたCTLA4抗原を発現する293F宿主細胞をトリプシンで消化し、 2×10^5 個の細胞を各回収チューブに添加した。1%BSAを含

10

20

30

40

50

有するPBS中の8D2抗体の希釈溶液を調製して、それぞれ20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nMおよび0 nMの濃度を得た。CTLA4を発現する293F細胞との氷上での2時間の温置後、100 μ LのFITC-ヤギー抗マウスIgG(1:500)を各チューブに添加し、このチューブを氷上で1時間温置した。300 μ L PBSの添加後、フローサイトメーター上でFITCチャネルを用いて蛍光シグナルを検出した。他の抗体を8D2抗体に対するものと同様の方法で検出した。

【0120】

3. 結果

293F-CTLA4細胞上でのCTLA4の発現を確認した結果を図15および図16でそれぞれ示す。293F細胞に対する抗体8D2、8D2(Re)および3種類のヒト化抗体の結合の結果を図17から21でそれぞれ示す。これらの図で示されるように、8D2抗体およびそのヒト化抗体は、293F宿主細胞の表面上でCTLA4標的タンパク質に効率的に結合し得、それらの結合効率は用量依存性である。各用量での蛍光強度を表2で提供する。

【0121】

結合した抗体8D2およびそのヒト化抗体の蛍光定量分析での曲線シミュレーションによって8D2およびそのヒト化抗体の、結合効率、 EC_{50} を得たが、それを表3で示す。

【表2】

表2. フローサイトメトリーによる、293F-CTLA4宿主細胞の表面上でのCTLA4抗原に対する8D2、8D2(Re)および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2および8D2H3L3の結合を判定する蛍光強度分析

	8D2	8D2(Re)	8D2H1L1	8D2H2L2	8D2H3L3
濃度 (nM)	蛍光強度				
0.001	7.60	24.62	10.84	10.85	10.85
0.01	7.70	24.72	10.85	32.48	25.14
0.1	9.10	66.72	21.25	124.03	108.29
1	25.50	321.27	103.04	624.65	623.25
5	182.60	713.87	558.75	972.03	970.80
10	638.60	897.63	943.84	1159.24	1084.74
25	721.80	873.24	1170.64	1132.39	1091.77

【表3】

表3. フローサイトメトリーによる分析における曲線シミュレーションによって得られた、293F-CTLA4宿主細胞の表面上のCTLA4抗原に対する8D2、8D2(Re)および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2および8D2H3L3の、結合効率、 EC_{50}

	8D2	8D2(Re)	8D2H1L1	8D2H2L2	8D2H3L3
EC_{50} (nM)	3.84	1.38	5.06	4.37	4.54

【0122】

結果から、抗体8D2、8D2(Re)および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2および8D2H3L3が全て、293F-CTLA4宿主細胞の表面上のCTLA4抗原に結合する、非常に強い能力があることが明らかになる。

【0123】

〔実施例7〕ELISAによる、CTLA4抗原に結合するための抗体の活性の判定

4℃で一晩、ELISAプレートをCTLA4で被覆した。37℃で2時間、1%BSAでブロッキングした後、CTLA4抗体8D2、8D2(Re)および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17および対照抗体10D1(Alan J. Korman, Edward L. Halkら、HUMAN CTLA-4 ANTIBODIES, 米国特許第6984720号明細書)および11.2.1(Douglas Charles Hanson, Mark Joseph Neveuら、Human monoclonal antibodies to CTLA-4, 米国特許第682736号明細書)を30分にわたる反応のために添加した。酵素複合二次抗体を30分にわたる温置のために添加した。次いで、ELISAプレートリーダー上で450nmでの吸収を決定した。

10

【0124】

CTLA4抗原に対する8D2抗体およびそのヒト化抗体の結合を検出した結果は図2から25でそれぞれ示す。これらの図で示されるように、抗体8D2、8D2(Re)および8D2ヒト化抗体は全て、CTLA4タンパク質に効率的に結合し得、それらの結合効率は用量依存性である。各用量での蛍光強度を表4から8で提供する。結合した8D2、8D2(Re)およびヒト化抗体の蛍光定量分析での曲線シミュレーションによって、8D2、8D2(Re)およびヒト化抗体の、結合効率、 EC_{50} を得た(表9)。

【表4】

20

表4. マウスCTLA4への8D2および8D2(Re)の結合(ELISA)

抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	抗原被覆: $0.5 \mu\text{g/mL}$ のマウスCTLA4					
	8D2		8D2(Re)		10D1	
1	2.823	2.682	2.672	2.769	2.995	2.975
0.3	2.806	2.763	2.690	2.735	2.852	2.900
0.1	2.754	2.718	2.796	2.685	2.429	2.538
0.03	2.336	2.381	2.305	2.259	1.507	1.704
0.01	1.614	1.560	1.397	1.446	0.673	0.794
0.003	0.784	0.760	0.662	0.674	0.292	0.328
0.001	0.358	0.355	0.315	0.321	0.136	0.142
0	0.063	0.052	0.053	0.046	0.046	0.050
二次抗体	ヤギ抗マウス二次抗体				ヤギ抗ヒト二次抗体	

30

40

表5. ヒトCTLA4への8D2、8D2H1L1および8D2 (Re) の結合 (ELISA)

20

表6. ヒトCTLA4への8D2H2L2および8D2H3L3の結合 (ELISA)

40

【表 7】

表7. サルCTLA4への8D2H2L2および8D2H3L3の結合 (ELISA)

抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	抗原被覆: 0.25 $\mu\text{g/mL}$ のサルCTLA4-hFc							
	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
1	1.576	1.624	1.235	1.321	1.788	1.846	1.718	1.632
1:3	1.223	1.199	0.921	0.873	1.250	1.344	1.540	1.460
1:9	0.793	0.775	0.654	0.724	0.845	0.868	1.114	1.054
1:27	0.471	0.426	0.441	0.403	0.429	0.402	0.625	0.665
1:81	0.220	0.230	0.239	0.218	0.190	0.191	0.297	0.313
1:243	0.114	0.117	0.123	0.119	0.104	0.108	0.130	0.172
1:729	0.071	0.076	0.088	0.096	0.063	0.067	0.082	0.094
0	0.048	0.048	0.048	0.050	0.049	0.053	0.048	0.051
二次抗体	HRP複合ヤギ抗ヒトIgG、F(ab') ₂ 二次抗体							

【表 8】

表8. ヒトCTLA4への8D2H2L15および8D2H2L17の結合 (ELISA)

抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	抗原被覆: 0.5 $\mu\text{g/mL}$ のCTLA4											
	8D2 H2L2 20150327		8D2 H2L15		8D2 H2L17		10D1		11.2.1		8D2H2L2 20140422	
1 $\mu\text{g/mL}$	2.34	2.37	2.58	2.55	2.61	2.81	2.56	2.74	2.75	2.69	2.23	2.40
1:3	2.22	2.09	2.6	2.72	2.73	2.78	2.42	2.44	2.56	2.66	2.09	2.07

			5									
1:9	2.03	1.87	2.7 9	2.45	2.59	2.73	2.20	2.20	2.69	2.44	1.92	1.95
1:27	1.82	1.93	2.4 3	2.21	2.41	2.28	1.81	1.70	2.13	2.28	1.47	1.63
1:81	1.10	1.17	1.9 5	1.83	1.80	1.68	1.03	1.09	1.37	1.53	1.10	1.01
1:243	0.65	0.58	1.0 5	1.02	1.14	1.19	0.51	0.53	0.75	0.79	0.49	0.50
1:729	0.26	0.21	0.5 3	0.44	0.57	0.50	0.21	0.24	0.32	0.31	0.23	0.20
0	0.04	0.05	0.0 5	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
二次抗体:HRP複合ヤギ抗ヒトIgG(1:5000)												

10

20

【表 9】

表9:ELISAによる分析における曲線シミュレーションによって得られた、CTLA4抗原に対する、8D2、8D2(Re)および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の、結合効率、EC₅₀

	CTLA4 抗原の由来	抗体 EC50 (nM)	10D1 EC50 (nM)	11.2.1 EC50 (nM)
8D2	マウス	0.015	0.062	0.023
		0.071	0.24	
8D2(Re)	マウス	0.015	0.062	0.023
		0.085	0.24	
8D2H1L1	マウス	0.025	0.062	0.023
8D2H2L2	ヒト	0.12	0.125	0.09
8D2H2L2	ヒト	0.082	0.125	0.09
8D2H2L2	ヒト	0.118	0.125	0.09

30

40

8D2H3L3	ヒト	0.129	0.125	0.09
8D2H2L2	サル	0.227	0.258	0.075
8D2H3L3	サル	0.385	0.258	0.075
8D2H2L15	ヒト	0.042	0.138	0.075
8D2H2L17	ヒト	0.047	0.138	0.075

注意：8D2H2L2は3つ組で測定した。

10

【0125】

上記の結果から、抗体8D2および8D2（Re）が対照抗体10D1および11.2.1よりも良好な効率でマウスCTLA4抗原に結合することが明らかになる。ヒト化抗体8D2H1L1は、対照抗体10D1よりも強く、11.2.1と匹敵する効率でマウスCTLA4抗原と結合する。

【0126】

ヒト化抗体8D2H2L2は、10D1に匹敵する効率でヒトCTLA4抗原に結合する。ヒト化抗体8D2H2L2および8D2H3L3は、10D1に匹敵する効率でサルCTLA4抗原に結合する。ヒト化抗体8D2H2L15および8D2H2L17は、対照抗体10D1および11.2.1よりも顕著に強い効率でヒトCTLA4抗原と結合する。

20

【0127】

〔実施例8〕競合的ELISAによる、CTLA4抗原に対する結合についてB7-1／2と競合するための抗体の活性の検出

1. ELISAによる、CTLA4抗原に対する結合についてB7-1と競合するための抗体の活性の検出

4℃で一晩、B7-1でELISAプレートを被覆した。1%BSAで37℃にて2時間ブロッキングした後、抗CTLA4抗体、すなわちモノクローナル抗体8D2および8D2（Re）および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17ならびに対照抗体10D1および11.2.1を添加した。10分間温置した後、CTLA4-mFcを添加した。37℃で40分間温置した後、酵素複合二次抗体を添加した。37℃で30分間温置した後、ELISAプレートリーダー上で450nmでの吸収を検出した。

30

【0128】

2. ELISAによる、CTLA4抗原に対する結合についてB7-2と競合するための抗体の活性の検出

4℃で一晩、CTLA4-mFcでELISAプレートを被覆した。1%BSAで37℃にて2時間ブロッキングした後、抗CTLA4抗体、すなわちモノクローナル抗体8D2および8D2（Re）および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17ならびに対照抗体10D1および11.2.1を添加した。10分間温置した後、B7-2-hisを添加した。37℃で40分間温置した後、酵素複合二次抗体を添加した。37℃で30分間温置した後、ELISAプレートリーダー上で450nmでの吸収を検出した。CTLA4抗原に対する8D2、8D2（Re）およびヒト化抗体の結合を検出した結果は図26から31でそれぞれ示す。これらの図で示されるように、8D2、8D2（Re）抗体および8D2ヒト化抗体は、CTLA4プレオテイン（preotein）に効率的に結合し得、それらの結合効率は用量依存性である。各用量での蛍光強度を表10から16で提供する。結合した抗体8D2、8D2（Re）およびヒト化抗体の蛍光定量分析での曲線シミュレーションによって、8D2、8D2（Re）およびヒト化抗体の、結合効率、EC₅₀を得た（表1

40

50

7)。

【表 1 0】

表10. 8D2および8D2 (Re) はELISAにおいてB7-1と競合する

抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	抗原被覆: $0.2 \mu\text{g/mL}$ のCTLA4-mFc			
	8D2		8D2 (Re)	
3	0.163	0.149	0.176	0.215
1	0.208	0.188	0.200	0.214
0.3	0.354	0.347	0.355	0.390
0.1	0.680	0.695	0.668	0.721
0.03	1.378	1.262	1.430	1.708
0.01	1.758	1.612	1.630	1.824
0.003	1.982	1.711	1.890	1.937
0	2.228	1.766	1.805	1.779
B7/1-hFc ($0.3\mu\text{g/mL}$)				
二次抗体	ヤギ抗ヒト二次抗体			

10

20

【表 1 1】

表11. 8D2、8D2H1L1および8D2 (Re) はELISAにおいてB7-1と競合する

抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	被覆: $0.2 \mu\text{g/mL}$ のB7/1-hFc							
	10D1		11.2.1		8D2 H1L1		CTLA4-mFc ($0.6\mu\text{g/mL}$) 1:2	
3	0.168	0.158	0.101	0.105	0.123	0.138	0.824	0.791

30

1:3	0.258	0.232	0.119	0.133	0.206	0.231	0.640	0.768
1:9	0.515	0.466	0.381	0.485	0.445	0.529	0.750	0.717
1:27	0.577	0.508	0.597	0.579	0.509	0.659	0.653	0.626
1:81	0.801	0.730	0.650	0.613	0.669	0.723	0.571	0.522
1:243	0.814	0.848	0.900	0.520	0.841	0.821	0.459	0.327
1:729	0.854	0.732	0.993	0.841	0.848	0.822	0.312	0.232
0	0.856	0.812	0.826	0.550	0.672	0.600	0.071	0.074
抗原	CTLA4-mFc 0.3μg/mL						対照	
二次抗体	HRP複合ヤギ抗マウスIgG二次抗体							

10

【表 1 2】

表12. 8D2、8D2H1L1および8D2 (Re) はELISAにおいてB7-2と競合する

抗体濃度 μ g/mL	抗原被覆: 0.5 μ g/ml のCTLA4-mFc									
	10D1		11.2.1		8D2 H1L1		8D2		8D2 (Re)	
3	0.569	0.550	0.492	0.442	0.450	0.384	0.407	0.336	0.367	0.375
1:3	0.500	0.466	0.387	0.402	0.404	0.332	0.359	0.306	0.331	0.289
1:9	0.736	0.782	0.412	0.482	0.467	0.371	0.456	0.355	0.384	0.315
1:27	0.982	1.137	0.676	0.585	0.671	0.633	0.675	0.675	0.464	0.443
1:81	1.196	1.355	1.120	0.965	1.038	1.007	1.091	1.050	0.713	0.622
1:243	1.171	1.380	1.237	1.214	1.215	1.069	1.154	1.172	0.862	0.766
1:729	1.307	1.388	1.362	1.229	1.231	1.253	1.242	1.264	0.826	0.725
0	1.030	1.171	1.187	1.100	1.130	1.076	1.034	1.183	0.915	0.861
受容体	1 μ g/ml のB7/2-His									
二次抗体	HRP複合マウス抗His二次抗体									

20

30

40

【表 1 3】

表13. 8D2H2L2および8D2H3L3抗体はELISAにおいてB7-1と競合する

抗体濃度	被覆: 0.3 μ g/ml のB7/1-hFc
------	------------------------------

($\mu\text{g/mL}$)	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
5	0.207	0.232	0.187	0.202	0.166	0.172	0.080	0.089
1:3	0.346	0.267	0.286	0.327	0.210	0.194	0.090	0.097
1:9	0.625	0.702	0.416	0.388	0.486	0.548	0.160	0.138
1:27	0.577	0.727	0.590	0.503	0.673	0.621	0.488	0.369
1:81	0.830	0.743	0.747	0.617	0.663	0.647	0.698	0.660
1:243	0.707	0.760	0.673	0.768	0.652	0.775	0.755	0.900
1:729	0.780	0.882	0.840	0.842	0.705	0.691	0.909	0.793
0	0.577	0.752	0.632	0.745	0.732	0.909	0.683	0.735
抗原	0.3 $\mu\text{g/mL}$ の CTLA4-mFc							
二次抗体	HRP複合ヤギ抗マウスIgG二次抗体							

10

【表 1 4】

20

表14. 8D2H2L2および8D2H3L3抗体はELISAにおいてCTLA4への結合についてB7-2と競合する

抗体濃度	抗原被覆: 0.5 $\mu\text{g/mL}$ の CTLA4-mFc							
($\mu\text{g/mL}$)	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
1.5	0.377	0.376	0.417	0.432	0.449	0.408	0.372	0.494
1:3	0.616	0.537	0.540	0.511	0.553	0.602	0.437	0.348
1:9	0.988	0.927	0.548	0.614	0.806	0.788	0.479	0.412
1:27	1.085	1.038	0.717	0.728	0.969	0.890	0.622	0.529
1:81	1.227	1.059	1.010	0.951	0.974	0.916	0.805	0.649
1:243	1.136	1.066	1.255	1.160	0.935	0.921	0.930	0.754
1:729	1.218	1.158	1.239	1.162	1.108	1.045	0.981	0.746
0	1.094	1.068	1.198	1.214	1.082	1.047	0.987	0.819
リガンド	1 $\mu\text{g/mL}$ の B7/2-His							
二次抗体	HRP複合マウス抗His二次抗体							

30

40

【表 15】

表15. 8D2H2L15および8D2H2L17抗体はELISAにおいてCTLA4への結合についてB7-1と競合する

抗体 の 希釈	抗原被覆:0.5 μ g/mlのB7/1-hFc											
	8D2 H2L2 (20150327)		8D2 H2L15		8D2 H2L17		10D1		11.2.1		8D2 H2L2 (20140422)	
5 μ g/ml	0.09	0.10	0.07	0.07	0.06	0.07	0.08	0.11	0.06	0.06	0.12	0.14
1:3	0.13	0.14	0.07	0.07	0.06	0.07	0.33	0.24	0.09	0.08	0.26	0.24
1:9	0.29	0.26	0.07	0.09	0.08	0.08	0.71	0.78	0.33	0.30	0.45	0.49
1:27	0.66	0.58	0.70	1.03	0.89	0.93	1.11	1.17	1.14	1.19	1.06	1.10
1:81	0.69	0.62	0.68	1.18	0.97	0.79	1.16	1.35	1.17	1.20	1.09	1.09
1:243	0.66	0.64	0.75	1.13	1.05	0.99	1.27	1.48	1.30	1.31	1.19	0.99
1:729	0.69	0.64	0.74	1.07	1.25	1.35	1.33	1.56	1.32	1.31	1.16	1.12
0	0.59	0.66	0.53	1.09	1.18	1.18	1.33	1.29	1.28	1.30	1.11	1.04
リガンド	0.3 μ g/mlのCTLA4-mFc											
二次抗体	HRP複合マウス抗His二次抗体											

【表 16】

表16. 8D2H2L15および8D2H2L17抗体はELISAにおいてCTLA4への結合についてB7-2と競合する

抗体 の 希釈	2 μ g/mlのCTLA4-mFc											
	8D2 H2L2 20140422		8D2 H2L15		8D2 H2L17		10D1		11.2.1		8D2 H2L2 20150327	
1 μ g/ml	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05
1:3	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.07	0.07	0.05	0.05	0.47	0.37
1:9	0.15	0.16	0.17	0.19	0.06	0.12	0.44	0.35	0.17	0.16	0.65	0.58
1:27	0.55	0.59	0.42	0.48	0.50	0.57	0.73	0.70	0.57	0.57	0.79	0.70
1:81	0.76	0.84	0.75	0.75	0.77	0.81	0.85	0.86	0.84	0.76	0.86	0.77
1:243	0.84	0.79	0.83	0.84	0.82	0.87	0.86	0.89	0.84	0.85	0.83	0.84

10

20

30

40

50

1:729	0.77	0.76	0.94	1.00	0.97	0.98	0.99	0.91	0.87	0.85	0.82	0.80
0	0.77	0.78	0.92	0.97	0.81	0.82	0.76	0.96	0.91	0.80	0.80	0.76
リガンド	B7/2-His, 0.5 μ g/ml											
二次抗体	HRP複合マウス抗His二次抗体(1:4000)											

【表 17】

表17. 競合的ELISAによる分析における曲線シミュレーションによって得られた、B7との競合における、CTLA4抗原に対する、8D2、8D2(Re)および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の、結合効率、EC₅₀

	抗体 EC ₅₀ (nM)		10D1 EC ₅₀ (nM)		11.2.1 EC ₅₀ (nM)	
	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2
8D2	0.44	0.208	—	0.464	—	0.15
8D2 (Re)	0.514	0.153	—	0.464	—	0.15
8D2H1L1	2.478	0.178	1.91	0.464	1.691	0.15
8D2H2L2	5.932	1.643	5.15	2.056	1.073	0.172
8D2H2L2	2.973	0.368	—	—	—	—
8D2H2L2	3.118	0.301	—	—	—	—
8D2H3L3	2.144	0.167	5.15	2.056	1.073	0.172
8D2H2L15	1.973	0.227	4.586	0.629	2.606	0.349
8D2H2L17	1.787	0.296	4.586	0.629	2.606	0.349

注意:8D2H2L2は3つ組で試験した。

【0129】

上記の結果から、抗体8D2、8D2(Re)および8D2ヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の全てが、CTLA4抗原への結合についてB7と競合し得ることが明らかになった。特に、8D2、8D2(Re)、8D2H1L1および8D2H2L2は、CTLA4への結合についてのB7-2との競合において10D1よりも強力であり；一方で、8D2H2L17は、CTLA4への結合についてのB7-1およびB7-2の両方との競合において抗体10D1および11.2.1よりも強力である。

【0130】

〔実施例9〕細胞におけるモノクローナル抗体8D2およびヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17の生物学的活性の分析

末梢血単核細胞(PBMC)のIL-2発現におけるモノクローナル抗体8D2およびヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17および対照抗体10D1および11.2.1の効果を検出するために、ヘパリンナトリウムを含有する回収チューブに健康なドナーからの末梢血を回収した。P

B S 中での希釈および分離液上での遠心（2550 rpmで20分間）後、細胞懸濁液としてP B M Cを得た。S E B（1 μ g / m L） / P H A（30 μ l / m l）とともに細胞懸濁液を添加し、さらなる培養のために5 % C O₂を含有する飽和湿度の37℃のインキュベーターに置いた。R a j i リンパ球および抗体を添加した。48時間（h o u s）の同時温置後、P B M CをP B Sで2回洗浄し、細胞10,000個 / ウェルで96ウェルプレートに添加した。次いで、対応する濃度勾配の抗体を添加した。20分間の温置後、72時間の同時温置のために、細胞10,000個 / ウェルで、M M Cで1時間処理したR a j i 細胞を添加した。72時間の同時温置後、細胞培養物を上清のために回収し、キット（D a k e w e C o . , D K W 1 2 - 1 0 2 0 - 0 9 6）とともに提供される説明書に従い、E L I S A キットを使用して細胞同時培養物の上清中のI L - 2 発現プロファイルを検出した。 10

【0131】

統計学的分析後、実験の結果を図32および33で示す。モノクローナル抗体8D2について、T細胞群およびR a j i 細胞群と比較した場合、そのヒト化抗体8D2H1L1、8D2H2L2、8D2H3L3、8D2H2L15および8D2H2L17は全て、B7へのC T L A 4の結合を効果的に阻止し、Tリンパ球中でI L - 2 発現を改善し得る（図32および33）。特に、驚くことに、発明者らは、8D2H2L2、8D2H2L15および8D2H2L17が対照抗体10D1および11.2.1よりも顕著に優れていることを発見した。10nMの濃度で、これらは、100nMの濃度で10D1または11.2.1により達成されるものに匹敵するかまたはこれらよりさらに良好であるI L - 2 レベルに到達した。したがって、本発明の抗体は、より低い濃度、例えば約10nMでI L - 2 のレベルを上昇させ得る。 20

【0132】

〔実施例10〕モノクローナル抗体8D2H2L2のインビボ抗腫瘍活性

h u - S C I D - r a j i 動物モデルを使用して、8D2H2L2のインビボ抗腫瘍活性を評価した。F i c o l l 試薬を用いてヒト末梢血単核細胞（P B M C）を単離し、1 μ g / m l のS E Bを用いて3日間活性化した。次いで、1.25 $\times$ 10⁶個の活性化P B M Cを5 $\times$ 10⁶個のr a j i バーキットリンパ腫細胞および8D2H2L2（20mg / kg）と混合し、S C I D - ベージュマウスの背部に皮下注射した。同時に、1群あたり5匹の動物でアイソタイプ対照群を設定した。次に、週に1回、3週間連続で静脈内注射によって20mg / kgの用量を投与した。実験終了時まで、または腫瘍体積が1000mm³に到達するまで、腫瘍体積を週に2回測定した。 30

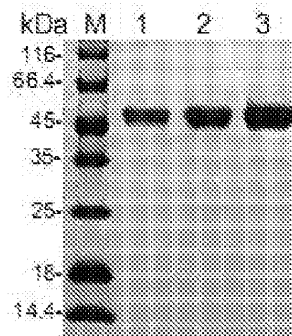
【0133】

図34で示されるように、8D2H2L2は、h u - S C I D - r a j i モデルにおいて腫瘍成長を著しく抑制し得た。この結果から、リンパ腫を処置するために臨床的にこの抗体を使用し得ることが示された。

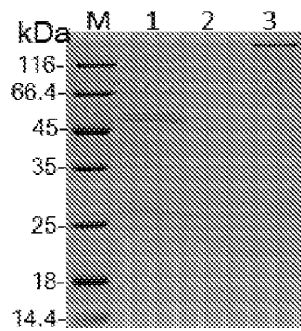
【0134】

本発明の具体的な実施形態を詳細に記載してきたが、当業者は、本明細書で開示される教示に照らして、様々な改変および変更が詳細に対してなされ得、これらが全て本発明の保護範囲に包含されることを理解しよう。本発明の全範囲は、添付の特許請求の範囲およびその何らかの同等物において定められる。 40

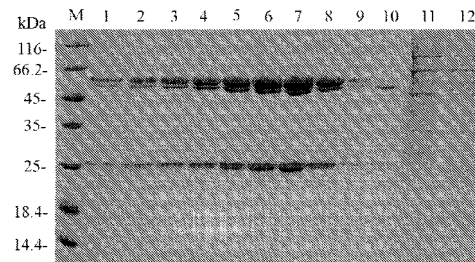
【図 1】



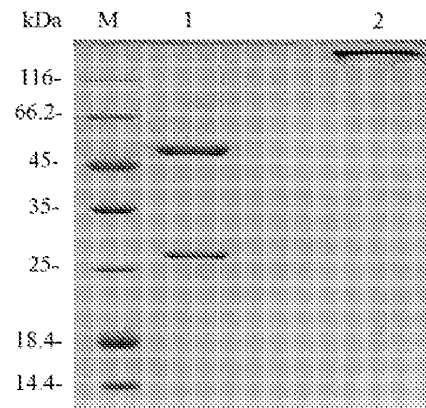
【図 2】



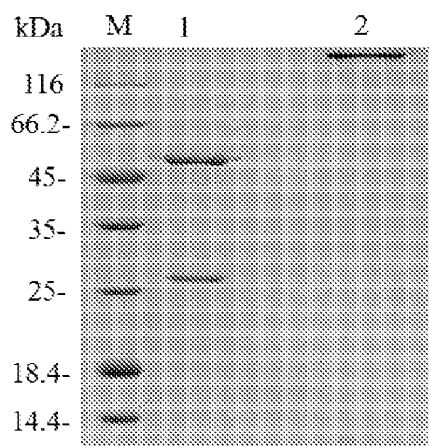
【図 3】



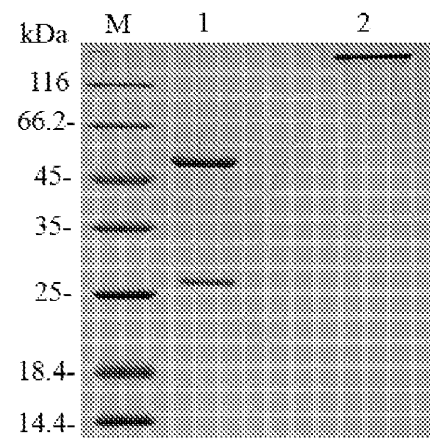
【図 4】



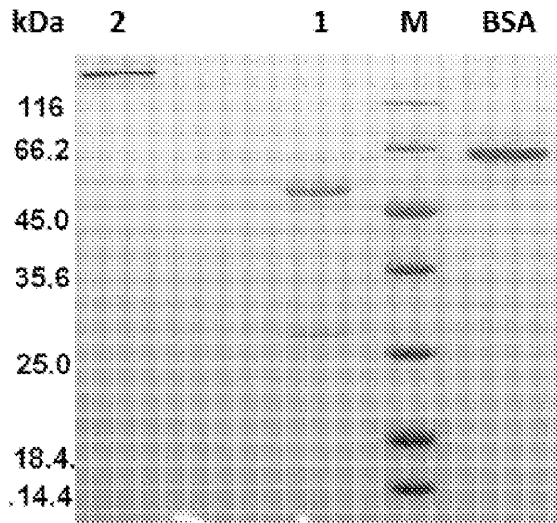
【図 5】



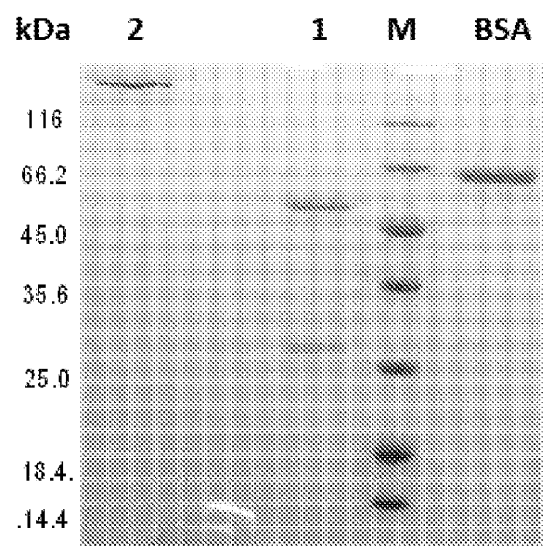
【図 6】



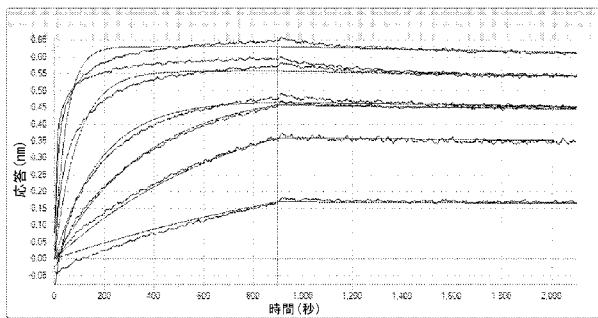
【図 7】



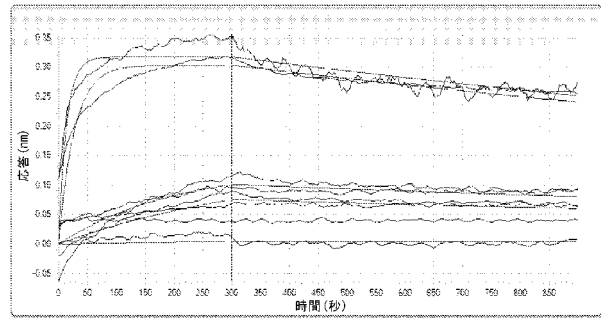
【図 8】



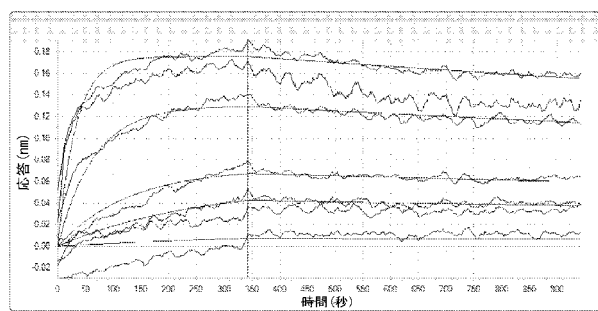
【図 9】



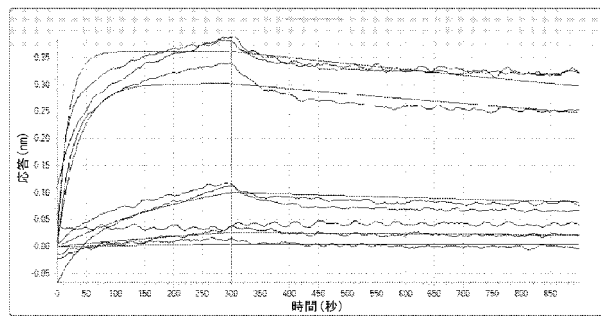
【図 11】



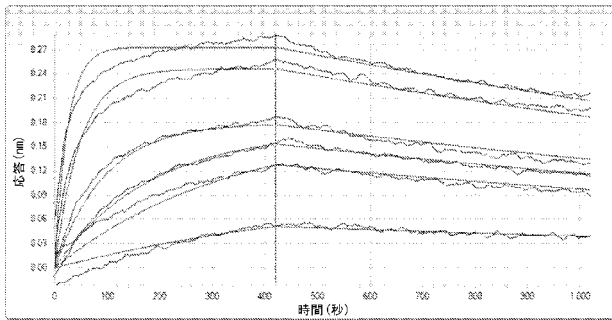
【図 10】



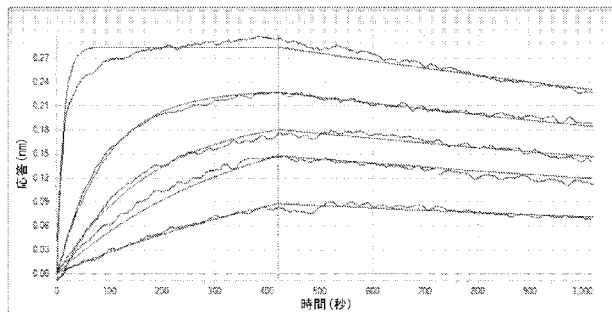
【図 12】



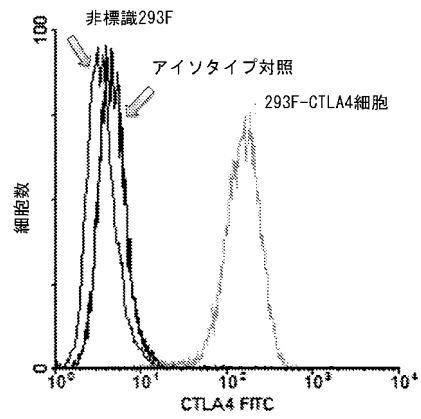
【図 1 3】



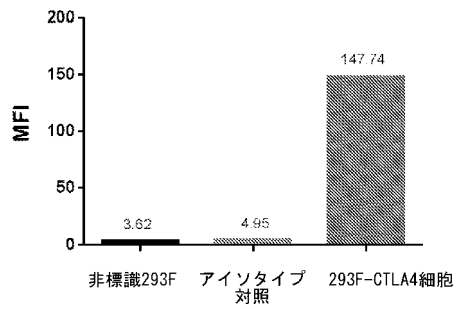
【図 1 4】



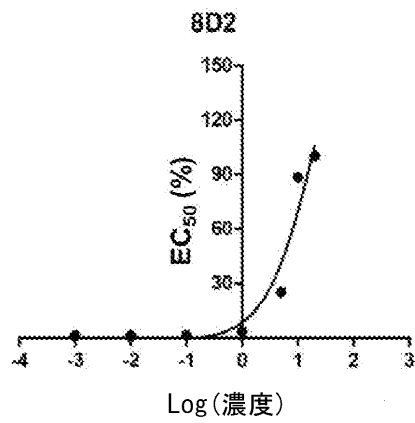
【図 1 5】



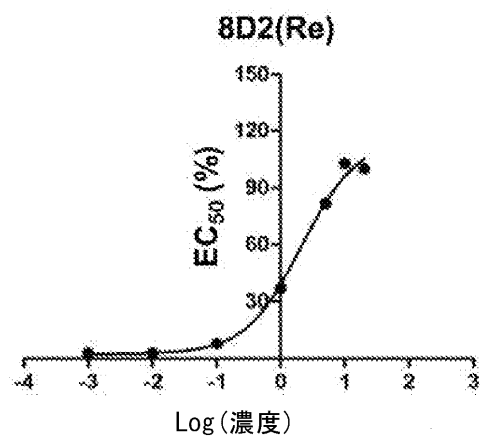
【図 1 6】



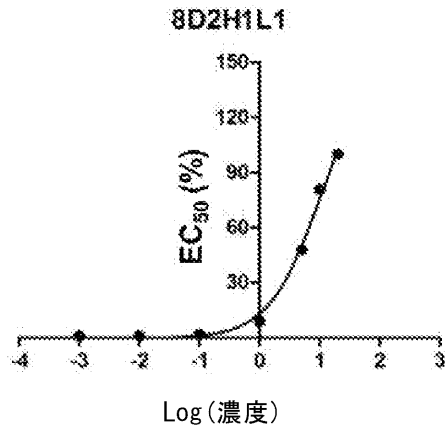
【図 1 7】



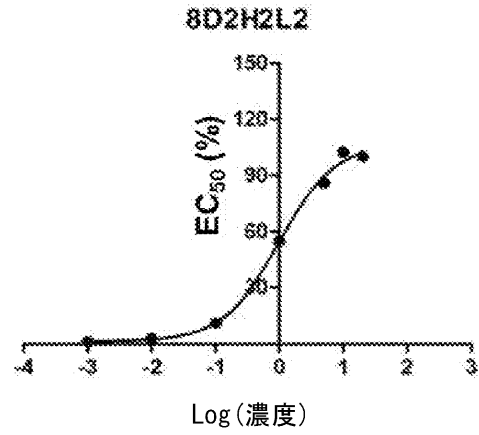
【図 1 8】



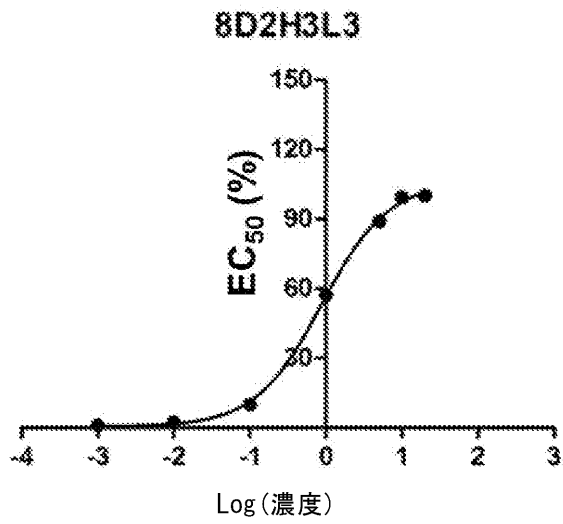
【図 19】



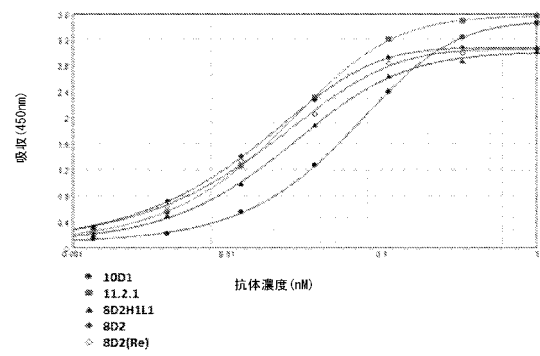
【図 20】



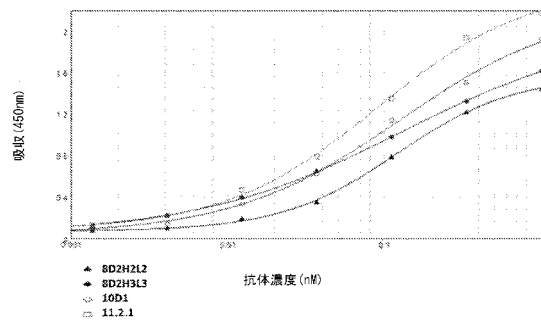
【図 21】



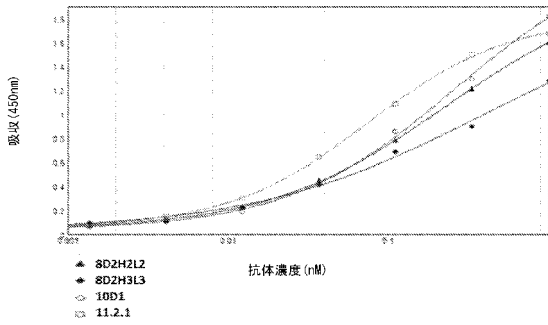
【図 22】



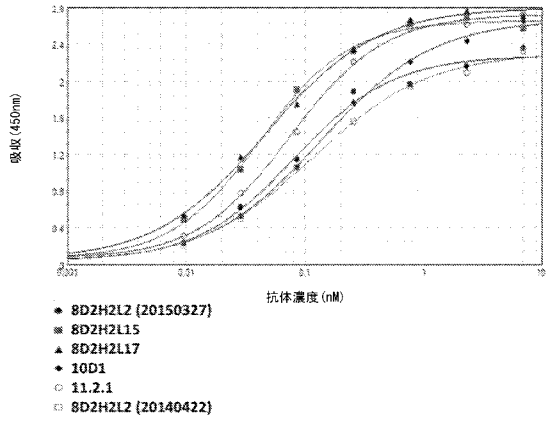
【図 23】



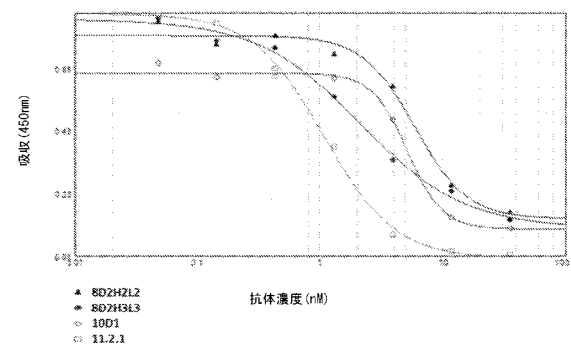
【図 2 4】



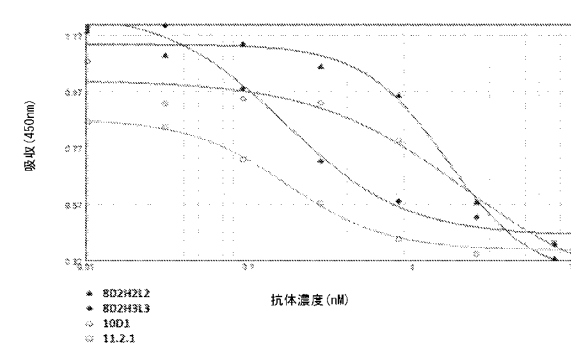
【図 2 5】



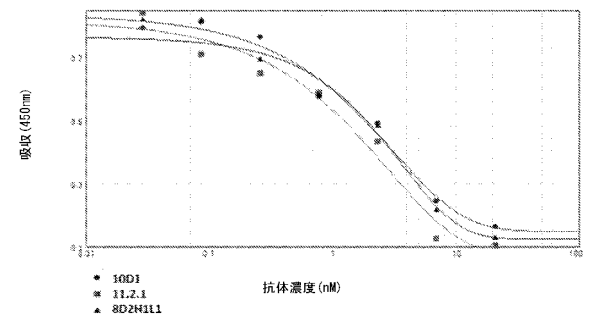
【図 2 8】



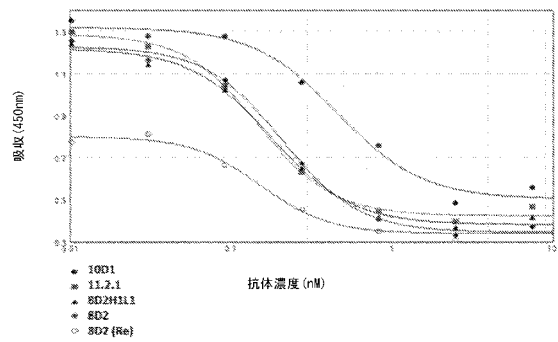
【図 2 9】



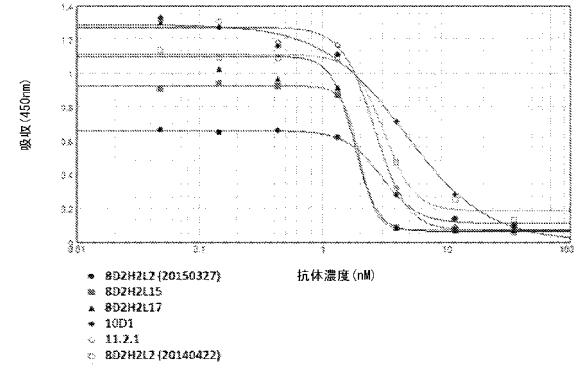
【図 2 6】



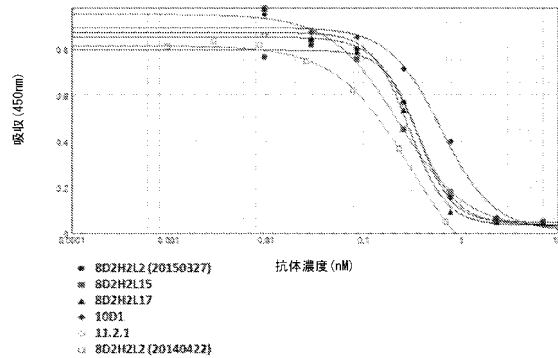
【図 2 7】



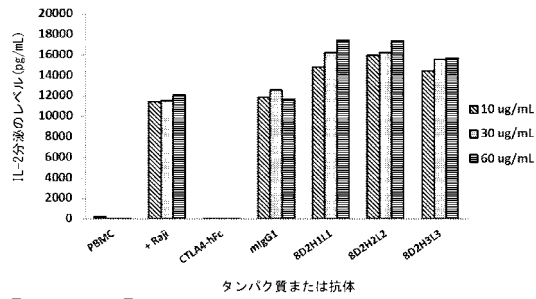
【図 3 0】



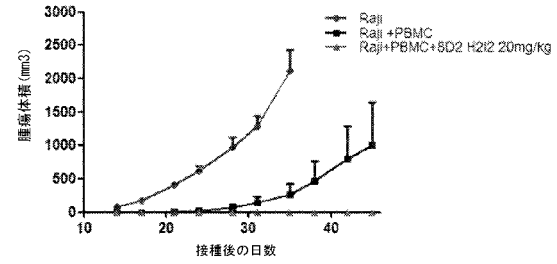
【図 3 1】



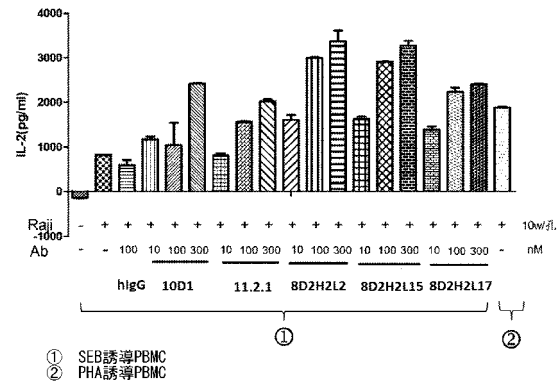
【図 3 2】



【図 3 4】



【図 3 3】



【配列表】

2019107018000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成31年2月28日(2019.2.28)

【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】

明細書に記載の発明。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/532 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	N
	G 0 1 N 33/532	A

(74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035
弁理士 五味渕 琢也

(74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文

(72)発明者 リー, バイヨン
中華人民共和国、5 2 8 4 3 7・ガンドン、ゾンシャン、トーチ・ディベロップメンタル・ゾーン
、シェンノン・ブルバード・6

(72)発明者 シア, ユー
中華人民共和国、5 2 8 4 3 7・ガンドン、ゾンシャン、トーチ・ディベロップメンタル・ゾーン
、シェンノン・ブルバード・6

(72)発明者 ワン, ジョンミン
中華人民共和国、5 2 8 4 3 7・ガンドン、ゾンシャン、トーチ・ディベロップメンタル・ゾーン
、シェンノン・ブルバード・6

(72)発明者 ジャーン, ペン
中華人民共和国、5 2 8 4 3 7・ガンドン、ゾンシャン、トーチ・ディベロップメンタル・ゾーン
、シェンノン・ブルバード・6

(72)発明者 パン, シンホワ

中華人民共和国、5 2 8 4 3 7・ガンドン、ゾンシャン、トーチ・ディベロップメンタル・ゾーン
、シェンノン・ブルバード・6

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA14

4B065 AA91X AB05 AC14 BA08 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 BB11 BB41 BB43 CC02 DD38

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA70 BA71 DA76 EA28 EA51

FA74

【外国語明細書】
2019107018000001.pdf