

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6745275号
(P6745275)

(45) 発行日 令和2年8月26日 (2020.8.26)

(24) 登録日 令和2年8月5日 (2020.8.5)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22
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 15 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-546179 (P2017-546179)	(73) 特許権者	500034653 ジェンザイム・コーポレーション アメリカ合衆国02142 マサチューセツ州 ケンブリッジ、ビニー・ストリート 50番
(86) (22) 出願日	平成28年3月3日 (2016.3.3)		
(65) 公表番号	特表2018-512124 (P2018-512124A)		
(43) 公表日	平成30年5月17日 (2018.5.17)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/020780		
(87) 国際公開番号	W02016/141245	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(87) 国際公開日	平成28年9月9日 (2016.9.9)	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
審査請求日	平成31年2月18日 (2019.2.18)	(72) 発明者	ホアウエイ・チウ アメリカ合衆国ニュージャージー州08807, ブリッジウォーター, メールコード : 55エー-505エー, コーポレートドライブ55, サノフィ
(31) 優先権主張番号	62/128, 149		
(32) 優先日	平成27年3月4日 (2015.3.4)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスフォーミング増殖因子β1に高親和性、アビディティおよび特異性で結合する修飾IgG抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

TGF-β1に結合する単離された結合タンパク質であって、該単離された結合タンパク質は、(i) 配列番号3に示される可変ドメイン(VL)アミノ酸配列を有する免疫グロブリン軽鎖(LC)および(ii) 配列番号1に示される可変ドメイン(VH)アミノ酸配列を有する免疫グロブリン重鎖(HC)を含むIgGまたはIgGのFabフラグメントであり、

(a) LC折れ曲がり領域が第1のリンカーを含むか、

(b) HC折れ曲がり領域が第2のリンカーを含むか、または

(c) (a)および(b)の両方であり、

第1のリンカーおよび第2のリンカーは、独立して、G、GG、GGS、GGGSまたはGGGGSを含む、

前記単離された結合タンパク質。

【請求項2】

前記HCが、ヒトIgG4アイソタイプのHCである、請求項1に記載の単離された結合タンパク質。

【請求項3】

前記HCが、S228P変異(EU番号)を含むヒンジ領域を含む、請求項2に記載の単離された結合タンパク質。

【請求項4】

前記 H C が、ヒト I g G 1 アイソタイプの H C である、請求項 1 に記載の単離された結合タンパク質。

【請求項 5】

前記 L C が、配列番号 1 6、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2 または 4 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の単離された結合タンパク質。

【請求項 6】

前記 H C が、配列番号 1 7、1 8、5 6、5 7、5 8 または 6 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された結合タンパク質。

【請求項 7】

前記 H C および L C が、

それぞれ、配列番号 1 8 および 3 9、

それぞれ、配列番号 1 8 および 4 0、

それぞれ、配列番号 1 8 および 4 1、

それぞれ、配列番号 1 8 および 4 2、

それぞれ、配列番号 1 8 および 4 3、

それぞれ、配列番号 5 6 および 3 8、

それぞれ、配列番号 5 6 および 3 9、

それぞれ、配列番号 5 6 および 4 0、

それぞれ、配列番号 5 6 および 4 1、

それぞれ、配列番号 5 6 および 4 2、

それぞれ、配列番号 5 6 および 4 3、

それぞれ、配列番号 5 7 および 3 8、

それぞれ、配列番号 5 7 および 3 9、

それぞれ、配列番号 5 7 および 4 0、

それぞれ、配列番号 5 7 および 4 1、

それぞれ、配列番号 5 7 および 4 2、

それぞれ、配列番号 5 7 および 4 3、

それぞれ、配列番号 5 8 および 3 8、

それぞれ、配列番号 5 8 および 3 9、

それぞれ、配列番号 5 8 および 4 0、

それぞれ、配列番号 5 8 および 4 1、

それぞれ、配列番号 5 8 および 4 2、

それぞれ、配列番号 5 8 および 4 3、

それぞれ、配列番号 6 1 および 3 8、

それぞれ、配列番号 6 1 および 3 9、

それぞれ、配列番号 6 1 および 4 0、

それぞれ、配列番号 6 1 および 4 1、

それぞれ、配列番号 6 1 および 4 2、または

それぞれ、配列番号 6 1 および 4 3、

を含む、請求項 1 に記載の単離された結合タンパク質。

【請求項 8】

単離された結合タンパク質は、T G F 1 に選択的に結合する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の単離された結合タンパク質。

【請求項 9】

有効量の請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の単離された結合タンパク質および薬学的に許容される賦形剤を含む、T G F 1 活性の阻害を必要とするヒトにおいて疾患を処置するための医薬組成物。

【請求項 10】

T G F 1 活性の阻害を必要とするヒトを処置するための、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の単離された結合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記ヒトが、TGF- β 1 活性に直接的または間接的に起因する疾患または状態を有し、該疾患が、

(i) 線維性疾患、がんまたは免疫媒介性疾患、

(i i) 骨リモデリング疾患、

(i i i) 腎臓疾患、または

(i v) びまん性全身性皮膚硬化症、

である、請求項 9 記載の組成物または請求項 1 0 記載の単離された結合タンパク質。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の単離された結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。 10

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドを含む、哺乳動物発現ベクター。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の発現ベクターを含む、TGF- β 1 に結合する結合タンパク質を生産するための組み換え宿主哺乳動物細胞。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の単離された結合タンパク質を作成する方法であって、

請求項 1 4 に記載の組み換え宿主細胞を適切な条件下で培養して、結合タンパク質を生産する工程を含む、前記方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本特許出願は、参照によって本明細書にその全体を組み入れる 2015 年 3 月 4 日に出版された米国仮特許出願第 62 / 128, 149 号の利益を主張する。

【0002】

修飾 IgG 抗体は、それぞれ第 1、第 2、第 3 および第 4 のポリペプチド鎖を含み、トランスフォーミング増殖因子- β 1 (TGF- β 1) に対して高い親和性およびアビディティを示すが、TGF- β 2 または TGF- β 3 には示さない。該修飾 IgG 抗体を含む組成物、および TGF- β 1 活性に関与する疾患の処置のための該組成物を使用する方法が提供される。 30

【背景技術】

【0003】

多くの重大な疾患が、TGF- β 誘導シグナル伝達経路の機能不全と関連している。例えば、TGF- β の組織レベルの増加は、特発性肺線維症および心筋線維症の発症の要因と考えられている。さらに、TGF- β の高い局所組織レベルは、いくつかの種類のがん細胞の維持および発達を可能にする。したがって、TGF- β シグナル伝達を下方制御することは、そのような腫瘍細胞の生存性を減少させうる。 40

【0004】

TGF- β アイソフォームは、2つのモノマーがジスルフィド結合を介して共有結合的に連結している、類似のフレームワーク構造を有する約 25 kDa のホモ二量体分子である。哺乳動物アイソフォームは、70 ~ 82 % の配列同一性を共有するが、血管発生および免疫細胞機能の制御における活性は重複していない。3種の TGF- β アイソフォーム、つまり TGF- β 1、TGF- β 2、および TGF- β 3 (それぞれ Swiss Prot 受託番号 P01137、P08112、および P10600) がヒトで報告されている。TGF- β 1 および TGF- β 3 は、TGF- β 受容体 I 型および II 型として知られる 2つの膜貫通受容体の細胞外ドメインに結合して、細胞シグナル伝達カスケードを引き起こす。TGF- β 2 は、TGF- β 受容体 I 型および II 型ならびに TGF- β 受容体 III 型に結合しうる 50

。

【0005】

ヒトTGF- β 1、TGF- β 2およびTGF- β 3に結合することができる抗体は、臨床適用のために試験されてきた。例えば、Grutterらは、悪性および線維性疾患を処置するための臨床開発においてヒトIgG4モノクローナル抗体であるGC1008 (Mab; 別言して、GC1008)を開示した。非特許文献1。GC1008は、ヒトTGF- β アイソフォームの3つ全てを中和することができるため、「汎特異的」TGF- β 中和抗体である。TGF- β 1を選択的に中和する抗体は、例えば、参照によって本開示に組み入れる特許文献1および特許文献2に開示されている。CAT192 (IgG4)としても知られるメリムマブは、TGF- β 1を選択的に中和するヒトIgG4モノクローナル抗体である。例えば、特許文献1を参照。メリムマブは、強皮症 (Scleroderma) としても知られるびまん性全身性皮膚硬化症 (diffuse cutaneous systemic sclerosis) の処置のために試験されたが、十分な効能は示されなかった。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第6,492,497号

【特許文献2】米国特許第7,151,169号

【非特許文献】

20

【0007】

【非特許文献1】Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、105 (51): 20251-56 (2008)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、ヒトTGF- β 1に選択的に結合して中和することができるTGF- β 1結合修飾IgG抗体を提供する。開示された修飾IgG抗体は、メリムマブから誘導されたものである。修飾IgG抗体のVHおよびVLドメインは、メリムマブのVHおよびVLドメインと同様のTGF- β 1結合親和性およびアビディティならびにTGF- β 1中和能力を示す。多くの場合に、開示された抗体は、メリムマブを超える改善された親和性、アビディティおよび中和能力をもたらす。一実施形態では、修飾IgG抗体は、それぞれCDドメインに連結しているVLドメインを含む2つのポリペプチド鎖、それぞれCH1ドメインに連結しているVHドメインを含む2つのポリペプチド鎖、ヒンジおよびFc領域を含む。

30

【0009】

本発明の修飾IgG抗体は、TGF- β 1に結合することができる可変ドメインを含む。別の実施形態では、開示された修飾IgG抗体は、表面プラズモン共鳴により測定されるヒトTGF- β 2に対する同じ結合タンパク質のKdよりも少なくとも約50%低いKdをヒトTGF- β 1に対して示す結合タンパク質を含む。

40

【0010】

別の実施形態では、本発明は、TGF- β 1に結合することができる可変ドメインを含む単離された結合タンパク質であって、表面プラズモン共鳴により測定されるヒトTGF- β 3に対する同じ結合タンパク質のKdよりも少なくとも約50%低いKdをヒトTGF- β 1に対して示す結合タンパク質を対象とする。

【0011】

さらなる実施形態では、本発明は、TGF- β 1に結合することができる可変ドメインを含む単離された結合タンパク質であって、表面プラズモン共鳴により測定されるヒトTGF- β 2に対する同じ結合タンパク質のKdよりも少なくとも約50%低く、ヒトTGF- β 3に対する同じ結合タンパク質のKdよりも少なくとも約50%低いKdをヒトTGF-

50

1 に対して示す結合タンパク質を対象とする。

【0012】

さらなる実施形態では、本発明は、TGF- β 1 に結合する単離された結合タンパク質を対象とし、結合タンパク質は、第1のポリペプチド鎖、第2のポリペプチド鎖、第3のポリペプチド鎖および第4のポリペプチド鎖を含む。一態様では、第1および第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へ、式：

(VLドメイン) - (リンカー1)_m - (CLドメイン)

を有し、式中、VLドメインは、可変軽鎖相補性決定領域(variable light complementarity determining region) 1 (LCDR1)、可変軽鎖相補性決定領域2 (LCDR2)、および可変軽鎖相補性決定領域3 (LCDR3) を含み、mは1であり、リンカー1は、ロイシン-グルタミン酸-イソロイシン-リジン-X_p-Y_q-Z_r-アルギニン-トレオニン-バリン-アラニンの配列を有するペプチドを含み、X、YおよびZは、独立してセリン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニンからなる群から選択されるアミノ酸であり、p、qおよびrのそれぞれは、独立して0から5の整数である。別の態様では、第3および第4のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へ、式：

(VHドメイン) - (リンカー2)_n - (CH1ドメイン) - (ヒンジ)_s - (Fc領域)

を有し、式中、VHドメインは、可変重鎖相補性決定領域(variable heavy complementarity determining region) 1 (HCDR1)、可変重鎖相補性決定領域2 (HCDR2)、および可変重鎖相補性決定領域3 (HCDR3) を含み、nは0または1であり、sは0または1である。別の態様では、リンカー2は、トレオニン-バリン-セリン-A_d-B_e-C_f-セリン-アラニン-セリン-トレオニンの配列を有するペプチドを含みえ、A、BおよびCは、独立してセリン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニンからなる群から選択されるアミノ酸であり、d、eおよびfのそれぞれは、独立して0から5の整数である。

【0013】

一態様では、リンカー2は、配列番号45、配列番号46、配列番号47および配列番号48からなる群から選択される配列を含みうる。

【0014】

一態様では、HCDR1は、配列番号7のアミノ酸配列を有し、HCDR2は、配列番号8のアミノ酸配列を有し、HCDR3は、配列番号9、配列番号10、配列番号11または配列番号15のアミノ酸配列を有しうる。

【0015】

VHドメインのフレームワーク領域は、可変重鎖生殖系列配列から選択される。VHドメインは、例えば、配列番号1または配列番号2に示されるヒトVHドメイン配列または5個までのアミノ酸の修飾を有するそのバリエーションから選択される。

【0016】

開示された結合タンパク質のVLドメインは、可変軽鎖生殖系列配列から選択される。VLドメインは、例えば、配列番号3または配列番号4に示されるヒトVLドメイン配列または4個までのアミノ酸の修飾を有するそのバリエーションから選択される。一実施形態では、二量体のそれぞれのポリペプチドは、配列番号1に示されるVHドメインおよび配列番号3に示されるVLドメインを含んでもよく、これらはそれぞれメテリムマブ

【0017】

VHドメインのフレームワーク領域は、可変ラムダまたはカッパ生殖系列配列から選択される。VLドメインは、例えば、配列番号3または配列番号4に示されるヒトVHドメイン配列または4個までのアミノ酸の修飾を有するそのバリエーションから選択される。一実施形態では、二量体のそれぞれのポリペプチドは、配列番号1に示されるVHドメインおよび配列番号3に示されるVLドメインを含んでもよく、これらはそれぞれメテリムマブ

に存在するV HおよびV Lドメインである。

【0018】

別の実施形態では、F c領域は、ヒンジによりC H 1ドメインに接続されている。ヒンジは、ヒトI g G 1またはI g G 4ヒンジ領域由来のアミノ酸配列を含みうる。例えば、ヒンジは、アミノ酸配列P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P (配列番号5) または5個までのアミノ酸の修飾を有するそのバリエーションを含みうる。一実施形態では、ヒンジの長さは、1 ~ 15アミノ酸の範囲でありうる。

【0019】

別の実施形態では、T G F 1結合親和性を改善するために、C A T 1 9 2 F a b折れ曲がり領域 (e l b o w r e g i o n) に部位特異的変異誘発が実施される。2つの鎖からの機能性結合パラトープを提示するために必要となりうるヒンジのフレキシビリティを増加させるために、1 ~ 5個のアミノ酸 (G、G G、G G S、G G G SおよびG G G G S) を軽鎖折れ曲がり領域に挿入する。E x p i 2 9 3トランスフェクションからの馴化培地は、O c t e tにより、良好な発現およびT G F 1に対する結合の顕著な改善を示す。変異体をN i - N T Aにより精製し、高T G F 結合親和性を、B i a c o r eを使用して確認する。L C折れ曲がり領域に挿入された1 ~ 5個のアミノ酸を有するC A T 1 9 2変異体は、T G F 1に対するs c F vの高親和性結合を回復している。これらの改変された折れ曲がり部分挿入変異体は、アイソフォーム選択性も維持しており、T G F 1特異的アンタゴニストとして役立つ。

【0020】

別の態様では、V Hドメインは、配列番号7のアミノ酸配列を有する可変重鎖相補性決定領域1 (H C D R 1)、配列番号8のアミノ酸配列を有する可変重鎖相補性決定領域2 (H C D R 2)、ならびに配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号15からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する可変重鎖相補性決定領域3 (H C D R 3) を含みうる。

【0021】

別の態様では、V Lドメインは、配列番号12のアミノ酸配列を有する可変軽鎖相補性決定領域1 (L C D R 1)、配列番号13のアミノ酸配列を有する可変軽鎖相補性決定領域2 (L C D R 2)、および配列番号14のアミノ酸配列を有する可変軽鎖相補性決定領域3 (L C D R 3) を含みうる。

【0022】

別の態様では、リンカー1は、ロイシン - グルタミン酸 - イソロイシン - リジン - X_p - Y_q - Z_r - アルギニン - トレオニン - バリン - アラニンの配列を有するペプチドを含みえ、X、YおよびZは、独立してセリン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニンからなる群から選択されるアミノ酸であり、p、qおよびrのそれぞれは、独立して0から5の整数である。別の態様では、X、YおよびZのそれぞれは、好ましくはセリンおよびグリシンである。別の態様では、p、qおよびrのそれぞれは1である。別の態様では、pは0であり、qおよびrのそれぞれは1である。別の態様では、pは1であり、qおよびrのそれぞれは0である。別の態様では、pは2であり、qおよびrのそれぞれは1である。別の態様では、pは1であり、qおよびrのそれぞれは2である。

【0023】

一実施形態では、リンカー1は、配列番号21からそれぞれ誘導される変異形態である、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25および配列番号26からなる群から選択される配列を含みうる。別の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、C A T 1 9 2 I g G 1の軽鎖 (配列番号38) からそれぞれ誘導される変異形態である、配列番号39、配列番号40および配列番号41からなる群から選択される配列を含む。

【0024】

別の態様では、リンカー1およびリンカー2は、それぞれ独立して上記のリンカー1に記載のリンカーである。この態様では、リンカー2は、ロイシン - グルタミン酸 - イソロ

10

20

30

40

50

イシン - リジン - A_d - B_e - C_f - アルギニン - トレオニン - バリン - アラニンの配列を有するペプチドを含みえ、A、BおよびCは、独立してセリン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニンからなる群から選択されるアミノ酸であり、d、eおよびfのそれぞれは独立して0から5の整数である。別の態様では、A、BおよびCのそれぞれは、好ましくはセリンおよびグリシンである。別の態様では、d、eおよびfのそれぞれは1である。別の態様では、dは0であり、eおよびfのそれぞれは1である。別の態様では、dは1であり、eおよびfのそれぞれは0である。別の態様では、dは2であり、eおよびfのそれぞれは1である。別の態様では、dは1であり、eおよびfのそれぞれは2である。

【0025】

10

別の実施形態では、リンカー2は、配列番号21からそれぞれ誘導される変異形態である、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25および配列番号26からなる群より選択される配列を含みうる。別の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、C A T 1 9 2 I g G 1の軽鎖（配列番号38）からそれぞれ誘導される変異形態である、配列番号39、配列番号40および配列番号41からなる群から選択される配列を含む。

【0026】

別の実施形態では、開示されたTGF β 1結合FabまたはIgG分子は、選択的にTGF β 1に結合するが、TGF β 2またはTGF β 3には有意な程度に結合しない。

【0027】

別の実施形態では、本明細書に開示された修飾IgG抗体をコードするヌクレオチド配列を含みうる単離されたポリヌクレオチドが開示される。単離されたポリヌクレオチドは、cDNA、組み換えDNAまたは合成DNAでありうる。宿主細胞は、単離された核酸を含みうる。宿主細胞は、ヒト細胞、例えばヒト胎児由来腎臓293（HEK293）細胞およびそれから誘導された細胞株、またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞でありうる。修飾IgG抗体を作製する方法は、修飾IgG抗体を製造するために適切な条件下で宿主細胞を培養することを含んでもよい。修飾IgG抗体は、精製されたものでもよい。精製の程度は90%、95%、99%、99.5%またはそれ以上でありうる。

20

【0028】

ある特定の実施形態では、本発明の修飾IgG抗体は、組成物の構成要素でありうる。組成物は、医薬組成物でありうる。医薬組成物は、治療有効量の修飾IgG抗体を含みうる。組成物はさらに生物学的活性成分、賦形剤または希釈剤の1つまたはそれ以上を含みうる。

30

【0029】

さらに、ヒトにおいてTGF β 1活性に直接的または間接的に起因する疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の修飾IgG抗体を含む医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。疾患または状態は、線維性疾患、がんまたは免疫媒介性疾患、例えば、びまん性全身性皮膚硬化症、骨リモデリング疾患、腎臓疾患および/またはそれらの組み合わせからなる群から選択される。修飾IgG抗体は、線維性疾患、がん、免疫媒介性疾患、例えば、びまん性全身性皮膚硬化症、骨リモデリング疾患、腎臓疾患および/またはそれらの組み合わせからなる群から選択される疾患または障害の処置のための医薬の製造において使用される。疾患または障害の処置は、TGF β 1を中和することまたはTGF β 1シグナル伝達を阻害することを含みうる。疾患または障害の処置は、TGF β 1媒介フィブロネクチン産生、血管内皮増殖因子（VEGF）産生、上皮細胞増殖、内皮細胞増殖、平滑筋細胞増殖および/または免疫抑制を阻害することを含みうる。疾患または障害の処置は、ナチュラルキラー細胞活性の増加を含みうる。

40

【0030】

本明細書で提示する図面は、例証を目的とするものであり、本発明の範囲を限定するために使用されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0031】

50

【図1】s c F v (C A T 1 9 1) が全長 I g G 4 (C A T 1 9 2) 分子に変換されたときに親和性を喪失したことを示す、B i a c o r e T G F 1 結合アッセイの結果を示す図である。

【図2】親和性を取り戻すために改変された s c F v 、 F a b 、 I g G 分子および折れ曲がり領域の構造要素を示す図である。

【図3】重および軽鎖折れ曲がり領域に追加のアミノ酸を有する精製 I g G バリアントの S D S - P A G E ゲルの結果を示す図である。S D S - P A G E は、還元および非還元条件下の精製 I g G バリアントの純度を示す。

【図4】重および軽鎖折れ曲がり領域における追加のアミノ酸を有する精製 I g G バリアントの B i a c o r e 結合アッセイを示す図である。B i a c o r e アッセイ結果は、バリアントによるアイソフォーム選択的および高親和性結合を示す。

10

【図5】軽鎖折れ曲がり領域における追加のアミノ酸を有する精製 I g G バリアントの A 5 4 9 細胞バイオアッセイを示す図である。A 5 4 9 アッセイは、様々な抗体構築物による T G F 1 - 刺激 I L - 1 1 産生に対する阻害効果を比較するものであり、折れ曲がり部分改変バリアントが、この細胞ベースの効力アッセイにおいて効力が高いことを示している。

【図6 - 1】C A T 1 9 2 F a b の重および軽鎖の両方の折れ曲がり領域に追加のアミノ酸を挿入したときに高親和性結合が回復 (r e g a i n) されたことを示す、B i a c o r e T G F 1 結合アッセイを示す図である。

【図6 - 2】図6 - 1の続き。

20

【図6 - 3】図6 - 2の続き。

【図6 - 4】図6 - 3の続き。

【図6 - 5】図6 - 4の続き。

【図6 - 6】図6 - 5の続き。

【図6 - 7】図6 - 6の続き。

【図6 - 8】図6 - 7の続き。

【図7】C A T 1 9 2 F a b 変異体の熱安定性についての示差走査蛍光定量 (D S F) 解析の結果を示す図である。

【図8】C A T 1 9 2 I g G 4 変異体の熱安定性についての示差走査蛍光定量 (D S F) 解析の結果を示す図である。

30

【図9 - 1】C A T 1 9 2 F a b バリアントについて解明された結晶構造を示す図である。

【図9 - 2】図9 - 1の続き。

【発明を実施するための形態】

【0032】

開示された修飾 I g G 抗体は、T G F 1 に選択的に高い親和性およびアビディティで結合し、中和する。修飾 I g G 抗体は、メテリムマブと同じ V H および V L ドメインで構成される。修飾 I g G 抗体は、有利なことに、可変ドメインを他のフォーマットで使用するよりも T G F 1 中和において大きい効能を示す。

【0033】

40

本明細書で使用する時、第1の要素「および/または」第2の要素は、第1の要素もしくは第2の要素が別々にまたは第1および第2の要素が組み合わせて具体的に開示されていることを意味する。単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに他のことを指示していない限り、複数の参照物を含む。

【0034】

「単離された」ポリヌクレオチド(もしくは核酸)またはタンパク質は、遺伝的な改変技術を使用して、その天然形態から、かけ離れているおよび/または変化している。「精製された」核酸またはタンパク質は、実質的に純粋であり、例えば、少なくとも90%純粋、または均質形態でありうる。

【0035】

50

ヒト T G F 1 に対して「選択的結合」または「選択的に結合する」とは、結合タンパク質（例えば、s c F v - F c 二量体）が、ヒト T G F 2 またはヒト T G F 3 に対する結合よりも高い親和性でヒト T G F 1 に結合できること、例えば、T G F 1 に対して、表面プラズモン共鳴により測定されるヒト T G F 2 またはヒト T G F 3 に対する解離定数よりも少なくとも約 50 % 低い解離定数を有することを意味する。

【 0 0 3 6 】

一実施形態では、本発明の修飾 I g G 抗体の可変ドメインは、参照により本明細書に組み入れる米国特許第 6 , 4 9 2 , 4 9 7 号に開示の C D R （例えば、米国特許第 6 , 4 9 2 , 4 9 7 号の配列番号 1 1 ~ 1 9 ）に由来する相補性決定領域（C D R ）を含む。C D R 領域を下記に列挙する。

【 0 0 3 7 】

【表 1】

HCDR1	SYMGH	配列番号7
HCDR2	VISYDGSIKYYADSVKG	配列番号8
HCDR3	TGEYSGYDTSGVEL	配列番号9
	TGEYSGYDTPQYS	配列番号10
	TGFYSGYDTPASPD	配列番号11
LCDR1	RASQGIGDDL	配列番号12
LCDR2	GTSTLQS	配列番号13
LCDR3	LQDSNYPLT	配列番号14

【 0 0 3 8 】

驚くべきことに、以下の配列を有するコンセンサス H C D R 3 結合モチーフが明らかにされる。

【 0 0 3 9 】

【表 2】

HCDR3	TGX ₁ YSGYDTX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆	配列番号15
-------	---	--------

ここで、

X₁ は、任意のアミノ酸（好ましくは、E もしくは F ）でありうるか、または存在せず、
 X₂ は、任意のアミノ酸（好ましくは、S、D もしくは P ）でありうるか、または存在せず、
 X₃ は、任意のアミノ酸（好ましくは、G、P もしくは A ）でありうるか、または存在せず、
 X₄ は、任意のアミノ酸（好ましくは、V、Q もしくは S ）でありうるか、または存在せず、
 X₅ は、任意のアミノ酸（好ましくは、E、Y もしくは P ）でありうるか、または存在せず、
 X₆ は、任意のアミノ酸（好ましくは、L、S もしくは D ）でありうるか、または存在しない。

【 0 0 4 0 】

一実施形態では、開示された修飾抗体の V H ドメインは、配列番号 1 : ヒト I g G 1 V H ドメインクローン S L 1 5 (S Q N 4 U S 6 4 9 2 4 9 7)
 EVQLVESGGGVVQPGSRRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTTTVTVSS

配列番号 2 : ヒト I g G 1 V H ドメインクローン J T 1 8 2 (S Q N 1 0 U S 6 4 9
2 4 9 7)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPASPDWGQGTITVTVSS

配列番号 3 : ヒト I g G 1 V ドメインクローン S L 1 5 A : (S Q N 6 U S 6 4 9
2 4 9 7)

EIVLTQSPSSLSASVGRVITCRASQIGDDL GWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS LQP
EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

配列番号 4 : ヒト I g G 1 V ドメインクローン S L 1 5 S : (S Q N 8 U S 6 4 9
2 4 9 7)

EIVLTQSPSSLSASVGRVITCRSSQIGDDL GWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINS LQP
EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

配列番号 5 : ヒト I g G 1 ヒンジ領域

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

配列番号 6 : ヒト I g G 1 F c 領域

SVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 7 の配列を有する H C D R 1、配列番号 8 の配列を有する H C D R 2、ならびに
配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 15 からなる群から選択される
配列を有する H C D R 3 を含む。C D R 配列は、1 ~ 4 個のフレームワーク領域から、N
末端から順に、F W 1 - C D R 1 - F W 2 - C D R 2 - F W 3 - C D R 3 - F W 4 のい
ずれでも分離される。V H ドメインのフレームワーク領域は、可変重鎖生殖系列配列から選
択される。一実施形態では、F W 領域配列は、同じヒトの可変重鎖生殖系列配列から選択
される。V L ドメインのフレームワーク領域は、可変ラムダまたはカッパ生殖系列配列、
例えば、同じヒトの可変ラムダまたはカッパ生殖系列配列から選択される。現在のところ
、約 40 の可変重鎖生殖系列配列が当該分野で知られており、同様に約 40 の可変カッパ
生殖系列配列および約 30 の可変ラムダ生殖系列配列、例えば、V_H 3、V_H 1、V_H 1
- 69 および V_H 1 - e が知られている。

【 0 0 4 1 】

別の実施形態では、複合 V H または V L ドメインが、本明細書に開示の C D R 配列を使
用して生成される。例えば、V H または V L ドメインの結晶構造は、1 つの抗体から C D
R 配列を使用し、別の抗体から生殖系列 F W 領域を使用して複合ドメインを生成するた
めのガイドランスとして使用される。さらなる詳細は、参照によって本明細書に組み入れる米
国特許出願公開第 2 0 0 2 0 0 9 9 1 7 9 号ならびに Homes and Foote、
J Immunol. 1997 Mar 1; 158 (5) : 2192 - 201 にお
いて見出される。

【 0 0 4 2 】

本発明の修飾 I g G 抗体は、メテリムマブと同じ、それぞれ配列番号 1 および配列番号
3 に示される配列を有する V H および V L ドメインで構成される。V H ドメインは、配列
番号 2 に示される配列を有する V H ドメインで置き換えてもよく、V L ドメインは、配列
番号 4 に示される配列を有する V L ドメインで置き換えてもよい。これらの V H および V
L ドメインは、参照によって本明細書に組み入れる米国特許第 6 , 4 9 2 , 4 9 7 号 (例
えば、米国特許第 6 , 4 9 2 , 4 9 7 号に記載の配列番号 4、6、8 および 10) に開示
されている。

【 0 0 4 3 】

「可変ドメイン」(V D) は、免疫グロブリンの超可変結合ドメイン、または当業者に
既知のように抗原 / リガンド結合に関与する受容体のリガンド結合ドメインを指す。可変
ドメインは、通常、免疫グロブリン内の位置または由来により参照され、例えば、免疫グ
ロブリンの軽鎖の可変ドメイン (V L)、免疫グロブリンの重鎖の可変ドメイン (V H)

、ラクダ科免疫グロブリンの重鎖の可変ドメイン（V H H）と参照される。

【0044】

「バリエーション」可変ドメインは、参照配列と比較して、アミノ酸の付加、置換および/または欠失を含む。V HまたはV Lドメインの「バリエーション」は、4個までのそのようなアミノ酸修飾を含みうる。例えば、2つのドメインの1つがアミノ酸置換を含みうる一方で、他のドメインは未修飾であり、または両方のドメインがアミノ酸置換を含みうる。アミノ酸残基を付加または欠失させる修飾は、V HまたはV LドメインのN末端またはC末端でなされる。例えば、V HドメインのN末端残基が欠失される。

【0045】

本開示の目的において、用語「の間」「から」「まで」および「少なくとも」は包括的である。例えば、整数「0から5まで」は、0以上、5以下の任意の整数を意味する。

10

【0046】

一実施形態では、5個までのアミノ酸置換が、修飾IgG抗体を脱免疫化するためになされる。脱免疫化は、例えば、Hardingら、(2010)、mAbs、2:256-265に記載の方法にしたがって実施される。

【0047】

V Hおよび/またはV Lドメインのフレームワーク残基は、例えば、修飾IgG抗体の安定性を増加させるおよび/または凝集の傾向を低下させるために置換してもよい。安定性に劣ると、発現された修飾IgG抗体が組み換え的に発現されるときに適切にフォールディングされる能力に影響を与え、発現された抗体の画を非機能的にする可能性がある。また安定性の低い抗体は、潜在的に免疫原性凝集物を形成しやすく、または不十分なアピディティもしくは半減期貯蔵期間を有しうる。修飾IgG抗体のV Hおよび/またはV Lドメインの安定性を増加させるおよび/または凝集の傾向を低下させると考えられるフレームワークアミノ酸置換は、例えば、WO2007/109254に開示されている。本発明のV HおよびV Lドメインにおける対応残基の置換は、同様に修飾IgG抗体の安定性を増加させるおよび/または凝集の傾向を低下させると考えられる。

20

【0048】

許容される置換として、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4のアミノ酸を、別のヒトV HまたはV Lドメイン生殖系列配列に存在する対応アミノ酸で置き換える置換を含むことが考えられる。これらの生殖系列配列のいずれかに存在するアミノ酸でフレームワークアミノ酸を置換することが許容される。例えば、配列番号1のV Hドメインの残基は、任意のV H生殖系列配列、例えば、DP-10(V_H1-69)またはDP-88(V_H1-e)由来の生殖系列配列の対応する位置に現れるアミノ酸で置換される。この場合の対応する位置は、当該分野で周知のアライメント技術、例えば、ClustalWを使用した、様々な生殖系列配列間の配列アライメントにより決定される。

30

【0049】

許容されると考えられる追加の置換は、三共結晶構造(three co-crystal structure)の解析により決定される場合その側鎖のほとんどが溶媒に曝されているアミノ酸になされる置換である。残基の溶媒接触性表面積は、当該分野で周知の技術を使用して推定することができる。さらに、可変ドメイン内に埋め込まれたアミノ酸への置換は、アミノ酸の側鎖が隣接残基との立体障害を生じない場合に、より良好に許容されると考えられる。この理由により、埋め込まれたアミノ酸は、一般に、側鎖が同様またはより小さい大きさのアミノ酸で置換される。例えば、埋め込まれたIle残基のLeu、Val、AlaまたはGlyを用いた置換が許容されると考えられる。置換により生じる可能性のある立体障害は、三共結晶構造の解析により予測することができる。許容されると考えられるさらなる置換は、可変ドメイン内の既存の静電相互作用、例えば、双極子-双極子相互作用、誘起双極子相互作用、水素結合、またはイオン結合を維持させる置換である。

40

【0050】

可変ドメインの追加のアミノ酸置換としては、抗体またはその抗原結合断片に新たな有

50

用な特性を付与すると考えられるものが挙げられる。例えば、VHおよび/またはVLドメインの推定N-グリコシル化部位は、N-グリコフォームの形成を予防するまたは減少させるために除去してもよい。アミノ末端残基をGln残基に置換してピログルタミル化を生じさせることができ、これにより電荷バリエーションの数を減少させることができる。アミノ酸置換は等電点を下げるために使用することができ、これにより、例えばIgGポリペプチド抗体の排泄率を減少させることができる。

【0051】

可変ドメインの表面残基を、例えばCysまたはLys残基で置換して、共有結合的に修飾、および抗体もしくはその抗原結合断片に有用な特性を付与する分子、例えば、検出可能な標識、毒素、標的化部分もしくはタンパク質に結合させてもよい。例えば、Cys残基は、薬物コンジュゲートを形成するために、細胞毒性薬と結合させることができる。またCys残基は、血清半減期を延長させる分子、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)または血清アルブミンと結合させることもできる。そのようなアミノ酸修飾は、例えば、Beckら、(2010)、Nature、10:345-52に概説されている。

【0052】

検出可能な標識としては、放射性標識、例えば、 ^{131}I または ^{99}Tc が挙げられ、これらは当該分野で既知の方法を使用して、抗体またはその抗原結合断片に結合させることができる。また標識としては、酵素標識、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼが挙げられる。さらに標識としては、特別な同系検出可能部分、例えば標識アビジンに対する結合を介して検出されるビオチンなどの化学的部分が挙げられる。精製を容易にする他の部分を結合させてもよい。例えば、抗体またはその抗原結合断片は、周知の組み換え修飾および発現方法を使用してHisタグ化してもよい。

【0053】

修飾IgG抗体のVLドメインは、本明細書でリンカー1と称されるリンカーにより、CLドメインに連結させる。修飾IgG抗体のVHドメインは、本明細書でリンカー2と称される第2のリンカーにより、CH1ドメインに場合により連結させる。修飾IgG抗体を作製するために適切なリンカーは、当該分野で周知である。例えば、Birdら、(1988)、Science、242:423-426; Hustonら、(1988)、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、85:5879-5883を参照。連結は、例えば、コード核酸をインフレームで融合して、融合タンパク質を適切な宿主細胞で発現することにより、達成することができる。

【0054】

リンカー1は、IgG分子またはその修飾型のVLおよびCLに接続する、増加したフレキシビリティを有するペプチドを含んでもよい。例えば、ロイシン-グルタミン酸-イソロイシン-リジン-X_p-Y_q-Z_r-アルギニン-トレオニン-バリン-アラニンの配列を有してもよく、X、YおよびZは、独立してセリン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニンからなる群から選択されるアミノ酸であり、p、qおよびrのそれぞれは、独立して0から5の整数である。X、YおよびZのそれぞれは、好ましくはセリンおよびグリシンであり、p、qおよびrのそれぞれは1である。別の態様では、pは0であり、qおよびrのそれぞれは1である。別の態様では、pは1であり、qおよびrのそれぞれは0である。

【0055】

リンカー2は、トレオニン-バリン-セリン-A_d-B_e-C_f-セリン-アラニン-セリン-トレオニンの配列を有するペプチドを含みえ、A、BおよびCは、独立してセリン、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびトレオニンからなる群から選択されるアミノ酸であり、d、eおよびfのそれぞれは独立して0から5の整数である。

【0056】

別の実施形態では、ヒンジは、修飾IgG抗体のCH1ドメインとFc領域との間に場

10

20

30

40

50

合により挿入される。一態様では、ヒンジ領域は、F c 領域の C H 1 部分に場合により連結させるフレキシブルドメインである。I g G 分子のヒンジ領域のフレキシビリティは、F a b アームが広範囲の角度をとることを許容し、空間的に様々な距離で離れたエピトープに結合することを可能にする。別の態様では、適切なヒンジ領域には、例えば、アミノ酸配列 P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P (配列番号 5) を有するヒト I g G 1 ヒンジ領域が含まれる。この配列は、例えば、米国特許第 8 , 0 4 8 , 4 2 1 号の図 4 B に開示されているように、ヒト I g G 1 上部ヒンジの一部分、中部ヒンジ、および C H 2 ドメインの N 末端部に対応する。

【 0 0 5 7 】

別の実施形態では、修飾 I g G 抗体の適切な F c 領域は、2 つまたは 3 つの定常領域を含む。F c 領域は、配列番号 6 に示されるヒト I g G 1 の F c 領域、または配列番号 1 7 の C H 2 および C H 3 ドメインに示される I g G 4 の F c 領域を含みうる。抗体の F c 領域は、血清半減期ならびにエフェクター機能、例えば補体依存性細胞傷害性 (c o m p l e m e n t - d e p e n d e n t c y t o t o x i c i t y 、 C D C) 、抗体依存性細胞介在性細胞傷害性 (a n t i b o d y - d e p e n d e n t c e l l u l a r c y t o t o x i c i t y 、 A D C C) および抗体依存性細胞ファゴサイトーシス (a n t i b o d y - d e p e n d e n t c e l l p h a g o c y t o s i s 、 A D C P) など

10

【 0 0 5 8 】

修飾は、修飾 I g G 抗体の様々な特性を改善するために、ヒンジおよび F c 領域になされる。一実施形態では、天然ヒト F c 領域の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 1 0 個までのアミノ酸が、ヒンジ領域の修飾に加えて、修飾される。例えば、F c 領域は、修飾 I g G 抗体の血清半減期を延長させるために修飾される。I g G の半減期は、受容体 F c R n に対する pH 依存性結合に依存する。F c R n は、内皮細胞の表面に発現し、pH 依存的な形で I g G に結合して、I g G を分解から保護する。例えば、C H 2 と C H 3 ドメインとの境界面に位置する変異は、i n v i v o で F c R n に対する結合親和性および I g G 1 の半減期を延長させることが示された。そのような修飾は、例えば、S t r o h l W R . , 2 0 0 9 . O p t i m i z a t i o n o f F c - m e d i a t e d e f f e c t o r f u n c t i o n s o f m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s . C u r r O p i n B i o t e c h n o l . , 2 0 (6) : 6 8 5 - 9 1 ; および V a c c a r o C . ら、2 0 0 5 . E n g i n e e r i n g t h e F c r e g i o n o f i m m u n o g l o b u l i n G t o m o d u l a t e i n v i v o a n t i b o d y l e v e l s . N a t B i o t e c h n o l . , 2 3 (1 0) : 1 2 8 3 - 8 に概説されている。

20

30

【 0 0 5 9 】

ヒンジおよび / または F c 領域に対する他の修飾は、エフェクター機能を増加または減少させることができる。4 つのヒト I g G アイソタイプは、活性化 F c 受容体 (F c R I 、 F c R I I a 、 F c R I I I a) 、阻害性 F c R I I b 受容体、および補体 (C 1 q) の第 1 成分に異なる親和性で結合し、異なるエフェクター機能をもたらす。I g G の F c R または C 1 q に対する結合は、例えば、I g G ヒンジ領域および C H 2 ドメインに位置する残基に依存する。これらの残基の単一または複数のアミノ酸置換は、I g G の F c R または C 1 q との相互作用の調節により、エフェクター機能に影響を与える。他の置換が、エフェクター機能に影響を与えることは公知である。これらの修飾は、例えば、S t r o h l (2 0 0 9) 、 「 O p t i m i z a t i o n o f F c - m e d i a t e d e f f e c t o r f u n c t i o n s o f m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s 」 、 C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . , 2 0 : 6 8 5 - 9 1 に概説されている。

40

【 0 0 6 0 】

ヒンジおよび / または F c 領域の代表的修飾を表 1 にまとめる。

【 0 0 6 1 】

50

【表 3】

表 1: 代表的ヒンジおよび Fc 領域修飾

アイソタイプ	種	置換	FcR/C1q結合	エフェクター機能	参照番号
IgG1	ヒト	T250Q/M428L	FcRnに対する結合増加	半減期延長	1
IgG1	ヒト	1M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	FcRnに対する結合増加	半減期延長	2
IgG1	ヒト	E233P/L234V/L235A/G236 + A327G/A330S/P331S	FcγRIに対する結合減少	ADCCおよび CDC減少	3, 4
IgG1	ヒト	E333A	FcγRIIIaに対する結合増加	ADCCおよび CDC増加	5, 6
IgG1	ヒト	S239D/A330L/I332E	FcγRIIIaに対する結合増加	ADCC増加	7, 8
IgG1	ヒト	P257I/Q311	FcRnに対する結合増加	半減期変化なし	9
IgG1	ヒト	K326W/E333S	C1qに対する結合増加	CDC増加	10
IgG1	ヒト	S239D/I332E/G236A	FcγRIIa/FcγRIIb比の増加	マクロファージファゴサイトーシス増加	11
IgG1	ヒト	K322A	C1qに対する結合減少	CDC減少	5
IgG4	ヒト	S228P	--	Fab-アーム交換減少	12
IgG2a	マウス	L235E + E318A/K320A/K322A	FcγRIおよびC1qに対する結合減少	ADCCおよび CDC減少	10

1. Hintonら、(2004)、J. Biol. Chem.、279(8):6213-16
2. Vaccaroら、(2005)、Nature Biotechnol.、23(10):1283-88
3. Armourら、(1999)、Eur. J. Immunol.、29(8):2613-24
4. Shieldsら、(2001)、J. Biol. Chem.、276(9):6591-604
5. Idusogieら、(2000)、J. Immunol.、164(8):4178-84
6. Idusogieら、(2001)、J. Immunol.、166(4):2571-75
7. Lazarら、(2006)、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、103(11):4005-10
8. Ryanら、(2007)、Mol. Cancer Ther.、6:3009-18
9. Datta-Mannanら、(2007)、Drug Metab. Dispos.、35:86-94
10. Steurerら、(1995)、J. Immunol.、155(3):1165-74
11. Richardsら、(2008)、Mol. Cancer Ther.、7(8):2517-27
12. Labrijnら、(2009)、Nature Biotechnol.、27(8):767-71

【 0 0 6 2 】

さらに、組み換えアミノ酸修飾を使用して、発現ポリペプチドの構造的均一性を減少させることができる。代表的な例は、Petersら、(2012)、J. Biol. Chem.、287(29):24525-33であり、この文献には、IgG4ヒンジ領域におけるCysからSerへの置換により、ジスルフィド結合の不均一性を減少させ、Fabドメインの熱安定性を増加させることが開示されている。同様に、Zhangら、(2010)、Anal. Chem.、82:1090-99には、IgG2ヒンジ

領域を改変し、治療適用においてジスルフィド結合スクランブリングおよび構造異性体の形成を制限することが開示されている。C H 3ドメインへのアミノ酸修飾を使用して、カルボキシ末端L y s残基を削除し、電荷バリエーションの数を減少させることもできる。アミノ酸修飾を使用して、組み換え抗体またはその抗原結合断片の薬理的機能を改善することもできる。例えば、アミノ酸修飾を使用して、補体活性を増加、F c R I I I A結合増加もしくはF c R I I I B結合減少により抗体依存性細胞介在性細胞傷害性(A D C C)を増強、および/またはF c R n結合増加により血清半減期を延長させることができる。そのようなアミノ酸修飾は、例えば、B e c k r a、(2 0 1 0)、N a t u r e、1 0 : 3 4 5 - 5 2 に概説されている。

【 0 0 6 3 】

核酸および修飾I g G抗体を作製する方法

本発明のさらなる態様は、修飾I g G抗体をコードする核酸を提供する。単離された核酸は、例えば、合成D N A、非天然m R N A、またはc D N Aでありうる。例としては、米国特許第6, 4 9 2, 4 9 7号の配列番号3、5、7および9に示されるV HおよびV Lドメインをコードする核酸が挙げられる。組み換え宿主細胞は、上記構築物の1つまたはそれ以上を含みうる。修飾I g G抗体を調製する方法は、修飾I g G抗体を製造するための条件下でコード核酸を宿主細胞において発現させ、抗体を回収することを含む。抗体を回収する方法は、抗体の単離および/または精製を含みうる。製造方法は、抗体を、少なくとも1つの追加の成分、例えば薬学的に許容される賦形剤を含む組成物に配合することを含みうる。

【 0 0 6 4 】

用語「組み換え宿主細胞」(または単に「宿主細胞」)は、本明細書で使用するとき、外来性D N Aが導入された細胞を指すことを意図している。そのような用語は、特定の対象細胞だけではなく、そのような細胞の子孫も指すことが意図されていると理解されるべきである。ある特定の修飾は、変異または環境の影響のいずれかにより、後の世代でも生じうるため、そのような子孫が実際上親細胞と同一でない場合もあるが、依然として本明細書で使用する用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。好ましくは、宿主細胞は、動物界の任意の種類から選択される原核および真核細胞を含む。好ましくは、真核細胞としては、原生生物細胞、真菌細胞、植物細胞および動物細胞が挙げられる。最も好ましくは、宿主細胞としては、限定されないが、原核細胞株の大腸菌; 哺乳動物細胞株のC H O、H E K 2 9 3およびC O S; 昆虫細胞株のS f 9; ならびに真菌細胞のサッカロマイセス・セレビシエが挙げられる。

【 0 0 6 5 】

修飾I g G抗体をコードする核酸を含む適切なベクターは、例えば、プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子、および場合に依じた他の配列を含めた適当な制御配列を含む形で選択または構築することができる。ベクターは、例えば、プラスミド、ファージ、ファージミド、アデノウイルス、A A V、レンチウイルスから選択される。核酸の操作のための技術および手順、例えば、核酸構築物の調製、変異誘発、配列決定、細胞へのD N Aの導入、および遺伝子発現は、当該分野で周知である。

【 0 0 6 6 】

用語「ベクター」は、本明細書で使用するとき、連結されている別の核酸を運ぶことができる核酸分子を指すことを意図している。ベクターの1種は、環状二本鎖D N Aループを指す「プラスミド」であり、このループの中に追加のD N Aセグメントをライゲートしうる。ベクターの別の1種は、ウイルスベクターであり、追加のD N Aセグメントを、ウイルスゲノムにライゲートしうる。ある特定のベクターは、導入された宿主細胞内で自律増殖することができる(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入に際し、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、操作可能に連結されている遺伝子の発

10

20

30

40

50

現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書で「組み換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）として参照される。一般に、組み換えDNA技術で有用性のある発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用される形態であるため、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は相互に交換可能に使用される。しかしながら、本発明は、同様の機能を有する他の発現ベクターの形態、例えば、ウイルスベクター（例えば、複製欠損性レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）も含むことを意図している。

【0067】

そのような核酸の宿主細胞への導入は、当該分野で周知の技術を使用して達成することができる。真核細胞について、適切な技術としては、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルスを用いた形質導入を挙げることができる。細菌細胞については、適切な技術としては、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを用いたトランスフェクションを挙げることができる。導入に続き、例えば遺伝子を発現するための条件下で宿主細胞を培養することにより、核酸からの発現を生じさせるまたは可能にしてもよい。一実施形態では、本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム、例えば染色体に組み込まれる。組み込みは、標準技術にしたがって、ゲノムの組み換えを促進する配列を含めることにより促進される。

【0068】

多種多様な宿主細胞においてポリペプチドをクローニングおよび発現するための系は周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、真菌、酵母、ならびにトランスジェニック植物および動物が挙げられる。異種ポリペプチドの発現のために当該分野で利用可能な哺乳動物細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、マウスメラノーマ細胞、ラット骨髄腫細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞、例えば、HEK293細胞、ヒト胚性網膜細胞、および多くの他の細胞が挙げられる。大腸菌などの原核細胞における抗体および抗体断片の発現は、当該分野で十分確立されている。概要について、例えばPluckthun、Bio/Technology、9：545-551（1991）を参照。培養真核細胞における発現も、例えば、Andersenら、（2002）、Curr. Opin. Biotechnol.、13：117-23に概説されているように、当業者にとって利用可能である。

【0069】

別の実施形態では、開示された修飾IgG抗体は、天然にまたは選択した発現宿主、例えばCHO、HEK293もしくはNSO（E.C.A.C.C.85110503）細胞によりグリコシル化され、または、例えば原核細胞での発現により製造する場合はグリコシル化されない。グリコシル化は意図的に変化させてもよく、例えば、得られる修飾IgG抗体のADCC活性を増加させるために、フコシル化を抑制してもよい。

【0070】

抗体またはその抗原結合断片の使用法

修飾IgG抗体は、ヒトまたは動物体の処置または診断方法において使用することができる、例えば、患者を処置するために有効量を投与することを含む、ヒト患者における疾患または障害の処置（予防的処置を含む）方法において使用することができる。処置可能な状態としては、TGF- β 1が作用している任意の状態、例えば、線維性疾患、がん、免疫媒介性疾患および創傷治癒、例えば、びまん性全身性硬化症（diffuse systemic sclerosis）、骨リモデリング疾患、腎臓疾患および/またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0071】

ヒトTGF- β 1に特異的な抗体は、TGF- β 1系球体腎炎（Borderら、（1990）、Nature、346：371-374）、神経瘢痕（neural scarring）（Loganら、（1994）、Eur. J. Neurosci.、6：3

10

20

30

40

50

55 - 363)、皮膚癬痕(Shahら、(1992)、Lancet、339:213 - 214; Shahら、(1994)、J. Cell Science、107:1137 - 1157; Shahら、(1995)、J. Cell Science、108:985 - 1002)、および肺線維症(Giriら、(1993)、Thorax、48:959 - 966)の処置について動物モデルで有効であることが示されてきた。さらに、TGF- β 1、2および3に対する抗体は、肺線維症、放射線誘発線維症(米国特許第5,616,561号)、骨髄線維症、火傷、デュピュイトラン拘縮、胃潰瘍および関節リウマチ(Wahlら、(1993)、Exp. Medicine、177:225 - 230)のモデルに有効であることが示されてきた。

【0072】

修飾IgG抗体は、TGF- β 1活性に直接的または間接的に起因する疾患および状態を処置するために有用である。修飾IgG抗体は、*in vitro*または*in vivo*でヒトTGF- β 1アイソフォームの活性を選択的に阻害する。TGF- β 1アイソフォームの活性としては、限定されないが、TGF- β 媒介シグナル伝達、細胞外マトリックス(ECM)沈着、上皮および内皮細胞増殖の阻害、平滑筋増殖の促進、III型コラーゲン発現の誘導、TGF- β 、フィブロネクチン、VEGFおよびIL-11発現の誘導、潜在関連ペプチドの結合、腫瘍誘導免疫抑制、血管新生の促進、筋線維芽細胞の活性化、転移の促進、ならびにNK細胞活性の阻害が含まれる。例えば、修飾IgG抗体は、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)、肝線維症(HF)、急性心筋梗塞(AMI)、特発性肺線維症(IPF)、強皮症(SSc)、およびマルファン症候群を処置するために有用である。

【0073】

修飾IgG抗体は、疾患および状態、例えば、限定されないが、線維性疾患(糸球体腎炎、神経癱痕、皮膚癬痕、肺線維症(pulmonary fibrosis)、肺線維症(lung fibrosis)、放射線誘発線維症、肝線維症、骨髄線維症など)、火傷、免疫媒介性疾患、炎症性疾患(例えば、関節リウマチ)、移植拒絶、がん、デュピュイトラン拘縮、および胃潰瘍を処置するために有用である。修飾IgG抗体は、腎機能不全、例えば、限定されないが、糖尿病性(I型およびII型)腎障害、放射線誘発性腎症、閉塞性腎症、びまん性全身性硬化症、肺線維症、同種移植片拒絶、遺伝性腎臓疾患(例えば、多発性嚢胞腎、海綿腎、馬蹄腎)、糸球体腎炎、腎硬化症、腎石灰化症、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、バージャー病、全身性または糸球体性高血圧、尿細管間質性腎炎、尿細管性アシドーシス、腎結核ならびに腎梗塞の処置、予防および発現リスクの減少のためにも有用である。特に、修飾IgG抗体は、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系のアンタゴニスト、例えば、限定されないが、レニン阻害剤、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、Ang II受容体アンタゴニスト(「Ang II受容体ブロッカー」としても知られる)およびアルドステロンアンタゴニストと組み合わせるとき、有用である。例として、そのようなアンタゴニストとの組み合わせで修飾IgG抗体を使用する方法が、WO2004/098637に示されている。

【0074】

また修飾IgG抗体は、ECMの沈着に関連する疾患および状態、例えば、全身性硬化症、術後癒着、ケロイドおよび肥厚性癬痕、増殖性硝子体網膜症、緑内障排出路手術(glaucoma drainage surgery)、角膜損傷、白内障、ペイロニー病、成人呼吸促迫症候群、肝硬変、心筋梗塞後癬痕、血管形成術後再狭窄、くも膜下出血後癬痕、多発性硬化症、椎弓切除術後線維症、腱および他の修復後の線維症、タトゥー除去による癬痕、胆汁性肝硬変(硬化性胆管炎を含む)、心膜炎、胸膜炎、気管切開術、穿通性中枢神経系損傷、好酸球性筋痛性症候群、血管再狭窄、静脈閉塞性疾患、脾炎、ならびに乾癬性関節症を処置するために有用である。

【0075】

さらに修飾IgG抗体は、疾患および状態の再上皮化、例えば静脈性潰瘍、虚血性潰瘍(褥瘡)、糖尿病性潰瘍、移植部位、移植ドナー部位、表皮剥脱および火傷、気管支上皮

10

20

30

40

50

の疾患、例えば、喘息、ARDS、腸上皮の疾患、例えば、細胞毒処置に関連する粘膜炎、食道潰瘍（逆流症）、胃潰瘍、小腸および大腸病変（炎症性腸疾患）の再上皮化を促進するために有用である。

【0076】

修飾IgG抗体は、内皮細胞増殖の促進、例えばアテローム性動脈硬化プラークの安定化、血管吻合術の治癒促進における内皮細胞増殖の促進、または平滑筋細胞増殖の阻害、例えば、動脈疾患、再狭窄および喘息における平滑筋細胞増殖の阻害のために使用してもよい。

【0077】

修飾IgG抗体は、マクロファージ媒介感染に対する免疫応答を増強させるために有用である。また修飾IgG抗体は、例えば、腫瘍、AIDSまたは肉芽腫性疾患によって引き起こされる免疫抑制を減少させるために有用である。修飾IgG抗体は、がんなどの過剰増殖性疾患、例えば、限定されないが、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、胃がん、腎臓がん、膵臓がん、結腸直腸がん、皮膚がん、肺がん、子宮頸部がん、および膀胱がん、グリオーマ、中皮腫、ならびに様々な白血病および肉腫、例えばカボジ肉腫の処置に有用であり、そのような腫瘍の再発または転移を処置または予防するために有用である。また修飾IgG抗体は、シクロスポリン媒介転移を阻害するために有用である。

【0078】

がん治療の文脈において、「処置」は、腫瘍増殖の遅延、または腫瘍転移の減少、ならびに患者の平均余命を延長させるためのがんの部分寛解をもたらす任意の医学的介入を含む。

【0079】

処置方法は、修飾IgG抗体、または修飾IgG抗体を含む医薬組成物の投与を含む。修飾IgG抗体は、投与される医薬の製造において使用される。例えば、医薬または医薬組成物を作製する方法は、修飾IgG抗体を、薬学的に許容される賦形剤と共に製剤化することを含む。組成物は、単独でまたは他の処置と組み合わせて、処置される状態に応じて、同時にまたは連続的に投与される。

【0080】

患者への利益を示すためには、十分な「治療有効量」で投与されることが好ましい。そのような利益は、特定の疾患または状態の少なくとも1つの症状を少なくとも改善するものでありうる。投与される実際の量、速度および投与経過は、処置される疾患または状態の性質および重症度に依存する。処置の処方、例えば、投与量の決定などは、前臨床および臨床試験に基づいて判断することができ、その設計は十分に当該分野の技術水準の範囲内である。

【0081】

正確な用量は、因子の数、例えば、修飾IgG抗体が診断のためまたは処置のためであるか、処置される領域の大きさおよび位置、ならびに修飾IgG抗体に結合している任意の検出可能な標識または他の分子の性質に依存する。修飾IgG抗体の典型的な用量は、例えば、全身投与に対して100 μg ~ 1 gの範囲とされ、局所適用に対して1 μg ~ 1 mgの範囲とされる。成人患者の単独処置のための用量は、幼児および乳児のために比例的に調節しうる。処置は、医師の判断で、毎日、1週間に2回、毎週、毎月または他の間隔で繰り返してもよい。処置は周期的であってもよく、投与の間の期間が、約2週間またはそれ以上、好ましくは約3週間またはそれ以上、より好ましくは約4週間またはそれ以上であってもよく、または約1カ月に1回であってもよい。

【0082】

一実施形態では、患者の体重1 kgあたり約0.1、0.3、1、3、10、15 mgまたは20 mgの開示された抗体の用量レベルが、ヒトにおいて有用および安全でありうる。例えば、ラットおよびマウスにおいて0.5 ~ 5 mg / kgが、急性状況における有効量であった。したがって、長期投与では、21日間の推定半減期に基づいて、0.3 ~ 10 mg / kgがヒトに対して投与される。用量は、効能のために十分な量とされ、一方

10

20

30

40

50

で最適な投与を容易にするために十分に低用量とされる。例えば、50 mg 未満の用量は皮下投与を容易にする。静脈内投与が、重度疾患に対する送達経路として使用されるが、高用量および長期投与間隔が必要となりうる。皮下注射は、製品に対する潜在的な免疫応答を増加させる。局所性疾患に対する局所投与は、投与製品の量を減少させ、作用部位の濃度を増加させることができ、安全性を向上させることができる。

【0083】

修飾 IgG 抗体は、注射により、例えば、皮下、静脈内、腔内（例えば、腫瘍切除後）、病巣内、腹腔内または筋肉内に投与してもよい。また修飾 IgG 抗体は、吸入により、または局所的に（例えば、眼内、鼻腔内、直腸、創傷内、皮膚上に）、または経口により送達してもよい。

10

【0084】

修飾 IgG 抗体は、通常、修飾 IgG 抗体に加えて少なくとも 1 つの成分を含みうる医薬組成物の形態で投与される。したがって、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤、担体、バッファー、安定剤、または当業者に周知の他の物質を含みうる。そのような物質は、非毒性で、かつ活性成分の効能に干渉しないものであるべきである。そのような物質には、例えば、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗生剤、抗菌剤、等張剤および吸収遅延剤が含まれうる。薬学的に許容される担体の一部の例は、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、ならびにそれらの組み合わせである。多くの場合には、等張剤、例えば、糖、マンニトールもしくはソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムを、組成物に含めることが好ましい。

20

【0085】

担体または他の材料の詳細な性質は、投与経路に依存する。静脈内注射または患部での注射について、活性成分は、発熱物質不含で適切な pK、等張性および安定性を有する非経口的に許容される水溶液の形態である。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル液および乳酸加リンゲル液などの等張ビヒクルを使用して、適切な溶液を十分に調製することができる。保存剤、安定剤、バッファー、抗酸化剤および/または他の添加剤を含めてもよい。

【0086】

30

修飾 IgG 抗体は、液体、半固体または固体形態で、例えば、液体溶液（例えば、注射および注入溶液）、分散液、懸濁液、粉末、リポソームおよび坐剤で製剤化しうる。好ましい形態は、意図する投与様式、治療適用、分子の物理化学的性質、および送達経路に依存する。製剤には、賦形剤、または賦形剤の組み合わせ、例えば、糖、アミノ酸および界面活性剤を加えてもよい。液体製剤には、広い範囲の修飾 IgG 抗体濃度および pH を含めうる。固体製剤は、例えば、凍結乾燥、噴霧乾燥、または超臨界流体技術による乾燥により製造しうる。

【0087】

治療組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高薬物濃度に適した他の秩序ある構造で製剤化することができる。滅菌注射液は、適切な溶媒中に、修飾 IgG 抗体を、上記に列挙した成分の 1 種または組み合わせと共に組み入れて、その後、滅菌ろ過することにより、調製することができる。一般に分散液は、基礎分散媒体および上記に列挙した中の他の成分を含有する滅菌ビヒクルに、活性化化合物を組み入れることにより調製される。滅菌注射溶液調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、前述の滅菌ろ過溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を生じさせる、真空乾燥法および凍結乾燥法である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤を使用することにより、分散液の粒径を維持することにより、または界面活性剤を使用することにより、維持することができる。注射性組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを、組成物に含めることによりもたらされる。

40

50

【0088】

ある特定の実施形態では、活性化合物は、急速な放出に対して修飾IgG抗体を保護する担体、例えば、インプラント、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達系などの徐放製剤を用いて調製してもよい。生分解性、生体適合性のポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などを使用してもよい。そのような製剤の調製のための多くの方法が特許となっており、または当業者に一般に知られている。

【0089】

修飾IgG抗体を使用する方法には、TGFに対する結合を生じさせることまたは可能にすることを含めてもよい。そのような結合は、*in vivo*で、例えば、修飾IgG抗体を患者に投与した後に生じてもよく、または*in vitro*で、例えば、ELISA、ウェスタンブロッティング、免疫細胞化学、免疫沈降、親和性クロマトグラフィーまたは細胞ベースアッセイにおいて生じてもよく、または*ex vivo*で、治療方法に基づき、例えば、細胞もしくは体液を*ex vivo*で修飾IgG抗体と接触させ、次いで患者に投与する方法に基づいて生じてもよい。

【0090】

修飾IgG抗体を含むキットが提供される。修飾IgG抗体は、試料中の反応性を決定するために標識してもよい。キットは、例えば、診断解析で利用してもよい。キットには、成分を使用するための指示書を含めてもよい。そのような方法の実施を援助するまたは可能にする付属的材料を、キット内に含めてもよい。

【0091】

試料中の修飾IgG抗体の反応性は、任意の適切な手段、例えば、放射免疫アッセイ(RIA)により測定しうる。放射活性標識抗原は、未標識抗原(試験試料)と混合させてもよく、修飾IgG抗体に結合させてもよい。結合抗原を未結合抗原から物理的に分離し、修飾IgG抗体に結合した放射活性抗原の量を決定する。競合的結合アッセイも、抗原またはレポーター分子に連結したアナログを使用して、非放射活性抗原で使用される。レポーター分子は、蛍光色素、リン光体または色素でありうる。適切な蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリンおよびテキサスレッドが挙げられる。適切な発色性色素としては、ジアミノベンジジンが挙げられる。

【0092】

他のレポーターとしては、巨大分子コロイド粒子または有色、磁性もしくは常磁性のラテックスビーズなどの粒状物質が挙げられ、また視覚的に観察される、電子工学的に検出されるまたは他の方法で記録される検出可能なシグナルを直接的にまたは間接的に生じさせることができる生物学的または化学的に活性な物質が挙げられる。これらの分子は、例えば、色を発色もしくは変化させる反応を触媒するまたは電気的特性の変化を生じさせる酵素でありうる。それらは分子的に励起性でありえ、エネルギー状態間の電子遷移により、特徴的なスペクトル吸収または発光をもたらす。それらはバイオセンサと組み合わせて使用される化学的実体を含んでもよい。ピオチン/アビジンまたはピオチン/ストレプトアビジンおよびアルカリホスファターゼ検出系を使用してもよい。抗体-レポーターコンジュゲートにより生成されたシグナルを使用して、試料中の関連する抗体結合の定量可能な絶対的または相対的データを誘導してもよい。

【0093】

また本発明は、競合アッセイにおいて抗原レベルを測定するための修飾IgG抗体の使用を提供する。修飾IgG抗体は、例えば、結合に際して物理的または光学的変化が生じるようにレポーター分子に連結させてもよい。レポーター分子は、検出可能、好ましくは測定可能なシグナルを、直接的にまたは間接的に生成しうる。レポーター分子は、共有結合により、例えばペプチド結合を介して、または非共有結合により、直接的または間接的に連結させることができる。修飾IgG抗体とタンパク質レポーターは、ペプチド結合により、および融合タンパク質として組み換え的に発現させることにより、連結させうる。

【0094】

本発明のさらなる態様および実施形態は、以下の実験的例証を含む本開示に照らして、当業者に明らかとなる。

【実施例 1】

【0095】

軽鎖折れ曲がり領域に追加のアミノ酸を有する修飾 IgG4 抗体

CAT192 は、TGF- β 1 特異的抗体であるが、その結合親和性のほとんどは、scFv から全長 IgG4 に変換されたときに失われた (図 1)。抗体サブタイプおよび Fc フォーマットだけではこの現象は説明されず、なぜなら IgG1 および IgG4 Fab の両方が TGF- β 1 に対して非常に低い親和性を示したためである。scFv の TGF- β 1 に対する強い結合は、重および軽鎖 Fv ドメインに接続している長い (GGGGS)₃ リンカーに起因する高いフレキシビリティによるものでありえた。この高いフレキシビリティは、scFv が Fab または IgG 型に変換される間に失われた可能性があった。CAT192 の低い親和性は、非常に遅い結合速度 (on-rate) ならびに非常に遅い解離速度 (off-rate) により特徴づけられた。遅い結合速度および解離速度から、CAT192 と TGF- β 1 との間の結合に必要となりうる潜在的な構造変化が、CAT192 (IgG4) の好ましくないアミノ酸により制限されたことが示唆された。抗体 Fv ドメインを CH1 ドメインに連結する軽鎖折れ曲がり領域に、追加のアミノ酸を加えることによって、scFv の Fab または IgG 型のフレキシビリティ / 親和性を増加させるように設計した実験を本明細書に記載した。より詳細には、下記表 2 に示すように、野生型軽鎖折れ曲がり領域に 1 個のグリシン (G)、2 個のグリシン (GG)、2 個のグリシンおよび 1 個のセリン (GGS)、3 個のグリシンおよび 1 個のセリン (GGGS)、ならびに 4 個のグリシンおよび 1 個のセリン (GGGGS) 配列を加えて変異体を設計した。付加したアミノ酸には下線を付した。

【0096】

【表 4】

表 2: 修飾 IgG4 軽鎖折れ曲がり領域挿入変異体

名称	位置	アミノ酸配列
WT	軽鎖折れ曲がり領域	LEIKRTVA (配列番号21)
LC+G	軽鎖折れ曲がり領域	LEIK <u>G</u> RTVA (配列番号22)
LC+GG	軽鎖折れ曲がり領域	LEIK <u>GG</u> RTVA (配列番号23)
LC+GGS	軽鎖折れ曲がり領域	LEIK <u>GGS</u> RTVA (配列番号24)
LC+GGGS	軽鎖折れ曲がり領域	LEIK <u>GGGS</u> RTVA (配列番号25)
LC+GGGGS	軽鎖折れ曲がり領域	LEIK <u>GGGGS</u> RTVA (配列番号26)
A25S	軽鎖Fv	Ala25→Ser25

【0097】

軽鎖アミノ酸番号 25 は、scFv において Ala であるが、IgG4 に変換したとき、Ser に変化させた。したがって、Ala から Ser への変化が scFv の TGF- β 1 に対する親和性に影響を与えるかを試験するために、追加的に A25S 変異体を対照として含めた。野生型 CAT192 および変異体の DNA およびアミノ酸配列を、以下に示した。

配列番号 38 : 下線を付した折れ曲がり領域を有する CAT192 IgG1 野生型 LC のアミノ酸配列

EIVLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGI GDDL GWYQQKPGKAPILLI YGTSTLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTINS LQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

配列番号 27 : C A T 1 9 2 (I g G 1) 軽鎖のコード配列

atgggctggctcctgcatcatcctgtttctgggtggccacagccaccggcgtgcacagcGAGATCGTGCTGACACAGAGCCC
CAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCGGCGACGACCTGGGAT
GGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCATCCTGTGTATCTACGGCACCAGCACACTGCAGAGCGGCGTGCCCTCCAGA
TTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAACAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTG
TCTGCAAGACAGCAACTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGACCCCGGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCG
TGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCT
CGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTACCCGAGCAGGACTC
CAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTG
AGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGCGAGTGCTGA

10

C A T 1 9 2 L C + G (L E I K G R T V A)

フォワード 5'-ggctggaaatcaagggccgtacggtggccgc-3' (配列番号 28)

相補体 5'-gcgccaccgtacggcccttgatttccagcc-3' (配列番号 29)

CAT192LC+GG. (LEIKGGRTVA)

フォワード 5'-ggctggaaatcaagggcgccgtacggtggccgc-3' (配列番号 30)

相補体 5'-gcgccaccgtacggccgcttgatttccagcc-3' (配列番号 31)

CAT192LC+GGS. (LEIKGGSRTVA)

フォワード 5'-ggctggaaatcaagggcgccgtacggtggccgc-3' (配列番号 32)

相補体 5'-gcgccaccgtacggctgccccttgatttccagcc-3' (配列番号 33)

CAT192LC+GGGS. (LEIKGGGSRTVA)

20

フォワード 5'-ggctggaaatcaagggcgccgtacggtggccgc-3' (配列番号 34)

相補体 5'-gcgccaccgtacggctgccccttgatttccagcc-3' (配列番号 35)

CAT192LC+GGGGS. (LEIKGGGGSRTVA)

フォワード 5'-ggctggaaatcaagggcgccgtacggtggccgc-3' (配列番号 36)

相補体 5'-gcgccaccgtacggctgccccttgatttccagcc-3' (配列番号 37)

【0098】

5つのCAT192LC変異体、ならびにA25S変異体およびWT LCを、24ウェルプレートフォーマット(4×1mL)においてExp1293Fトランスフェクション系(Life Technologies)を使用して、Hisタグ化CAT192HC Fabと共発現した。馴化培地(CM)を、トランスフェクション後4日で回収し、Octet QK384機器を使用して、単一アッセイの発現レベルおよびTGF- β 1結合を計算した。精製CAT192Fab-Hisを標準曲線として使用した(100から3.125 μ g/mLへ2倍希釈)。CAT192Fab CMを、希釈剤で1:10希釈し、GC1008 Fab CMを陽性対照として含めた。抗Fab-CH1バイオセンサへの結合を、1000rpmおよび30°Cのプレート温度で2分間測定し、定量および捕捉のために測定した。次いで、結合評価のために200nMのTGF- β 1を含有するウェルにセンサを移した。

30

【0099】

TGF- β 1結合結果は、それぞれの追加のアミノ酸挿入が、WT対応物と比較して、CAT192Fabの結合親和性を増加させたことを示した。少なくとも2つのグリシンの付加は、GC1008 Fab抗体のレベルと匹敵するレベルに結合親和性を増加させた。A25S変異体は、WTおよび精製組み換えCAT192Fabの親和性と同様の低いTGF- β 1結合親和性を示した。センサに捕捉されたFabの量が、濃度に対して正規化されても、バッファーについて減算されてもいなかったため、結果は定性的であった。

40

【0100】

次いで、表面プラズモン共鳴を使用してTGF- β 1に対する親和性を正確に評価し、アイソフォーム-特異性を確認するために、CAT192LC Fabバリエーションを、Rainin製のPureSpeed IMACチップを使用して精製した。それぞれの試料について2つの1mL精製チップ(20 μ L樹脂)を使用するために、それぞれの試料の馴化培地を4つのウェルに分割し(それぞれ約800 μ L)、それぞれに約200 μ Lの

50

平衡化バッファーを加えた。イミダゾールを除去する溶出工程の後、試料を、Amicon Ultraフィルターを使用して、Gibco PBS pH 7.2 にバッファー交換した。濃度をA280により測定し、3.5 µgを非還元4~20% Tris - グリシン SDS - PAGEゲルに負荷し、Coomassie染色により純度を検査した。全体の収率は、CM中の出発物質に対して12~42%の範囲であった。

【0101】

Biacore T200機器を使用して、精製CAT192WTおよびLC変異体FabのTGF結合親和性を評価した。TGF 1、TGF 2およびTGF 3(124、125および112RU)を、アミン化学反応を使用して、CM5シリーズSチップに固定化した。低親和性および高親和性の結合物質両方を考慮して広範囲の濃度を使用した。Fabを、HBS-EP+バッファー中で270から0.37 nMへ3倍希釈した。それぞれの試料は2連で注入した。K_Dは、最高濃度が30 nMの典型的な濃度範囲を使用して測定した。Biacore結合結果は、上述のOctetの結果と一致し、つまりCAT192LCの折れ曲がり領域におけるアミノ酸の付加は、TGF 1に対する結合親和性を改善した。追加の残基の挿入ごとに段階的な改善が示された(図6)。CAT192Fab LC変異体のいずれも、同じ条件下でTGF 2またはTGF 3に結合せず、変異体がアイソフォーム選択性を保持しつつ、TGF 1結合性を顕著に増加させていることが示された。それゆえ、折れ曲がり部分改変変異体は、アイソフォーム選択性およびTGF 1に対する高親和結合性を有する一連の新規バリエーションであった。

【0102】

【表5】

表3: 修飾 Fab の K_D

試料	K _D (nM)
WT Fab	n/a
LC+G Fab	n/a
LC+GG Fab	3.32
LC+GGS Fab	3.76
A25S Fab	n/a

【実施例2】

【0103】

重鎖折れ曲がり領域に追加のアミノ酸を有する修飾IgG4抗体

高親和性およびTGF 1選択的結合を示した折れ曲がり領域における軽鎖変異体に続く探求として、抗体のFvドメインをCH1ドメインに連結させる重鎖折れ曲がり領域に追加のアミノ酸を挿入することによって、フレキシビリティ/親和性を増加させるように変異体を設計した。より詳細には、下記表4に示すように、野生型重鎖折れ曲がり領域に1個のグリシン(G)、2個のグリシン(GG)、ならびに4個のグリシンおよび1個のセリン(GGGGS)配列を加えて変異体を設計した。付加したアミノ酸には下線を付した。

【0104】

【表 6】

表 4: 修飾 IgG4 重鎖折れ曲がり部分挿入変異体

名称	位置	アミノ酸配列
WT	重鎖折れ曲がり領域	TVTVSSAST (配列番号44)
HC+G	重鎖折れ曲がり領域	TVTVSGSAST (配列番号45)
HC+GG	重鎖折れ曲がり領域	TVTVSGGSAST (配列番号46)
HC+GG-ST	重鎖折れ曲がり領域	TVTVSGGSA (配列番号47)
HC+GGGS	重鎖折れ曲がり領域	TVTVSGGGSSAST (配列番号 48)

10

【 0 1 0 5 】

HC + GG - ST は、PCR 変異誘発プロセスからは予測されなかった副生成物であり、設計したように折れ曲がり部分に 2 つのグリシンが加わっていたが、DNA 配列決定で確認されたように、折れ曲がり領域末端で 2 つのアミノ酸が欠失していた。この変異体は、重鎖折れ曲がり領域のアミノ酸の数は同じであるが、折れ曲がり部分リンカーにおけるアミノ酸組成が異なっていた。この変異体を、特性決定および親和性比較のための対照として含めた。

C A T 1 9 2 HC + G プライマー

20

フォワード 5'-ccaccgtgacagtgtctggcagcgccagc-3'

(配列番号 5 0)

相補体 5'-gctggcgctgccagacactgtcacggtgg-3'

(配列番号 5 1)

C A T 1 9 2 HC + GG - ST プライマー

フォワード 5'-ccaccgtgacagtgtctggcggcagcgccagc-3'

(配列番号 5 2)

相補体 5'-gctggcgctgccgccagacactgtcacggtgg-3'

(配列番号 5 3)

C A T 1 9 2 HC + G G G S プライマー

30

フォワード 5'-caccaccgtgacagtgtctggcggcgccgagcagcgccagca-3'

(配列番号 5 4)

相補体 5'-tgctggcgctgctgccgccgccagacactgtcacggtggtg-3'

(配列番号 5 5)

C A T 1 9 2 HC + GG プライマー

フォワード 5'- caccaccgtgacagtgtctggcggcagcgccagca -3'

(配列番号 5 2 9)

相補体 5'- tgctggcgctgccgccagacactgtcacggtggtg -3'

(6 0)

【 0 1 0 6 】

40

これらの C A T 1 9 2 H C 変異体を、24 ウェルプレートフォーマット (4 × 1 m L) において E x p i 2 9 3 F トランスフェクション系 (L i f e T e c h n o l o g i e s) を使用して、C A T 1 9 2 L C F a b と共発現した。馴化培地をトランスフェクション後 4 日で回収し、次いで R a i n i n 製の P u r e S p e e d I M A C チップを使用して精製し、T G F 1 に対する親和性を正確に評価した。

【 0 1 0 7 】

B i a c o r e T 2 0 0 機器を使用して、実施例 1 に記載されるように、精製 C A T 1 9 2 変異体 F a b の T G F 結合親和性を評価した。図 6 に示す結果から、軽鎖折れ曲がり領域の変異体と同様に、C A T 1 9 2 重鎖の折れ曲がり領域におけるアミノ酸の付加も、T G F 1 に対する結合親和性を改善させたことが示唆された。例えば、C A T 1 9

50

2 HC + GGGGS 変異体は、TGF 1 に対する非常に高親和性の結合を示した。

【実施例 3】

【0108】

重および軽鎖組み合わせ変異体

組み合わせ CAT192 変異体を、24 ウェルプレートフォーマット (4 × 1 mL) に
おいて Expi293F トランスフェクション系 (Life Technologies)
) を使用して、重および軽鎖の両方の折れ曲がり領域に変異体を有するコトランスフェク
ション DNA により作製した。様々な組み合わせを表 5 に列挙した。

【0109】

【表 7】

10

表 5: 様々な重および軽鎖組み合わせ変異体

WTHC WTL C	WTHC LC+G	WTHC LC+GG	WTHC LC+GGS	WTHC LC+GGGS	WTHC LC+GGGGS
HC+G WTL C	HC+G LC+G	HC+G LC+GG	HC+G LC+GGS	HC+G LC+GGGS	HC+G LC+GGGGS
HC+GG WTL C	HC+GG LC+G	HC+GG LC+GG	HC+GG LC+GGS	HC+GG LC+GGGS	HC+GG LC+GGGGS
HC+GG-ST WTL C	HC+GG-ST LC+G	HC+GG-ST LC+GG	HC+GG-ST LC+GGS	HC+GG-ST LC+GGGS	HC+GG-ST LC+GGGGS
HC+GGGGS WTL C	HC+GGGGS LC+G	HC+GGGGS LC+GG	HC+GGGGS LC+GGS	HC+GGGGS LC+GGGS	HC+GGGGS LC+GGGGS

20

【0110】

馴化培地をトランスフェクション後 4 日で回収し、次いで、TGF 1 に対する親和性
を正確に評価するために、Rainin 製の PureSpeed IMA C チップを使用
して精製した。

30

【0111】

Biacore T200 機器を使用して、実施例 1 に記載されるように、精製 CAT
192 変異体 Fab の TGF 結合親和性を評価した。図 3 に示される結果から、組み合
わせ変異体が、CAT192 の TGF 1 に対する高親和性結合を取り戻したことが示唆
された。これらの変異体 Fab による結合親和性 (KD) を表 6 にまとめた。

【0112】

【表 8】

表 6: Biacore により決定される重および軽鎖組み合わせ変異体の TGFβ1 結合親和性(KD)

Fabs	抗原	k_a ($\times 10^5$ /Ms)	k_d ($\times 10^{-4}$ /s)	K_D nM)
WT HC/WT LC	TGFβ1	n/d	n/d	>100
WT HC/LC+G	TGFβ1	0.16	10.6	66.5
WT HC/LC+GG	TGFβ1	0.70	5.69	8.1
WT HC/LC+GGS	TGFβ1	0.68	5.95	8.8
WT HC/LC+GGGS	TGFβ1	0.89	5.87	6.6
WT HC/LC+GGGGS	TGFβ1	1.18	5.83	5.0
HC+G/WT LC	TGFβ1	n/d	n/d	n/d
HC+G/LC+G	TGFβ1	1.51	6.32	4.2
HC+G/LC+GG	TGFβ1	2.36	6.64	2.8
HC+G/LC+GGS	TGFβ1	2.27	6.96	3.1
HC+G/LC+GGGS	TGFβ1	2.54	6.93	2.7
HC+G/LC+GGGGS	TGFβ1	2.62	6.90	2.6
HC+GG/WT LC	TGFβ1	0.2	5.3	31.7
HC+GG/LC+G	TGFβ1	1.1	4.9	4.4
HC+GG/LC+GG	TGFβ1	2.2	3.8	1.8
HC+GG/LC+GGS	TGFβ1	1.8	4.3	2.3
HC+GG/LC+GGGS	TGFβ1	2.4	3.7	1.5
HC+GG/LC+GGGGS	TGFβ1	2.2	3.9	1.8
HC+GG-ST/WT LC	TGFβ1	0.85	8.11	9.6
HC+GG-ST/LC+G	TGFβ1	1.31	5.87	4.5
HC+GG-ST/LC+GG	TGFβ1	2.04	6.64	3.3
HC+GG-ST/LC+GGS	TGFβ1	2.11	6.67	3.2
HC+GG-ST/LC+GGGS	TGFβ1	1.47	6.31	4.3
HC+GG-ST/LC+GGGGS	TGFβ1	2.50	7.17	2.9
HC+GGGGS/WT LC	TGFβ1	0.68	5.79	8.5
HC+GGGGS/LC+G	TGFβ1	2.21	6.77	3.1
HC+GGGGS/LC+GG	TGFβ1	2.65	7.27	2.7
HC+GGGGS/LC+GGS	TGFβ1	2.63	7.09	2.7
HC+GGGGS/LC+GGGS	TGFβ1	2.78	7.16	2.6
HC+GGGGS/LC+GGGGS	TGFβ1	2.64	7.44	2.8
GC1008 Fab	TGFβ1	7.11	20.80	2.9

n/d=検出されず

【 0 1 1 3 】

重鎖および軽鎖の両方の折れ曲がり領域が改変されるとき、必要なアミノ酸挿入は、より少なくなった。例えば、「HC+G」および「LC+G」変異体の組み合わせは、TGFβ1 に対して非常に高親和性の結合を示した。

【実施例 4】

【 0 1 1 4 】

10

20

30

40

50

全長IgG4バリエーションの親和性および効力の特性決定

IgG4フォーマットの変異体を生成し、Biacoreによる回復した親和性が、A549細胞ベースの効力アッセイにおいて確認できるかどうかを測定した。CAT192 HC Fabを重鎖S228P IgG4主鎖にクローニングしてハーフ抗体の形成を最小化し、次いでExp1293F細胞にCAT192 IgG4 S228P HCおよびLC挿入変異体をコトランスフェクトした。

【0115】

バイオアッセイのために十分な材料を得るために、30 mLのトランスフェクションを全長CAT192 HCおよびLC挿入変異体を実施した。Exp1293F細胞に、30 μ gのDNA (15 μ g LC + 15 μ g HC) をトランスフェクトした。馴化培地を、トランスフェクション後4日で回収し、OctetによりプロテインAバイオセンサを使用して解析し、約200 μ g/mLの発現を得た。次いでCMを、ぜん動ポンプを備えたHi-TrapプロテインA HPカラムを使用して精製した。CMを0.5 mL/分で各カラムに負荷し、25カラム体積(CV)の50 mM NaPi、25 mM NaCl pH7.1 (2 mL/分) で洗浄し、25 CVの10 mMコハク酸ナトリウムpH6.0 (2 mL/分) で洗浄し、3 \times 2 mLの画分を、10 mMコハク酸ナトリウムpH3.75を用いて1 mL/分で溶出した(#1、#2、#3と標識)。プロテインA溶出物を0.2 M NaOHで中和し、0.2 M NaClを加え、40 mM NaClの最終濃度とした。次いで試料を濃縮し、50 mM NaPi、25 mM NaCl pH7.1にバッファー交換した。次いでCAT192 IgG4 S228P HCおよびLC挿入変異体プロテインA溶出物を4~20% Trisグリシゲル上で泳動させ(図3)、TGF1/TGF2/TGF3結合についてBiacoreにより比較した(図4)。Biacore結果から、精製CAT192 IgG4変異体が、実際にTGF1結合を回復したことが示された。変異体のいずれもTGF2またはTGF3に結合しなかった(図4)。

【0116】

【表9】

表7 Biacoreによって決定される全長IgG4バリエーションのTGF β 1結合親和性(KD)

試料	k_a ($\times 10^5$ /Ms)	k_d ($\times 10^{-4}$ /s)	K_D (nM)
CAT192 IgG4 S228P	n/d	n/d	>100
CAT192 IgG4 S228P LC+G	0.15	5.26	36.1
CAT192 IgG4 S228P LC+GG	1.0	0.2	0.2
CAT192 IgG4 S228P LC+GGS	0.8	2.2	2.7
CAT192 IgG4 S228P LC+GGGS	0.6	0.6	1.0
CAT192 IgG4 S228P LC+GGGGS	0.6	1.5	2.6
CAT192 IgG4 S228P HC+G	0.5	2.1	4.1
CAT192 IgG4 S228P HC+GG	1.0	2.0	2.2
CAT192 IgG4 S228P HC+GGGS	1.1	1.5	1.3
CAT192 IgG4 S228P HC+GG/LC+GG	2.4	0.5	0.2

n/d=検出されず

【0117】

次いで、CAT192 IgG S228P LC挿入変異体を、A549細胞効力アッセイ(Rapozaら、2006、J Immunol Methods、316巻、18頁)で特性決定した。結果(図5)は、TGF1刺激IL-11産生に対するCAT192挿入変異体による阻害効果で示されるように、CAT192挿入変異体が、TGF

1 活性を中和することを示した。軽鎖折れ曲がり部分に付加された2つのグリシンは、B i a c o r e 結合実験で観察されたように、C A T 1 9 2 が効能を回復するために十分であるようであった。

【実施例5】

【0118】

熱安定性試験

示差走査蛍光定量(DSF)を折れ曲がり部分挿入変異体を実施して、重鎖および軽鎖のヒンジ領域の追加のアミノ酸がC A T 1 9 2 F a b 挿入変異体の熱安定性にどのように影響を与えるかを測定した。DSFの基本的原理は、温度が上昇するとき、アンフォールディングするタンパク質の疎水性領域に蛍光色素が結合して、シグナルの増加をもたらすものである。この方法は、限定された試料で実施することができ、高スループット様式で試料の相対的安定性を得るために使用することができる。S y p r o o r a n g e を蛍光色素として使用した。使用条件は、0.1 mg/mLのタンパク質、1:4000の色素比率、および全体積10 µLであった。結果は、C A T 1 9 2 F a b 挿入変異体の相対的安定性が、折れ曲がり部分におけるグリシンの付加によってわずかに減少し、最も長い付加を有する変異体が最も安定性が低いことを示した(図7)。T_m値を図7にまとめた。一部の長い鎖の変異体のT_m値は、そのアンフォールディングパターンのため、計算されなかった。相対的安定性のわずかな減少は、一部の軽鎖変異体を、F a b から I g G 4 フォーマットに変換させたときにも観察された(図8)。

【実施例6】

【0119】

C A T 1 9 2 F a b バリエーションの結晶構造決定

C A T 1 9 2 F a b W T および3つのバリエーションのタンパク質構造を、可変ドメインのフレキシビリティの増加にともなって高親和性がどのように取り戻されるのかについて構造的な説明を提供するために解明した。

【0120】

150 mLのトランスフェクションを、C A T 1 9 2 H C および L C F a b 挿入変異体を実施して、構造試験のための十分な材料を得た。E x p i 2 9 3 F 細胞に、150 µgのDNA(75 µg L C + 75 µg H C)をトランスフェクトした。馴化培地を、トランスフェクション後5日で回収した。次いでCMを、20 mM N a P i pH 7.4、500 mM N a C l、5 mM イミダゾールを使用して平衡化したH i s - T r a p E x c e l カラムを使用して精製した。F a b タンパク質を、サイズ排除クロマトグラフィーカラム(S u p e r d e x 2 0 0 1 0 / 3 0 0)を使用して、20 mM N a P i pH 7.4、500 mM N a C l、500 mM イミダゾールで溶出し、すぐに20 mM H E P E S pH 7.0、50 mM N a C l にバッファー交換した。次いでF a b を20 mg/mLに濃縮し、スパス行列スクリーンを室温および4 °Cの両方で設定した。構造決定に使用した全ての結晶は、4 °Cで1:1タンパク質対結晶化条件比率(p r o t e i n t o c r y s t a l l i z a t i o n c o n d i t i o n r a t i o)で取得した。野生型タンパク質および低結合親和性の変異体を、P 2 1 空間群で、同様のP E G 条件(W T : 1 2 % P E G 8 K / 0.1 M カコジル酸ナトリウム pH 6 / 0.2 M M g C l₂、C A T 1 9 2 W T H C / L C + G : 1 2 % P E G 2 0 K / 0.1 M M E S pH 6.5、C A T 1 9 2 H C + G G G G S / W T L C : 1 2 % P E G 2 0 K、0.1 M M E S pH 5.75)で結晶化した。高い結合親和性の変異体(H C + G G / L C + G G)を、2 M 硫酸アンモニウム、0.1 M 酢酸ナトリウム、pH 4.6(空間群:C 2)中で結晶化した。

【0121】

低/中程度結合親和性のバリエーションと野生型F a b の構造(H C + W T / L C + G および H C + G G G G S / L C + W T)は、ほぼ同一であった(図9、パートA)。W T H C / L C + G および H C + G G G G S / W T L C は、W T C A T 1 9 2 と、それぞれ0.516 および0.538 のR.M.S.Dで重ね合わされた。これらの構造のそ

れぞれにおいて、C D R H 3 領域に関する電子密度は、非対称ユニットの全ての分子で欠けていた。このことは、このC D R が、低 / 中程度結合親和性変異体に対して高度にフレキシブルであったことを示唆していた。対照的に、高結合親和性変異体 (H C + G G / L C + G G) は、他のC A T 1 9 2 F a b 構造 (図 9 、 パート A) と比較して、可変ドメインの大きなコンホメーション変化を示した。4 つ全てのF a b 間の定常ドメインは良好に重ね合わせられるが、C A T 1 9 2 H C + G G / L C + G G の可変ドメインは、他の構造と比較して、有意にシフトしていた (図 9 、 パート B) 。さらにH C C D R 3 領域は、高結合親和性構造で完全に構築されており、L C C D R 3 との相互作用 (< 3) により安定化されていた。これらの4 つの構造は、B i a c o r e の結果と一致し、C A T 1 9 2 の高結合親和性を取り戻すには、大きなコンホメーション再編成が必要であることを示唆した。

10

【 0 1 2 2 】

〔 配列表 〕

配列番号 1 : ヒト I g G 1 V H ドメインクローン S L 1 5 (S Q N 4 U S 6 4 9 2 4 9 7)

EVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTTVTVSS

配列番号 2 : ヒト I g G 1 V H ドメインクローン J T 1 8 2 (S Q N 1 0 U S 6 4 9 2 4 9 7)

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPASPDWGQGTTVTVSS

20

配列番号 3 : ヒト I g G 1 V ドメインクローン S L 1 5 A : (S Q N 6 U S 6 4 9 2 4 9 7)

EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQIGDDL GWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQP EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

配列番号 4 : ヒト I g G 1 V ドメインクローン S L 1 5 S : (S Q N 8 U S 6 4 9 2 4 9 7)

EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCRSSQIGDDL GWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQP EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

配列番号 5 : ヒト I g G 1 ヒンジ領域

30

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

配列番号 6 : ヒト I g G 1 F c 領域

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 7

SYGMH

配列番号 8

VISYDGSIKYYADSVKG

配列番号 9

40

TGEYSGYDTSGVEL

配列番号 1 0

TGEYSGYDTPQYS

配列番号 1 1

TGFYSGYDTPASPD

配列番号 1 2

RASQIGDDL

配列番号 1 3

GTSTLQS

配列番号 1 4

50

LQDSNYPLT

配列番号 1 5

TGX₁YSGYDTX₂X₃X₄X₅X₆

配列番号 1 6 : C A T 1 9 2 (I g G 4) 軽鎖

EWLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGI GDDL GWYQQKPGKAP I L L I YGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT I NSLQPE
DFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLE I KRTVAAPSVF I FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKSDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 1 7 : C A T 1 9 2 (I g G 4) 重鎖

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAV I SYDGS I KYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPQYSWGQGT T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCAPEFLGG
PSVFLFPPKPKDTLM I SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPSS I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD I AVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

10

配列番号 1 8 : C A T 1 9 2 (I g G 4) S 2 2 8 P 重鎖

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAV I SYDGS I KYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPQYSWGQGT T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCAPEFLGG
PSVFLFPPKPKDTLM I SRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPSS I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD I AVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

20

配列番号 1 9 : C A T 1 9 1 (s c F v)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAV I SYDGS I KYYADSVKGRFT I SRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPQYSWGQGT T V T V S S S G G G S G G G S G G G S E I V L T Q S P S S L S A S V G D R V I T
CRSSQGI GDDL GWYQQKPGKAP I L L I YGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT I NSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGT
RLE I K

配列番号 2 0 : ヒ ト T G F 1

ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLY I DFRKDLGWKWI HEPKGYHANFCLGPCPY I WSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVP
QALEPLP I VYYVGRKPKVEQLSNM I VRSCCKS

配列番号 2 1 : C A T 1 9 2 I g G 4 野生型 L C 折れ曲がり領域

30

LE I KRTVA

配列番号 2 2 : 追加のアミノ酸 1 個が挿入された変異体 L C 折れ曲がり領域

LE I KGRTVA

配列番号 2 3 : 追加のアミノ酸 2 個が挿入された変異体 L C 折れ曲がり領域

LE I KG GRTVA

配列番号 2 4 : 追加のアミノ酸 3 個が挿入された変異体 L C 折れ曲がり領域

LE I KG G SRTVA

配列番号 2 5 : 追加のアミノ酸 4 個が挿入された変異体 L C 折れ曲がり領域

LE I KG G G SRTVA

配列番号 2 6 : 追加のアミノ酸 5 個が挿入された変異体 L C 折れ曲がり領域

40

LE I KG G G G SRTVA

配列番号 2 7 : C A T 1 9 2 (I g G 1) 軽鎖のコード配列

atgggctggtcctgcatcatcctgtttctggtggccacagccaccggcggtgcacagcGAGATCGTGCTGACACAGAGCCC
CAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCGGCGACGACCTGGGAT
GGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCATCCTGCTGATCTACGGCACCAGCACACTGCAGAGCGGCGTGCCCTCCAGA
TTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAACAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTG
TCTGCAAGACAGCAACTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCACCCGGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTTCCG
TGTTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTGGTGTGTCTGCTGAACAATTCTACCCT
CGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTC
CAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTG

50

AGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

配列番号 28 : CAT192LC+G (LEIKGRTVA)、フォワード

5'-ggctggaaatcaagggccgtacggtggccgc-3'

配列番号 29 : CAT192LC+G (LEIKGRTVA)、相補体

5'-gcggccaccgtacggcccttgatttccagcc-3'

配列番号 30 : CAT192LC+GG (LEIKGGRTVA)、フォワード

5'-ggctggaaatcaagggcgccgtacggtggccgc-3'

配列番号 31 : CAT192LC+GG (LEIKGGRTVA)、相補体

5'-gcggccaccgtacggccgcttgatttccagcc-3'

配列番号 32 : CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA)、フォワード

5'-ggctggaaatcaagggcgccagccgtacggtggccgc-3'

配列番号 33 : CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA)、相補体

5'-gcggccaccgtacggctgccgcccttgatttccagcc-3'

配列番号 34 : CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA)、フォワード

5'-ggctggaaatcaagggcgccagccgtacggtggccgc-3'

配列番号 35 : CAT192LC+GGG (LEIKGGSRTVA)、相補体

5'-gcggccaccgtacggctgccgcccttgatttccagcc-3'

配列番号 36 : CAT192LC+GGGG (LEIKGGGGRTVA)、フォワード

5'-ggctggaaatcaagggcgccgagccgtacggtggccgc-3'

配列番号 37 : CAT192LC+GGGG (LEIKGGGGRTVA)、相補体

5'-gcggccaccgtacggctgccgcccgcccttgatttccagcc-3'

配列番号 38 : C A T 1 9 2 I g G 1 野生型 L C

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQP
EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 39 : 追加のアミノ酸 1 個が挿入された変異体軽鎖

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQP
EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 40 : 追加のアミノ酸 2 個が挿入された変異体軽鎖

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQP
EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 41 : 追加のアミノ酸 3 個が挿入された変異体軽鎖

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQP
EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 42 : 追加のアミノ酸 4 個が挿入された変異体軽鎖

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQP
EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 43 : 追加のアミノ酸 5 個が挿入された変異体軽鎖

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSIQP
EDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 44 : C A T 1 9 2 I g G 4 野生型 H C 折れ曲がり領域

TVTVSSAS

配列番号 45 : 追加のアミノ酸 1 個が挿入された変異体 H C 折れ曲がり領域

TVTVSGSAS

配列番号 46 : 追加のアミノ酸 2 個が挿入された変異体 H C 折れ曲がり領域

10

20

30

40

50

TVTVSGGSAS

配列番号 47 : 追加のアミノ酸 2 個が挿入され、アミノ酸 1 個が欠失した変異体 H C 折れ曲がり領域

TVTVSGGSA

配列番号 48 : 追加のアミノ酸 5 個が挿入された変異体 H C 折れ曲がり領域

TVTVSGGGSSAS

配列番号 49 : C A T 1 9 2 I g G 4 野生型 H C のコード配列

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCCTCTGAAGTGCAGCTGGTGAATCTGG
CGGCGGAGTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGGAATGC
ACTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGAACTGGAATGGGTGGCGTGATCAGCTACGACGGCAGCATCAAGTACTACGCC
GACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGC
CGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAGAACCGGCGAGTACAGCGGCTACGACACCGACCCTCAGTACTCTTGGGGCC
AGGGCACCAACCGTGACAGTGTCTAGCGCCAGCACCAAGGGCCCAAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGACAGCAGAAGCACC
AGCGAATCTACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTCTGGAATCTGGCGC
CCTGACCAGCGGAGTGCATACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCTGTACTGTGC
CCAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG
CATCACCACCACCATCAC

10

配列番号 50 : CAT192HC+G (TVTVSGSAS)、フォワード

5'-ccaccgtgacagtgtctggcagcgccagc-3'

配列番号 51 : CAT192HC+G (TVTVSGSAS)、相補体

5'-gctggcgctgccagacactgtcacggtgg-3'

20

配列番号 52 : CAT192HC+GG-ST (TVTVSGGSA)、フォワード

5'-ccaccgtgacagtgtctggcggcagcgccagc-3'

配列番号 53 : CAT192HC+GG-ST (TVTVSGGSA)、相補体

5'-gctggcgctgccgcccagacactgtcacggtgg-3'

配列番号 54 : CAT192HC+GGGS (TVTVSGGGSSAS)、フォワード

5'-caccaccgtgacagtgtctggcggcgccgagcagcgccagca-3'

配列番号 55 : CAT192HC+GGGS (TVTVSGGGSSAS)、相補体

5'-tgctggcgctgctgccgcccagacactgtcacggtggtg-3'

配列番号 56 : 追加のアミノ酸 1 個が挿入された変異体重鎖

30

EVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPQYSWGQGTITVTVSGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 57 : 追加のアミノ酸 2 個が挿入され、アミノ酸 2 個が欠失した変異体重鎖

EVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPQYSWGQGTITVTVSGGSAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

配列番号 58 : 追加のアミノ酸 5 個が挿入された変異体重鎖

EVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSYDTPQYSWGQGTITVTVSGGGSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50

配列番号 59 : CAT192HC+GG (TVTVSGGSAS)、フォワード

5'-caccaccgtgacagtgtcttggcggcagcgccagca-3'

配列番号 60 : CAT192HC+GG (TVTVSGGSAS)、相補体

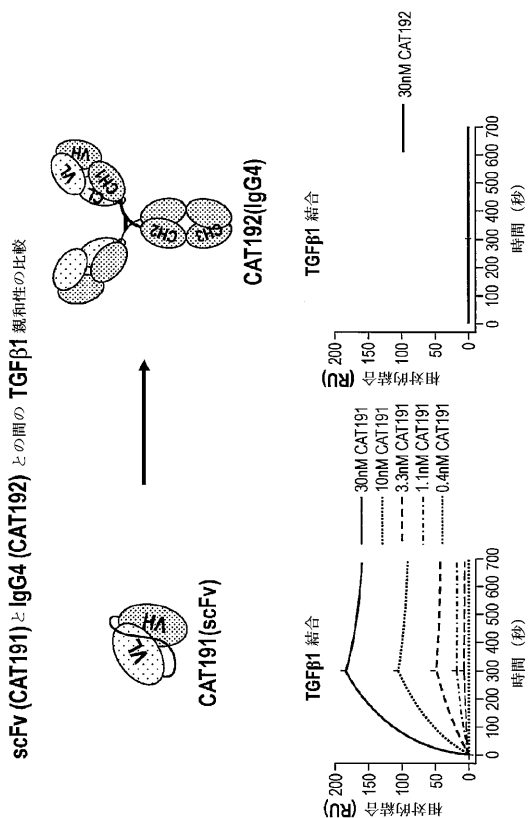
5'-tgctggcgtgccgccagacactgtcacggtggtg-3'

配列番号 61 : 追加のアミノ酸 2 個が挿入された変異体重鎖

EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYSGYDTPQYSWGQGTTVTVSGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

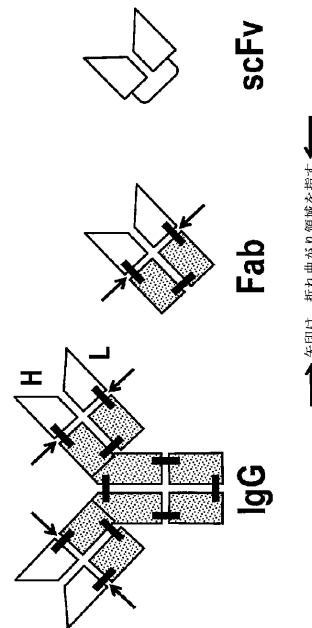
10

【図 1】

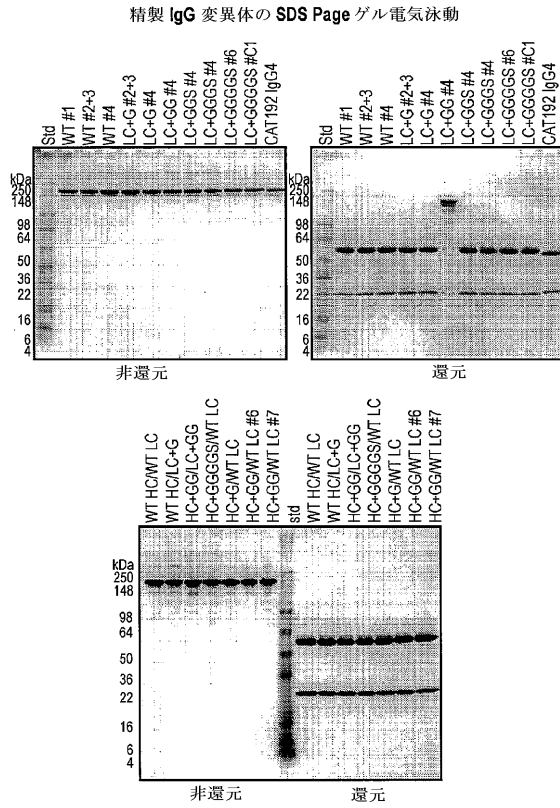


【図 2】

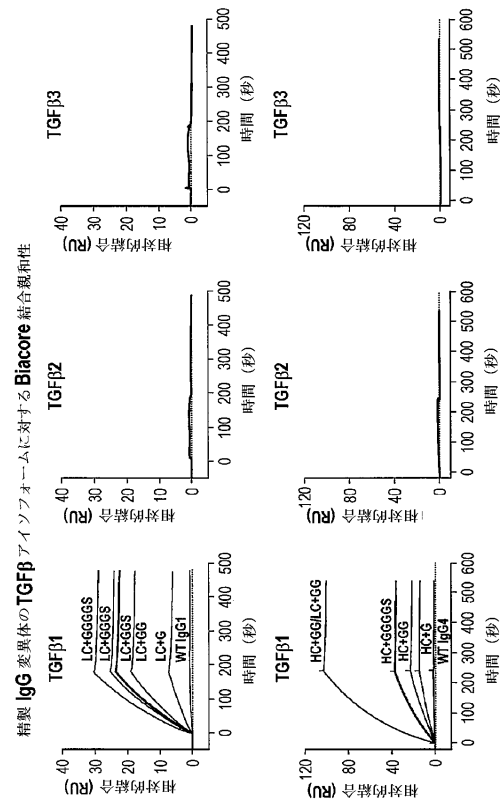
scFv, Fab, および IgG の構造要素比較



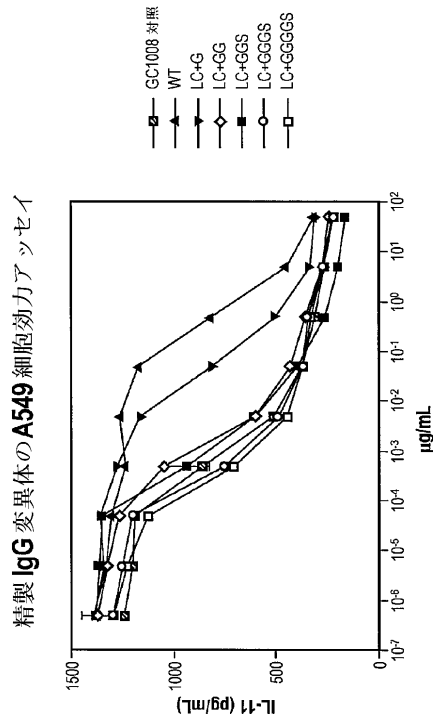
【図 3】



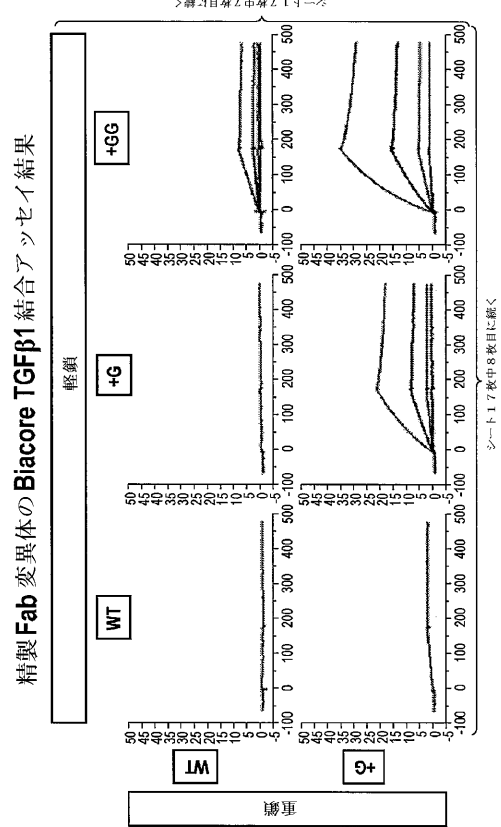
【図 4】



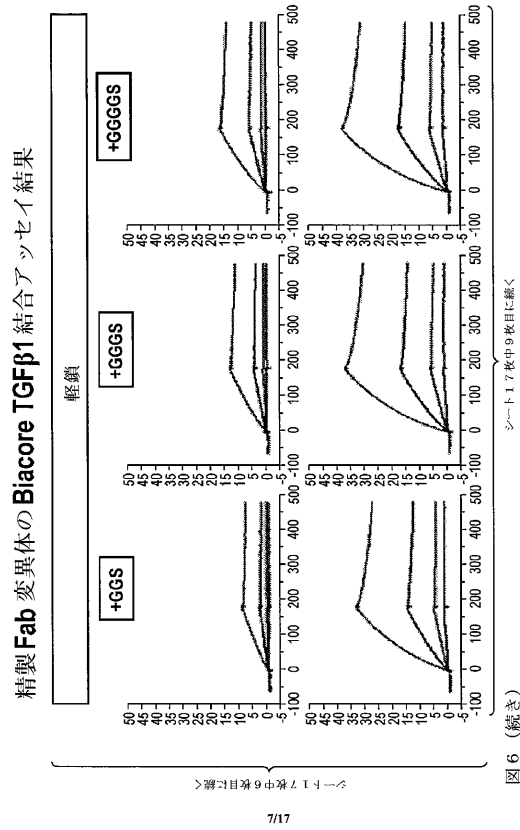
【図 5】



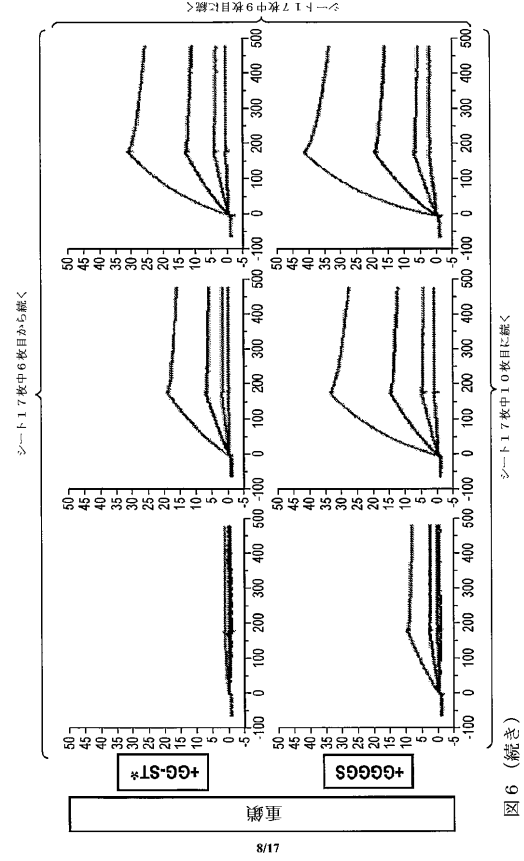
【図 6 - 1】



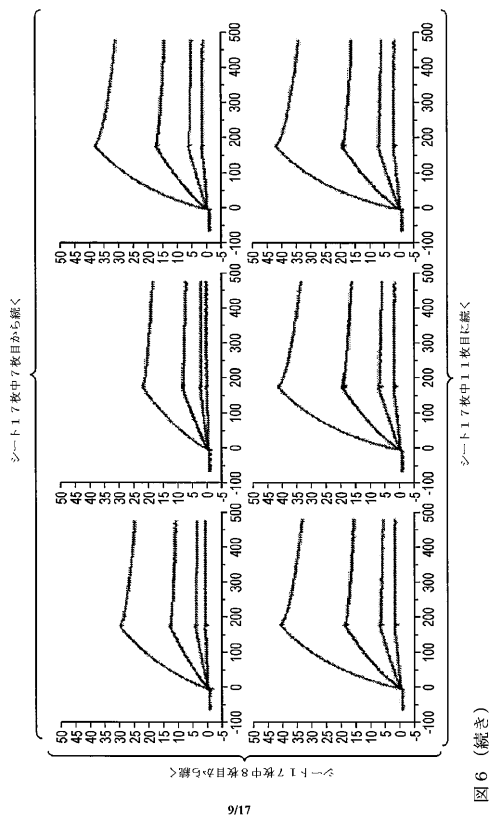
【図 6 - 2】



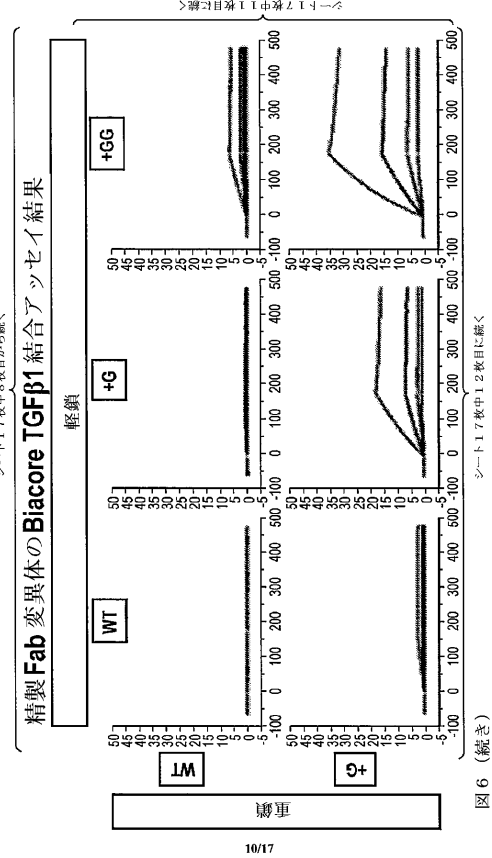
【図 6 - 3】



【図 6 - 4】



【図 6 - 5】



【図 6 - 6】

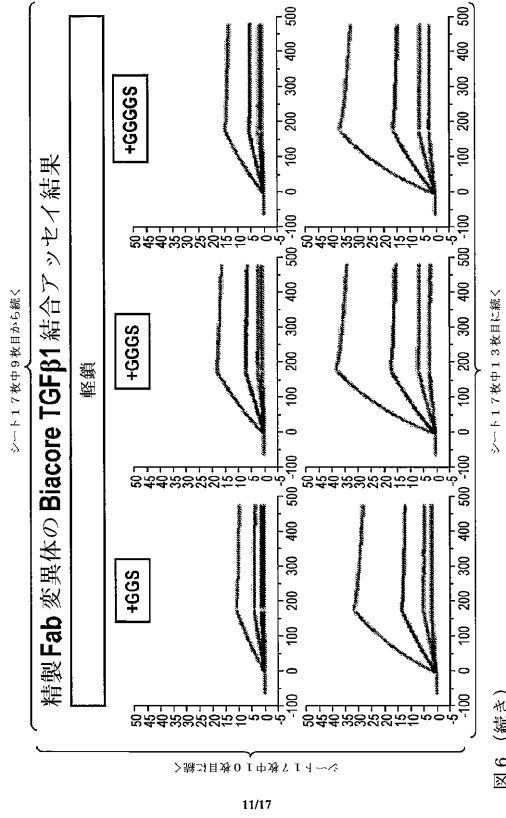


図 6 (続き)

【図 6 - 7】

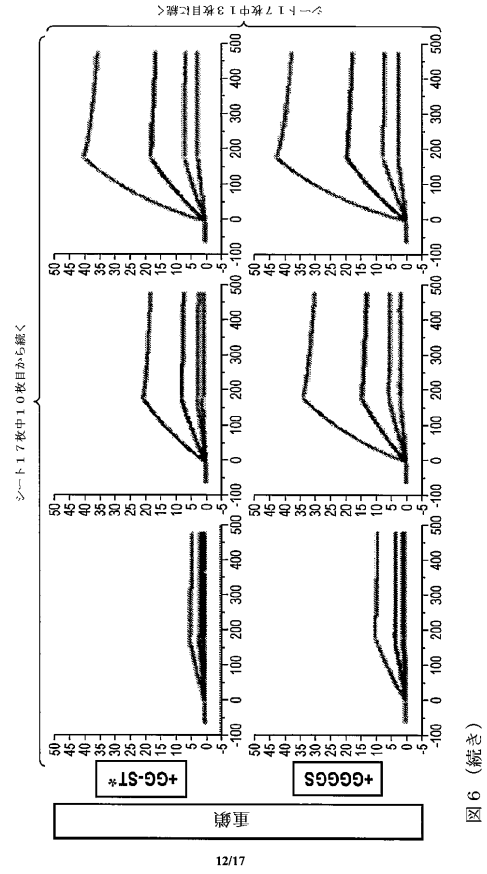


図 6 (続き)

【図 6 - 8】

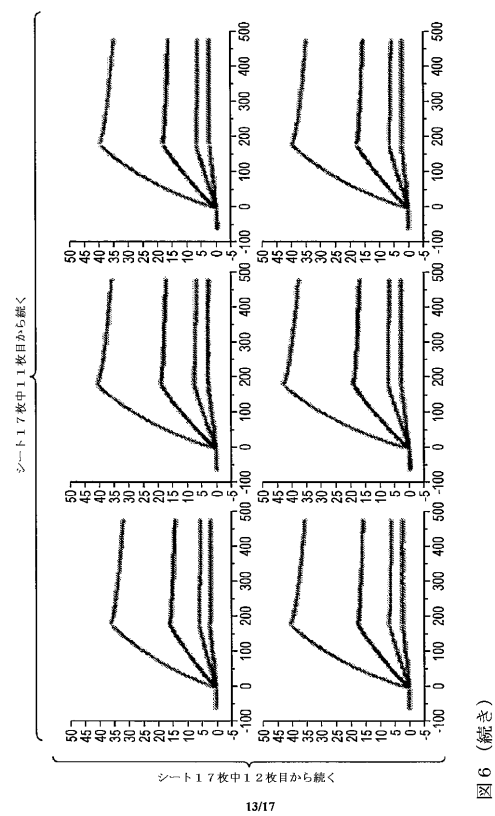
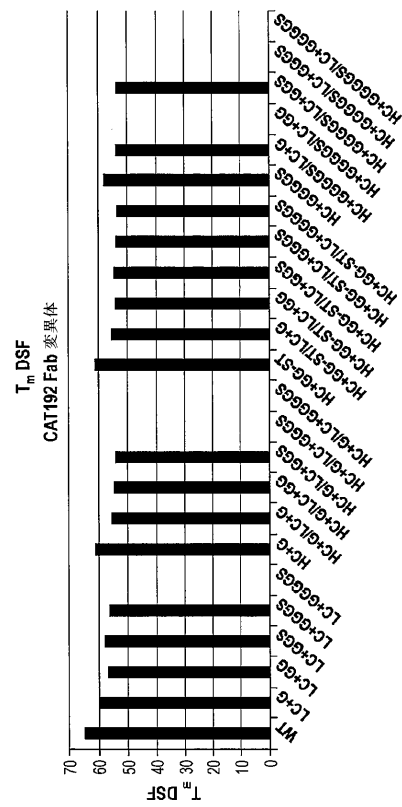


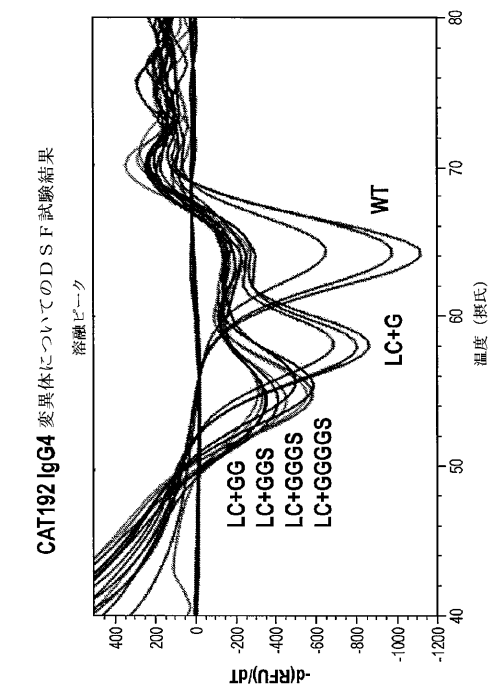
図 6 (続き)

【図 7】

CAT192 Fab 変異体についての DSF 試験結果のまとめ



【 図 8 】



【 図 9 - 1 】



【 図 9 - 2 】

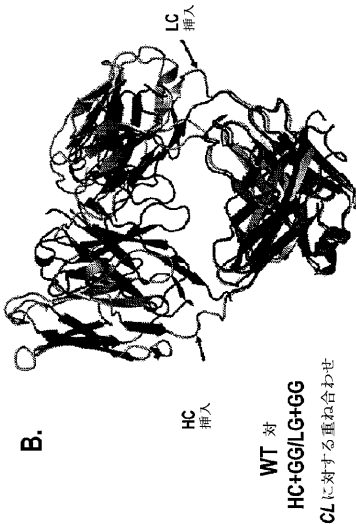


図 9 (続き)

【配列表】

0006745275000001.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 5/10	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)		A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 37/02	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 ジュリー・バード

アメリカ合衆国ニュージャージー州08807,ブリッジウォーター,メールコード:55エー-505エー,コーポレートドライブ55,サノフィ

審査官 金田 康平

(56)参考文献 特表2003-501348(JP,A)

Cell, 1980年, Vol. 22, pp. 197-207

Acta Cryst., 2013年, D69, pp. 388-397

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPI(S
TN)

UniProt/GeneSeq