

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-516305
(P2024-516305A)

(43)公表日 令和6年4月12日(2024.4.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	4 B 0 6 4	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全131頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-568038(P2023-568038)			(71)出願人	514232085
(86)(22)出願日	令和4年5月2日(2022.5.2)				ユーシービー バイオファルマ エスアールエル
(85)翻訳文提出日	令和5年12月28日(2023.12.28)				ベルギー国 1 0 7 0 ブリュッセル アレ
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/061661				デ ラ レシエルシエ 6 0
(87)国際公開番号	WO2022/233764			(74)代理人	110000855
(87)国際公開日	令和4年11月10日(2022.11.10)				弁理士法人浅村特許事務所
(31)優先権主張番号	63/183,280			(72)発明者	ライトウッド、ダニエル ジョン
(32)優先日	令和3年5月3日(2021.5.3)				英国 エスエル1 3ダブリューイー バークシャー、スラウ、バス ロード 2 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				8、ユーシービー、アイビーディー 気付
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く			(72)発明者	カディウ、イレーナ
					ベルギー王国 1 0 7 0 ブリュッセル、アレ ドウ ラ レシエルシエ 6 0、ユーシービー バイオファルマ エスアールエ最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体

(57)【要約】

本発明は、T R E M 1に結合し、その天然リガンドの1つ又は複数とのその相互作用を阻害する抗体に関する。そのような抗体の具体例が提供される。抗体の治療的使用及びそのような抗体を生成する方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 11 を含む C D R - L 1、
配列番号 12 を含む C D R - L 2、及び
配列番号 13 を含む C D R - L 3
を含む軽鎖可変領域と、
配列番号 14 を含む C D R - H 1、
配列番号 15 を含む C D R - H 2、及び
配列番号 16 を含む C D R - H 3
を含む重鎖可変領域と、
を含む、ヒト T R E M 1 に結合する抗体。

10

【請求項 2】

前記抗体が、T R E M 1 のその天然リガンドの 1 つ又は複数への結合を阻害又は減弱する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

P G L Y R P 1 への T R E M 1 の結合を阻害又は減弱する、請求項 1 又は請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

ヒト T R E M 1 について 6 0 0 p M 未満の解離平衡定数 (K D) を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 5】

前記抗体が P G L Y R P 1 とは T R E M 1 上の異なる部位に結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

ヒト T R E M 1 (配列番号 1) の残基 E 2 6、E 2 7、K 2 8、Y 2 9、E 3 0、L 3 1、K 3 2 を含む、前記ヒト T R E M 1 のエピトープに結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体が、前記抗体と T R E M 1 との間の 4 Å 接触距離未満の距離で決定される、ヒト T R E M 1 (配列番号 1) の E 2 6、E 2 7、K 2 8、Y 2 9、E 3 0、L 3 1、K 3 2、Q 3 5、T 3 6、D 3 8、K 4 0、D 4 2、R 9 7、D 1 2 7、T 1 3 4 及び G 1 3 6 から選択される 5 つ以上の残基を含む、前記ヒト T R E M 1 のエピトープに結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項 8】

前記結合が、X 線結晶学を使用して決定される、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 29 に示される配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

前記重鎖可変領域が、配列番号 79 に示される配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 11】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 29 に示される配列、又はそれと少なくとも 90 % 同一の配列を含み、前記重鎖可変領域が、配列番号 79 に示される配列、又はそれと少なくとも 90 % 同一の配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

各 C D R が 3 つまでのアミノ酸置換を含有し、そのようなアミノ酸置換が保存的である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 13】

前記軽鎖可変領域及び前記重鎖可変領域の残りの部分が、それぞれ配列番号 29 及び 7

50

9 と少なくとも 90 % の同一性を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 14】

抗体フラグメントである、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

前記抗体フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dsFv、scFv、又は dsscFv である、請求項 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

完全長抗体である、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 17】

IgG1、IgG1 LALA、IgG4、IgG4P、又は IgG4P FALA である、請求項 16 に記載の抗体。

10

【請求項 18】

配列番号 31 に示される配列を含む軽鎖と配列番号 81 に示される配列を含む重鎖とを含む IgG4P である、請求項 16 に記載の抗体。

【請求項 19】

前記抗体が IgG4P であり、前記軽鎖及び重鎖の残りの部分が、それぞれ配列番号 31 及び 81 と少なくとも 90 % の同一性又は類似性を有する、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 20】

ヒト TREM1（配列番号 1）の残基 E26、E27、K28、Y29、E30、L31、K32 及び Q35 を含む TREM1 エピトープへの結合について、請求項 1 に記載の抗体と交差競合する抗体。

20

【請求項 21】

ヒト TREM1 のエピトープに結合する IgG4P 抗体であって、前記エピトープが、ヒト TREM1（配列番号 1）の残基 E26、E27、K28、Y29、E30、L31、K32 及び Q35 を含む、IgG4P 抗体。

【請求項 22】

請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 23】

請求項 22 に記載のポリヌクレオチドを担持する、発現ベクター。

30

【請求項 24】

請求項 23 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 25】

請求項 24 に記載される宿主細胞を、前記抗体の産生を可能にする条件下で培養することと、前記産生された抗体を回収することと、を含む、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の抗体を産生する方法。

【請求項 26】

請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容されるアジュバント又は担体とを含む、医薬組成物。

40

【請求項 27】

治療によるヒト又は動物の身体の治療方法において使用するための、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 26 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

医薬品として使用するための、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

医薬品を製造するための、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 26 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 30】

50

神経障害の治療に使用するための、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

治療有効量の請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 2 6 に記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、神経障害を治療又は予防する方法。

【請求項 3 2】

神経障害を治療するための医薬品を製造するための、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 2 6 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 3 3】

前記神経障害が筋萎縮性側索硬化症（ALS）又はアルツハイマー病である、請求項 3 0 に記載の抗体又は医薬組成物、請求項 3 1 に記載の方法、又は請求項 3 2 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 TREM1 抗体及び神経障害の治療におけるその使用に関し、より詳細には、筋萎縮性側索硬化症（ALS）及びアルツハイマー病の治療のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

骨髄系細胞上に発現されるトリガー受容体（TREM）は、ヒト 6 p 2 1 番染色体及びマウス 1 7 番染色体に対する MHC 遺伝子クラスターマッピングによってコードされる免疫活性化及び免疫阻害アイソフォームを含む受容体である。TREM は、末梢の単球、好中球、及び樹状細胞、並びに中枢神経系（CNS）のミクログリアを含む骨髄系統の細胞で主に発現される免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーのメンバーである。骨髄細胞-1 上に発現されるトリガー受容体（TREM1）（別名、分化クラスター 3 5 4 として知られる）は、同定される TREM ファミリーの最初のメンバーであり、Ig スーパーファミリーの他の受容体との相同性は限られている。TREM1 は、単一の Ig 様ドメイン、そのシグナル伝達パートナーである DAP12 上の負に荷電したアスパラギン酸と相互作用する（+）荷電リジン残基を有する膜貫通領域、及びシグナル伝達ドメインを欠く短い細胞質尾部を有する、膜貫通糖タンパク質である。

【0003】

その提案されたりガンドペプチドグリカン認識タンパク質 1（PGLYRP1）、高移動度群 B1（HMGB1）、可溶性 CD177、熱ショックタンパク質 70（HSP70）、細胞外低温誘導性 RNA 結合タンパク質（eCIRP）との相互作用による TREM1 活性化は、「head-to-tail」ホモ二量体の形成を誘導することが提案されている。二量体架橋は、動員された DAP12 上の免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）のリン酸化を誘発し、これは、脾臓チロシンキナーゼ（SYK）、並びにゼータ鎖関連タンパク質キナーゼ 70（ZAP70）、casitas b 系統リンパ腫（Cbl）、セブンレスの息子（son of sevenless）（SOS）、及び増殖因子受容体結合タンパク質 2（GRB2）を含むその下流シグナル伝達パートナーのドッキング部位を提供することによってシグナル伝達及び機能を可能にする。これらの相互作用は、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ（PI3K）経路、ホスホリパーゼ C-γ2（PLC-γ2）経路及び ERK 経路を介して下流のシグナル伝達を引き起こす。これらの事象の後に、カルシウム動員、ETS 含有タンパク質（ELK1）、活性化 T 細胞の核因子（NFAT）、AP1、c-fos、c-Jun 及び NF-κB を含む転写因子の活性化が続く。この経路は、TREM ファミリー TREM2 の別のメンバーと共有されている。

【0004】

明らかに免疫活性化剤である T R E M 1 とは異なり、T R E M 2 は、高親和性リガンド及び低親和性リガンドにそれぞれ結合すると、炎症促進性及び抗炎症性の両方として作用することができる。恒常性条件下では、低親和性リガンドとの T R E M 2 相互作用は、恒常性の維持をチェックする経路を維持する (K o n i s h i H . , e t a l . F r o n t i e r s C e l l u l a r N e u r o s c i e n c e 2 0 1 8) 。

【0005】

神経炎症性神経変性状態では、損傷関連分子パターン (D A M P s) としても知られる細胞内因子 (とりわけ T R E M 1 リガンド) が、死にかけているニューロンからこぼれ、T R E M 1 及び他のパターン認識受容体を介してミクログリアの監視を活性化する。T R E M 1 - D A M P 相互作用は T R E M 2 活性をオーバーライドし、その結果、ミクログリア／自然免疫活性化、直接的な神経毒性、及び異常な食作用によるシナプス構造の破壊をもたらす。経路調節における T R E M 2 とのその「Y i n 及び Y a n g」の動的性を超えて、T R E M 1 は、T o l l 様 (T L R) 及び N O D 様受容体ファミリーを含む自然免疫応答の他の重要な調節因子の増強剤として独特かつ明確な機能を有する。これらの受容体の増幅は、T L R、M Y D 8 8 及び I K K などのそれらの下流ノードの T R E M 1 誘導過剰発現によって、又は P G N (T L R 2 / T L R 4 刺激因子) 及び P G L Y R P 1 (T R E M 1 リガンド) の場合のように T L R アゴニストと T R E M 1 リガンドとの間に形成された T R E M 1 リガンド複合体を介した直接架橋のいずれかによって起こる。

【0006】

T R E M 1 多経路活性化の結果は、サイトカイン及びケモカイン放出、共刺激分子／抗原提示の上方制御及び異常な食作用活性を含む自然免疫／ミクログリア炎症促進性応答の増幅をもたらす。下流 (B u c h o n e t a l , 2 0 0 0)。これらのプロセスは、様々な神経変性、神経発達及び自己免疫性中枢神経系障害における病理生物学の共通の分母である。ゲノムワイド関連研究 (G W A S) を含むヒト遺伝学は、T R E M 2、D A P 1 2、S y k、P L C γ 2 及び T L R などの T R E M 1 / T R E M 2 経路の下流のいくつかのノードを様々な神経変性疾患におけるリスク遺伝子として関連付けている。

【0007】

米国特許第 9, 0 0 0, 1 2 7 号は、T R E M 1 とそのリガンドとの相互作用を破壊する抗 T R E M 1 抗体を提供する。開示される抗体は、関節リウマチ及び炎症性腸疾患等の炎症性疾患を有する個体の治療のために提供される。

【0008】

国際公開第 2 0 1 7 / 1 5 2 1 0 2 号は、T R E M 1 タンパク質に結合し、1 つ又は複数の T R E M 1 活性を調節又は増強する抗体を開示している。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、本明細書に記載の機能的及び構造的特性を有する抗 T R E M 1 抗体を提供することによって、神経障害の新しい治療の必要性に対処する。

【0010】

特に、本発明は、

配列番号 1 1 を含む C D R - L 1、

配列番号 1 2 を含む C D R - L 2、及び

配列番号 1 3 を含む C D R - L 3

を含む軽鎖可変領域と、

配列番号 1 4 を含む C D R - H 1、

配列番号 1 5 を含む C D R - H 2、及び

配列番号 1 6 を含む C D R - H 3

を含む重鎖可変領域と、

を含む、ヒト T R E M 1 に結合する抗体を提供する。

【0011】

本発明を、以下の図面を参照して以下に説明する。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】抗体12172軽鎖のヒト化を示す図である。その鎖について生成された様々な変異体も示されている。CDR配列には下線が引かれている。

【0013】

【図2】抗体12172の重鎖のヒト化を示す図である。その鎖について生成された様々な変異体も示されている。CDR配列には下線が引かれている。

【0014】

【図3A】PGLYRP1及び12172ウサギFabに結合したヒトTREM1の結晶構造を示す図である。PGLYRP1に結合したヒトTREM1の結晶構造。PGLYRP1に属する任意の原子の4オングストローム以内の原子を有するTREM1残基を黒色で強調している。

10

【図3B】PGLYRP1及び12172ウサギFabに結合したヒトTREM1の結晶構造を示す図である。12172ウサギFabに結合したヒトTREM1の結晶構造。12172に属する任意の原子の4オングストローム以内の原子を有するTREM1残基を黒色で強調している。

【0015】

【図4】12172抗体の異なる変異体の熱安定性を示す図である。共通のプレ製剤保存緩衝液pH7.4中で測定した12172 gL2gH11及び12172 gL6gH6 (hIgG4P及びhIgG1 LALA)のサーモグラム。

20

【0016】

【図5】初代ヒト単球からの12172 gL2gH11 hIgG4PによるTNF- α 、IL-6及びIL-1 β のTREM1媒介放出の阻害を示す図である。

【0017】

【図6】様々な12172個の変異体及び参照抗体による初代ヒト単球からのIL-1Rアンタゴニストの放出の増加を示す図である。

【0018】

【図7】刺激されていない初代ヒト単球からのIL-1RA放出の増加における12172 gL2gH11 hIgG4P及び0318-IgG1.3fの効果を示す図である。

【0019】

【図8】健康対照及びアルツハイマー病(AD)PBMCからのTNF- α 及びIL-6放出に対する12172 gL2gH11 hIgG4Pの有効性を示す図である。

30

【0020】

【図9】健康対照及びALS PBMCからのTNF- α 及びIL-6放出に対する12172 gL2gH11 hIgG4Pの有効性を示す図である。

【0021】

【図10】ALS PBMC及びAD PBMCからの炎症促進性サイトカイン及びケモカイン放出に対する12172 gL2gH11 hIgG4Pの有効性を示す図である。

【0022】

【図11A】12172個の抗体変異体によるヒト単球の処理及び(アイソタイプコントロールと比較した)TREM1リガンド複合体による刺激後の(0.05のFDRを考慮した)示差的発現遺伝子(DEG)を示すボルケーノプロットである。

40

【図11B】12172個の抗体変異体によるヒト単球の処理及び(アイソタイプコントロールと比較した)TREM1リガンド複合体による刺激後の(0.05のFDRを考慮した)示差的発現遺伝子(DEG)を示すボルケーノプロットである。

【図11C】12172個の0318-IgG1.3f(11C)によるヒト単球の処理及び(アイソタイプコントロールと比較した)TREM1リガンド複合体による刺激後の(0.05のFDRを考慮した)示差的発現遺伝子(DEG)を示すボルケーノプロットである。

【0023】

50

【図12A】12172個の抗体変異体によるヒト単球の処理及びアポトーシスヒトiPSC由来運動ニューロンによる刺激（アイソタイプ対照と比較）後のDEG（0.05のFDRを考慮）を示すボルケーノプロットである。

【図12B】12172個の抗体変異体によるヒト単球の処理及びアポトーシスヒトiPSC由来運動ニューロンによる刺激（アイソタイプ対照と比較）後のDEG（0.05のFDRを考慮）を示すボルケーノプロットである。

【図12C】12172個の0318-IgG1.3f（12C）によるヒト単球の処理及びアポトーシスヒトiPSC由来運動ニューロンによる刺激（アイソタイプ対照と比較）後のDEG（0.05のFDRを考慮）を示すボルケーノプロットである。

【0024】

【図13】12172 gL2gH11 hIgG4Pがインビトロでヒト好中球及び単球による大腸菌（E. coli）クリアランスに影響を及ぼさないことを示す図である。データは、12172 gL2gH11 hIgG4P vアイソタイプについての3人の個々のドナー及び比較のための0318-IgG1.3f（Ab318）分子を含む1人のドナーの代表である。統計分析、一元配置ANOVA Dunnett事後検定を実施して、アイソタイプ対照****に対する抗TREM1抗体を比較した（ $p < 0.0001$ ）

【0025】

【図14】hTREM1/hDAP-12 Flp-In293細胞におけるSYK活性化の遮断における12172個の抗体変異体の有効性及び効力を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

略語

表1. 本明細書全体で使用される略語

【表1】

ADCC	抗体依存性細胞傷害
CDC	補体依存性細胞傷害
CDR	相補性決定領域
CH1, CH2, CH3	定常重鎖ドメイン1、2、3
CL	定常軽鎖ドメイン
dsFcFv	ジスルフィド安定化scFv
Fab	フラグメント抗原結合
Fc	結晶化可能なフラグメント
FR1, FR2, FR3, FR4	フレームワーク領域1、2、3、4
Fv	可変ドメインフラグメント
HVR	超可変領域
KD	解離定数
mAb	モノクローナル抗体
scFv	一本鎖可変フラグメント
VH	重鎖可変領域
VHH	単一ドメイン抗体（又はラクダ科動物）
VL	可変軽鎖領域
VNAR	IgNARの可変ドメイン

【0027】

表2. アミノ酸略語

10

20

30

40

50

【表 2】

略語	1 文字略語	アミノ酸名
Ala	A	アラニン
Arg	R	アルギニン
Asn	N	アスパラギン
Asp	D	アスパラギン酸
Cys	C	システイン
Gln	Q	グルタミン
Glu	E	グルタミン酸
Gly	G	グリシン
His	H	ヒスチジン
Ile	I	イソロイシン
Leu	L	ロイシン
Lys	K	リジン
Met	M	メチオニン
Phe	F	フェニルアラニン
Pro	P	プロリン
Pyl	O	ピロリジン
Ser	S	セリン
Sec	U	セレノシステイン
Thr	T	トレオニン
Trp	W	トリプトファン
Tyr	Y	チロシン
Val	V	バリン

10

20

【0028】

定義

以下の用語は、本明細書全体を通して使用される。

【0029】

「受容体ヒトフレームワーク」という用語は、本明細書では、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（VH）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークとして使用される。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する受容体ヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含み得るか、又はアミノ酸配列変化を含み得る。

30

【0030】

「親和性」という用語は、その抗体と標的タンパク質との間の全ての非共有結合相互作用の強度を指す。別途示される場合を除き、本明細書中で使用されるとき、用語「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の1：1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。その結合パートナーに対する分子の親和性は、一般に解離定数（KD）によって表され得る。親和性は、本明細書に記載されるものを含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。

40

【0031】

抗体の文脈における「親和性成熟」という用語は、そのような変化を有さない親抗体と比較して、超可変領域に1つ又は複数の変化を有する抗体を指し、そのような変化は、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす。

【0032】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、及び多重特異性抗体を含むがこれらに限定されない様々な抗体構造を包含する。本明細書で使用される抗体という用語は、全（全長）抗体（すなわち、2つの重鎖及び2つの軽鎖の要素を含む）及びその機能

50

的に活性なフラグメント（すなわち、抗原に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む分子（抗体フラグメント又は抗原結合フラグメントとも呼ばれる））に関する。抗体に関して本明細書に記載される特徴は、文脈が特に指示しない限り、抗体フラグメントにも適用される。「抗体」という用語は、一価、すなわち、ただ1つの抗原結合ドメイン（例えば、完全長重鎖と、「半抗体」とも呼ばれる相互接続された完全長軽鎖とを含む1アーム抗体）を含む抗体、及び多価抗体、すなわち2つ以上の抗原結合ドメインを含む抗体、例えば二価抗体を包含する。

【0033】

「参照抗体と同じエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて参照抗体とその抗原との結合を50%以上遮断する抗体を指し、逆に参照抗体は、競合アッセイにおいて抗体とその抗原との結合を50%以上遮断する。

10

【0034】

「抗体依存性細胞傷害」又は「ADCC」という用語は、抗体でコーティングされた標的細胞と、エフェクター細胞上に発現されるFcγRを介したナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ及び好中球等の溶解活性を有するエフェクター細胞との相互作用に依存する細胞死を誘導する機構である。

【0035】

用語「抗原結合フラグメント」は、本明細書中で用いる場合、機能的に活性な抗体結合フラグメントを指し、限定されないが、Fab、改変Fab、Fab'、改変Fab'、(ab')₂、Fv、単ドメイン抗体、scFv、Fv、二価抗体、三価抗体又は四価抗体、Bis-scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ及び上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられる（例えば、Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2 (3), 209-217を参照されたい）。本明細書で使用される「結合フラグメント」は、ペプチド又は抗原に特異的であるとしてフラグメントを特徴付けるのに十分な親和性で標的ペプチド又は抗原に結合することができるフラグメントを指す。

20

【0036】

「抗体変異体」という用語は、ポリペプチド、例えば、本明細書に記載の所望の特徴を有し、参照抗体のVH及び／又はVLと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するVH及び／又はVLを含む抗体を指す。そのような抗体変異体には、例えば、1つ又は複数のアミノ酸残基がVHドメイン及び／又はVLドメインに付加されるか、又はVHドメイン及び／又はVLドメインから欠失される抗体が含まれる。通常、抗体変異体は、本明細書に記載の抗体と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有する。場合により、変異体抗体は、本明細書中に提供される抗体配列と比較して1個以下の保存的アミノ酸置換を有し、あるいは、本明細書中に提供される抗体配列と比較して約2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個又は10個以下の保存的アミノ酸置換のいずれかを有するであろう。実施形態では、「抗体変異体」は、VH及び／又はVLを含む抗体又はその抗原結合フラグメントを指し、抗体又はその抗原結合フラグメントの非CDR領域は、本明細書に記載の抗体と少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%のアミノ酸配列同一性を有する。

30

40

【0037】

本明細書で使用される「抗原結合ドメイン」という用語は、標的抗原と特異的に相互作用する1つ又は複数の可変ドメインの一部又は全部、例えば一対の可変ドメインVH及びVLの一部又は全部を含む抗体の一部を指す。結合ドメインは、単ドメイン抗体を含み得る。各結合ドメインは、一価であり得る。各結合ドメインは、1つ以下のVH及び1つのVLを含み得る。

【0038】

50

本明細書で使用される「二重特異性」又は「二重特異性抗体」という用語は、2つの抗原特異性を有する抗体を指す。

【0039】

「相補性決定領域」又は「CDR」という用語は、一般に、抗体が6つのCDR：VHに3つ（H1、H2、H3）及びVLに3つ（L1、L2、L3）を含むことを指す。重鎖可変ドメインのCDRは、Kabatナンバリングシステムに従って、残基31～35（CDR-H1）、残基50～65（CDR-H2）及び残基95～102（CDR-H3）に位置する。しかしながら、Chothia（Chothia, C. and Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917（1987））によれば、CDR-H1と等価なループは、残基26から残基32まで延びる。したがって、特に指示しない限り、本明細書で使用される「CDR-H1」は、KabatナンバリングシステムとChothiaのトポロジカルループ定義との組合せによって記載される残基26～35を指すことが意図される。軽鎖可変ドメインのCDRは、Kabatナンバリングシステムに従って、残基24～34（CDR-L1）、残基50～56（CDR-L2）及び残基89～97（CDR-L3）に位置する。別段示されない限り、可変ドメイン中のCDR残基及び他の残基（例えばFR残基）は、本明細書ではKabatに従ってナンバリングされる。

10

【0040】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／又は軽鎖の可変ドメイン（又はその少なくとも一部）が特定の供給源又は種に由来し、重鎖及び／又は軽鎖の残りの部分（すなわち、定常ドメイン）が異なる供給源又は種に由来する抗体を指す。（Morrison; PNAS 81, 6851（1984））。キメラ抗体は、例えば、非ヒト可変ドメイン及びヒト定常ドメインを含むことができる。キメラ抗体は、典型的には、組換えDNA法を用いて産生される。「キメラ抗体」のサブカテゴリは、「ヒト化抗体」である。

20

【0041】

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体には5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2に更に分割され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ及びμと呼ばれる。

30

【0042】

「補体依存性細胞傷害」又は「CDC」という用語は、標的結合抗体のFcエフェクタードメインが補体成分C1qに結合してこれを活性化し、次いで補体成分C1qが補体カスケードを活性化して標的細胞死をもたらす、細胞死を誘導する機構を指す。

【0043】

本明細書で使用される「定常ドメイン（複数可）」又は「定常領域」という用語は、可変領域の外側にある抗体のドメイン（複数可）を指すために交換可能に使用される。定常ドメインは、同じアイソタイプの全ての抗体において同一であるが、アイソタイプごとに異なる。典型的には、重鎖の定常領域は、N末端からC末端に向かって、3つ又は4つの定常ドメインを含むCH1-ヒンジ-CH2-CH3-場合によりCH4によって形成される。

40

【0044】

「競合抗体」又は「交差競合抗体」という用語は、特許請求される抗体が、（i）参照抗体が結合する抗原上の同じ位置、又は（ii）抗体が抗原への参照抗体の結合を立体的に妨げる抗原上の位置のいずれかに結合することを意味すると解釈されるものとする。

【0045】

本明細書で使用される用語「誘導体」は、反応性誘導体、例えば、マレイミド等のチオール選択的反応基を含むことを意図している。反応性基は、ポリマーに直接又はリンカーセグメントを介して連結されていてもよい。そのような基の残基は、場合によっては、抗体フラグメントとポリマーとの間の連結基として生成物の一部を形成することが理解され

50

るであろう。

【0046】

可変配列を生成する文脈における「由来する」という用語は、使用される配列又は使用される配列に非常に類似する配列が、抗体の軽鎖又は重鎖等の元の遺伝物質から得られたという事実を指す。

【0047】

本明細書で使用される「ダイアボディ」という用語は、第1のFvのVHが第2のFvのVLに連結され、第1のFvのVLが第2のFvのVHに連結されるように、2つのFv間リンカーを有する2つのFv対、第1のVH/VL対及び更なるVH/VL対を指す。

10

【0048】

本明細書で使用される「Difab」という用語は、重鎖のC末端を介して連結された2つのFab分子を指す。

【0049】

本明細書で使用される「Difab'」という用語は、そのヒンジ領域内の1つ又は複数のジスルフィド結合を介して連結された2つのFab'分子を指す。

【0050】

本明細書で使用される「dsScFv」又は「ジスルフィド安定化一本鎖可変フラグメント」という用語は、VH及びVL可変ドメイン間のペプチドリンカーによって安定化され、VHとVLとの間のドメイン間ジスルフィド結合も含む一本鎖可変フラグメントを指す（例えば、Weatherill et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25 (321-329), 2012、国際公開第2007109254号を参照されたい）。

20

【0051】

「DVD-Ig」（二重VドメインIgGとしても知られる）という用語は、各重鎖及び各軽鎖のN末端に1つずつ、4つの更なる可変ドメインを有する完全長抗体を指す。

【0052】

「エフェクター機能」という用語は、抗体アイソタイプによって異なる、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンレギュレーション、及びB細胞活性化が含まれる。

30

【0053】

本明細書で使用される場合、「エフェクター分子」という用語は、例えば、抗新生物剤、薬物、毒素、生物学的に活性なタンパク質、例えば酵素、他の抗体又は抗体フラグメント、合成又は天然に存在するポリマー、核酸及びそのフラグメント、例えばDNA、RNA及びそのフラグメント、放射性核種、特に放射性ヨウ化物、放射性同位体、キレート化金属、ナノ粒子及びレポーター基、例えば蛍光化合物又はNMR若しくはESR分光法によって検出され得る化合物を含む。

【0054】

抗体の文脈における「エピトープ」又は「結合部位」という用語は、抗体のパラトープが結合又は認識する抗原上の部位（又は部分）を指す。エピトープは、連続したアミノ酸（「線状エピトープ」と呼ばれることも多い）又はタンパク質の三次折り畳みによって形成された不連続なアミノ酸（「立体構造エピトープ」と呼ばれることも多い）の両方から形成され得る。隣接するアミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒への曝露時に保持されるが、折り畳みによって形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒での処理時に失われる。エピトープは、典型的には、固有の空間的配座で少なくとも3個、より一般的には少なくとも5〜10個のアミノ酸を含む。エピトープは、通常、アミノ酸、糖側鎖等の分子の化学的に活性な表面基からなり、通常、特定の3D構造及び電荷特性を有する。

40

50

【0055】

「EUインデックス」又は「KabatのようなEUインデックス」又は「EUNanバリングスキーム」は、EU抗体のナンバリングを指す（Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85）。これは、一般に、抗体重鎖定常領域の残基を指す場合に使用される（例えば、Kabat et al. に報告されているように）。特に明記しない限り、EUNanバリングスキームは、本明細書に記載の抗体重鎖定常領域中の残基を指すために使用される。

【0056】

本明細書で使用される「Fab」という用語は、軽鎖のVL（可変軽鎖）ドメイン及び定常ドメイン（CL）を含む軽鎖フラグメント、並びに重鎖のVH（可変重鎖）ドメイン及び第1の定常ドメイン（CH1）を含む抗体フラグメントを指す。本開示によるFabの二量体はF(ab')₂を生成し、ここで、例えば、二量体化はヒンジを介してもよい。

10

【0057】

本明細書で使用される「Fab'-Fv」という用語は、FabFvに類似しており、Fab部分がFab'に置き換えられている。フォーマットは、そのPEG化バージョンとして提供され得る。

【0058】

本明細書で使用される「Fab'-scFv」という用語は、軽鎖又は重鎖のC末端にscFvが付加されたFab'分子である。

20

【0059】

本明細書で使用される「Fab-dsFv」という用語は、Fv内ジスルフィド結合が付加C末端可変領域を安定化するFabFvを指す。フォーマットは、そのPEG化バージョンとして提供され得る。

【0060】

本明細書で使用される「Fab-Fv」という用語は、以下の重鎖のCH1及び軽鎖のCLのそれぞれのC末端に可変領域が付加されたFabフラグメントを指す。フォーマットは、そのPEG化バージョンとして提供され得る。

【0061】

本明細書で使用される「Fab-scFv」という用語は、軽鎖又は重鎖のC末端にscFvが付加されたFab分子である。

30

【0062】

用語「Fc」、「Fcフラグメント」、及び「Fc領域」は、第1の定常領域免疫グロブリンドメインを除く抗体の定常領域を含む抗体のC末端領域を指すために互換的に使用される。したがって、Fcは、IgA、IgD及びIgGの最後の2つの定常ドメイン、CH2及びCH3、又はIgE及びIgMの最後の3つの定常ドメイン、並びにこれらのドメインに対する可動性ヒンジN末端を指す。ヒトIgG1重鎖Fc領域は、本明細書において、残基C226からそのカルボキシル末端までを含むと定義され、ナンバリングはEUインデックスに従う。ヒトIgG1の文脈において、EUインデックスに従って、下側ヒンジは、位置226～236を指し、CH2ドメインは、位置237～340を指し、CH3ドメインは、位置341～447を指す。他の免疫グロブリンの対応するFc領域は、配列アラインメントによって同定することができる。

40

【0063】

「フレームワーク」又は「FR」という用語は、超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般に、VH（又はVL）において以下の配列で現れる：FR1-H1（L1）-FR2-H2（L2）-FR3-H3（L3）-FR4。

【0064】

本明細書で使用される「完全長抗体」という用語は、天然の抗体構造と実質的に同様の

50

構造を有する抗体、又は本明細書で定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略す）及び軽鎖定常領域（CL）からなる。各重鎖は、Igクラスに応じて、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略す）と、3つの定常ドメインCH1、CH2及びCH3、又は4つの定常ドメインCH1、CH2、CH3及びCH4で構成される重鎖定常領域（CH）と、から構成される。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）及び古典的補体系の第1成分（C1q）を含む、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【0065】

用語「Fv」は、完全長抗体の2つの可変ドメイン、例えば、同族対又は親和性成熟可変ドメイン、すなわちVH及びVL対等の協同可変ドメインを指す。

【0066】

アミノ酸配列の文脈で使用される「非常に類似している」という用語は、その完全長にわたって、96、97、98又は99%の類似等、95%以上類似しているアミノ酸配列を指すことを意図している。

【0067】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生されるか、又はヒト抗体レパートリ若しくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。ヒト抗体のこの定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【0068】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」という用語は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークを指す。一般に、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループに由来する。一般に、配列のサブグループは、Kabateal, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3のようなサブグループである。いくつかの実施形態では、VLについて、サブグループは、上記のKabateal, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3のようなサブグループである。いくつかの実施形態では、VHについて、サブグループは、上記のKabateal, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3のようなサブグループである。いくつかの実施形態では、VHについて、サブグループは、Kabateal, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3のようなサブグループである。

【0069】

「ヒト化」抗体という用語は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基及びヒトFRからのアミノ酸残基を含む抗体を指す。典型的には、重鎖及び／又は軽鎖は、ドナー抗体（例えば、マウス又はウサギモノクローナル抗体等の非ヒト抗体）由来の1つ又は複数のCDR（所望であれば、1つ又は複数の修飾CDRを含む）を含み、受容体抗体（ヒト抗体）の重鎖及び／又は軽鎖可変領域フレームワークにグラフトされる（例えば、Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998を参照のこと）。そのようなヒト化抗体の利点は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低下させることである。全CDRが移されるのではなく、本明細書中上記で記載されるCDRのいずれか1つに由来する特異性決定残基のうちただ1つ又は複数がヒト抗体フレームワークに移入され得る（例えば、Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34を参照のこと）。

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

【0070】

本明細書で使用される「超可変領域」又は「HVR」という用語は、配列が超可変であり（「相補性決定領域」又は「CDR」）、及び／又は構造的に明確なループ（「超可変

10

20

30

40

50

ループ」)を形成し、及び／又は抗原接触残基(「抗原接触」)を含む、抗体可変ドメインの各領域を指す。

【0071】

本明細書で使用される「IC50」という用語は、特定の生物学的又は生化学的機能を阻害する際の抗体等の物質の有効性の尺度である最大半量阻害濃度を指す。IC50は、所与の生物学的プロセスを50%阻害するために特定の物質がどれだけ必要であることを示す定量的尺度である。

【0072】

配列中のアミノ酸間の「同一性」は、整列した配列中の任意の特定の位置で、アミノ酸残基が配列間で同一であることを示す。

【0073】

本明細書で使用される「IgG-scfv」という用語は、各重鎖又は各軽鎖のC末端にscfvを有する完全長抗体である。

【0074】

本明細書で使用される「IgG-V」という用語は、各重鎖又は各軽鎖のC末端に可変ドメインを有する完全長抗体である。

【0075】

「IgG1 LALA」又は「hIgG1 LALA」という用語は、IgG1の定常領域におけるアミノ酸置換L234A/L235Aが導入された野生型ヒトIgG1アイソフォームの変異体を指す。

【0076】

「IgG4P」又は「hIgG4P」という用語は、例えばAngal et al., Molecular Immunology, 1993, 30(1), 105-108に記載されているように、(EUNアンバリングによる)アミノ酸228がプロリンで置き換えられた野生型ヒトIgG4アイソフォームの変異体を指す。

【0077】

「単離された」という用語は、本明細書を通して、場合によっては、抗体又はポリヌクレオチドが、自然界で生じ得るものとは異なる物理的環境に存在することを意味する。「単離された」核酸という用語は、その自然環境から単離されたか、又は合成的に作製された核酸分子を指す。単離された核酸は、例えば化学処理によって生成された合成DNA、cDNA、ゲノムDNA又はそれらの任意の組合せを含み得る。

【0078】

「Kabatt残基指定」又は「Kabatt」という用語は、抗体に一般的に使用される残基ナンバリングスキームを指す。これは、アミノ酸残基の線形ナンバリングと常に直接対応するとは限らない。実際の線状アミノ酸配列は、基本可変ドメイン構造のフレームワーク又は相補性決定領域(CDR)にかかわらず、構造成分の短縮又は構成成分への挿入に対応する厳密なKabattナンバリングよりも少ないか、又は追加のアミノ酸を含み得る。残基の正しいKabattナンバリングは、抗体の配列における相同性の残基と「標準的な」Kabattナンバリング配列とのアラインメントによって、所与の抗体について決定され得る。詳細については、Kabatt et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)を参照されたい。別段の指示がない限り、Kabattのナンバリングは本明細書全体にわたって使用される。

【0079】

本明細書で使用される「KD」という用語は、Kd対Ka(すなわち、Kd/Ka)の比から得られ、モル濃度(M)として表される解離定数を指す。Kd及びKaは、それぞれ特定の抗原-抗体相互作用の解離速度及び会合速度を指す。抗体のKD値は、当技術分野で十分に確立された方法を使用して決定することができる。

【0080】

10

20

30

40

50

「モノクローナル抗体」（又は「mAb」）という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、モノクローナル抗体調製物の各個体は、少量存在し得る可能性のある変異（例えば、天然に存在する変異）を除いて同一である。それにもかかわらず、翻訳後修飾（例えば、重鎖C末端リジンの切断、アスパラギン残基の脱アミド化及び／又はアスパルタート残基の異性化）に連結されたタンパク質配列の一定の違いは、組成物中に存在する様々な異なる抗体分子間に存在し得る。ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。

【0081】

本明細書で使用される「マルチパラトピック抗体」という用語は、同じ抗原又は2つの異なる抗原のいずれかからの異なるエピトープと相互作用する2つ以上の異なるパラトープを含む本明細書に記載の抗体を指す。本明細書中に記載されるマルチパラトピック抗体は、ビパラトピック、トリパラトピック、テトラパラトピックであり得る。

【0082】

本明細書で使用される「多重特異性」又は「多重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの結合ドメイン、すなわち2つ以上の結合ドメイン、例えば2つ又は3つの結合ドメインを有する本明細書に記載の抗体を指し、少なくとも2つの結合ドメインは、同じ抗原上の2つの異なる抗原又は2つの異なるエピトープに独立して結合する。多重特異性抗体は、一般に、各特異性（抗原）に対して一価である。本明細書に記載される多重特異性抗体は、一価及び多価、例えば二価、三価、四価の多重特異性抗体を包含する。例えば、抗体は、2つのscFv又はdsScFvに連結されたFabを含み得、各scFv又はdsScFvは、同じ又は異なる標的（例えば、治療標的に結合する1つのscFv又はdsScFv、及び例えばアルブミンに結合することによって半減期を延長する1つのscFv又はdsScFv）に結合する。そのような抗体は、国際公開第2015/197772号に記載されている。

【0083】

抗体の文脈における「中和すること」（又は「中和する」）という用語は、その標的（標的タンパク質）の生物学的シグナル伝達活性を阻害又は減衰することができる抗体を表す。

【0084】

「パラトープ」という用語は、抗原を認識し、結合する抗体の領域を指す。

【0085】

ポリペプチド及び抗体配列に関する「配列同一性（又は類似性）パーセント（%）」という用語は、最大パーセント配列同一性を達成するために配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに、比較されるポリペプチド中のアミノ酸残基と同一（又は類似）である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。

【0086】

「薬学的に許容され得る担体」は、対象に対して非毒性である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容され得る担体としては、緩衝液、賦形剤、安定剤又は防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0087】

「ポリクローナル抗体」という用語は、抗原の2つ以上のエピトープに結合する（又は他の方法で相互作用する）異なる抗体分子の混合物を指す。

【0088】

抗体の文脈における「妨げる」という用語は、本明細書では「阻害する」という用語と互換的に使用され、本発明による抗体が特定の生物学的プロセス又は分子相互作用に関して有する効果を示す。

【0089】

「scDiabody」という用語は、分子が3つのリンカーを含み、VH及びVL末

10

20

30

40

50

端がそれぞれ更なる F v 対の可変領域の 1 つに連結されている正常な s c F v を形成するように、F v 内リンカーを含むダイアボディを指す。

【0090】

本明細書で使用される「S c d i a b o d y - C H 3」という用語は、例えばヒンジを介して C H 3 ドメインにそれぞれ連結された 2 つの s c ダイアボディ分子を指す。

【0091】

「S c D i a b o d y - F c」という用語は、本明細書で用いる場合、2 つの s c ダイアボディであり、それぞれが、例えばヒンジを介して、定常領域フラグメント - C H 2 C H 3 の C H 2 ドメインの N 末端に付加されている。

【0092】

本明細書で使用される「一本鎖可変フラグメント」又は「s c F v」という用語は、V H 可変ドメインと V L 可変ドメインとの間のペプチドリンカーによって安定化された一本鎖可変フラグメントを指す。

【0093】

本明細書で使用される「S c F v - F c - s c F v」という用語は、4 つの s c F v を指し、それぞれの 1 つが C H 2 C H 3 フラグメントの両方の重鎖の N 末端及び C 末端に付加されている。

【0094】

本明細書で使用される「s c F v - I g G」という用語は、各重鎖又は各軽鎖の N 末端に s c F v を有する完全長抗体である。

【0095】

本明細書で使用される用語「類似性」は、整列した配列の任意の特定の位置で、アミノ酸残基が配列間で類似のタイプであることを示す。例えば、イソロイシン又はバリンの代わりにロイシンを用いてもよい。互いに置換され得る他のアミノ酸としては、限定されないが、以下が挙げられる。

- ーフェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）；
- ーリジン、アルギニン及びヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；
- ーアスパルタート及びグルタマート（酸性側鎖を有するアミノ酸）；
- ーアスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）；並びに
- ーシステイン及びメチオニン（硫黄含有側鎖を有するアミノ酸）。

【0096】

本明細書で使用される「単一ドメイン抗体」という用語は、単一の単量体可変ドメインからなる抗体フラグメントを指す。単一ドメイン抗体の例としては、V H 又は V L 又は V H H 又は V - N A R が挙げられる。

【0097】

抗体の文脈において本明細書で用いられる用語「特異的」とは、それが特異的である抗原のみを認識する抗体、又はそれが非特異的である抗原への結合と比較して、それが特異的である抗原に対して有意に高い結合親和性、例えば少なくとも 5、6、7、8、9、10 倍高い結合親和性を有する抗体を指すことを意図する。

【0098】

本明細書で使用される「立体的に遮断する」又は「立体的に妨げる」という用語は、第 1 のタンパク質への第 3 のタンパク質の結合によって第 1 のタンパク質と第 2 のタンパク質との間の相互作用を遮断する手段を指すことを意図している。第 1 のタンパク質と第 3 のタンパク質との間の結合は、第 2 のタンパク質と第 3 のタンパク質との間の好ましくないファンデルワールス相互作用又は静電相互作用に起因して、第 2 のタンパク質が第 1 のタンパク質に結合するのを妨げる。

【0099】

治療及び診断の文脈における「対象」又は「個体」という用語は、一般に哺乳動物を指す。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、例えばサル）、ウサギ、及びげっ歯類（例えば、マウス及び

10

20

30

40

50

ラット)が含まれるが、これらに限定されない。より具体的には、個体又は対象は、ヒトである。

【0100】

本明細書で使用される「タンデム s c F v」という用語は、単一の F v 間リンカーが存在するように単一のリンカーを介して連結された少なくとも2つの s c F v を指す。

【0101】

本明細書で使用される「タンデム s c F v - F c」という用語は、少なくとも2つのタンデム s c F v を指し、それぞれが、例えばヒンジを介して、定常領域フラグメント - C H 2 C H 3 の C H 2 ドメインの N 末端に付加される。

【0102】

本明細書で使用される「標的」又は「抗体標的」という用語は、抗体が結合する標的抗原を指す。

【0103】

本明細書で使用される「テトラボディ」という用語は、4つの F v 及び4つの F v 間リンカーを含むダイアボディと同様のフォーマットを指す。

【0104】

「治療有効量」という用語は、疾患を治療するために対象に投与された場合に、疾患のそのような治療をもたらすのに十分なその抗体の量を指す。治療有効量は、抗体、疾患及びその重症度並びに治療される対象の年齢、体重等に応じて変化する。

【0105】

本明細書で使用される「トリボディ」(F a b (s c F v)₂とも呼ばれる)という用語は、軽鎖の C 末端に第1の s c F v が付加され、重鎖の C 末端に第2の s c F v が付加された F a b フラグメントを指す。

【0106】

本明細書で使用される「三重特異性又は三重特異性抗体」という用語は、3つの抗原結合特異性を有する抗体を指す。例えば、抗体は、3つの異なる抗原又は同じ抗原上の3つの異なるエピトープに独立して結合する3つの抗原結合ドメイン(三価)を有する抗体であり、すなわち、各結合ドメインは各抗原に対して一価である。三重特異性抗体フォーマットの例の1つは T r Y b e である。

【0107】

「予防する」又は「予防」等の用語は、疾患又はその症状を完全に又は部分的に予防するという点で予防効果を得ることを指す。したがって、予防することは、疾患に罹りやすい可能性があるが、疾患を有するとまだ診断されていない対象において疾患が生じるのを止めることを包含する。

【0108】

「治療」、「治療すること」等の用語は、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を得ることを指す。効果は、疾患の部分的又は完全な治癒及び／又は疾患に起因する有害作用に関して治療的であり得る。したがって、治療は、(a) 疾患を阻害すること、すなわち、その発生を停止させること；(b) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退縮を引き起こすことを包含する。

【0109】

本明細書で使用される「T r Y b e」という用語は、本明細書で使用される2つの d s s c F v s . d s F a b を含むトリボディを指し、可変領域内ジスルフィド結合を有する F a b を指す。

【0110】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗原への抗体の結合に関与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。完全長抗体の重鎖(VH)及び軽鎖(VL)の可変ドメインは、一般に類似の構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域(FR)及び3つのCDRを含む。(例えば K i n d t e t a l . K u b y I m m u n o l o g y , 6 t h e d . , W . H . F r e e m a n a n d C o . , p a g e 9

10

20

30

40

50

1 (2007)を参照のこと)単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。各VH及びVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置された3つのCDR及び4つのFRで構成される。CDR及びFRは、共に可変領域を形成する。慣例により、抗体の重鎖可変領域中のCDRは、CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3と呼ばれ、軽鎖可変領域中のCDRはCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3と呼ばれる。それらは、各鎖のN末端からC末端の方向に連続してナンバリングされる。CDRは、従来、Kabataによって考案されたシステムに従ってナンバリングされる。

【0111】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。特定のベクターは、それらが作動可能に連結されている核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。「ベクター」という用語は、「発現ベクター」を含む。

【0112】

「VH」という用語は、重鎖の可変ドメイン(又は配列)を指す。

【0113】

本明細書で使用される「V-IgG」という用語は、各重鎖又は各軽鎖のN末端に可変ドメインを有する完全長抗体である。

【0114】

「VL」という用語は、軽鎖の可変ドメイン(又は配列)を指す。

【0115】

TREM1

用語「TREM1」は、「骨髄細胞上に発現されるトリガー受容体1」(TREM-1及びCD354としても知られている)を指し、単球、マクロファージ、好中球及び他の種類の細胞上に発現される受容体を指す。TREM1の一次リガンドには、ペプチドグリカン(PGN)結合タンパク質(PGRP)のファミリーに属するペプチドグリカン認識タンパク質1(PGLYRP1)が含まれる。「TREM1」という用語は、細胞によって天然に発現されるTREM1の任意の変異体又はアイソフォームを含む。

【0116】

ヒトTREM1の3つのアイソフォームが同定されている。アイソフォーム1(受託番号NP61113.1;配列番号1)は234個のアミノ酸からなり、カノニカル配列を表す。アイソフォーム2(受託番号NP1229518.1;配列番号2)は、225個のアミノ酸からなり、アミノ酸残基201~234におけるカノニカル配列とは異なる。アミノ酸残基は、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインの一部をコードする。アイソフォーム3(受託番号NP001229519;配列番号3)は、150個のアミノ酸からなり、可溶性である。これは、膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン、及び細胞外ドメインの一部をコードするアミノ酸残基151~234を欠く。アミノ酸残基138~150はまた、上記のカノニカル配列とは異なる。

【0117】

抗TREM1抗体を同定する方法

TREM1上のPGLYRP1リガンドとは異なるアミノ酸残基と相互作用し、TREM1活性の1つ又は複数を中和する抗体を同定するために、TREM1への結合及び試験抗体の機能的特性の測定、並びに結合の構造的側面(標的エピトープ残基)のハイスループット測定を含む特別なスクリーニング及び試験戦略を開発しなければならなかった。PGLYRP1との相互作用に参与するTREM1残基を確立することにより、この方法は、迅速な試験を実施し、PGLYRP1とは異なるTREM1上の部位に結合するであろうさらなる開発のための抗体を選択することを可能にする。そのような抗体は、TREM

10

20

30

40

50

1の異なる部位と相互作用する他の潜在的なリガンドの結合を防止するさらなる利点を提供することができる。

【0118】

したがって、PGLYRP1とは異なるTREM1上のアミノ酸残基と相互作用し、ヒトTREM1の活性を中和する抗体を同定する方法が提供され、当該方法は、

- a) ヒトTREM1を一過性に発現する細胞を動物に免疫することと、
- b) 当該動物からB細胞を回収することと、
- c) 当該B細胞によって産生される抗体を、

i. 少なくとも1nMの親和性でヒトTREM1に結合する；及び

ii. THP1単球TREM1/DAP12 NF-κBルシフェラーゼレポーター細胞アッセイにおいて、PGLYRP1媒介シグナル伝達を遮断する；及び

iii. PGLYRP1とは異なるヒトTREM1上の部位に結合する、

それらの能力に基づいて、選択することと、
を含む。

【0119】

PGLYRP1とは異なる部位に結合する抗体を同定するために、TREM1タンパク質上の結合部位（試験抗体との相互作用に関与するTREM1の残基）の迅速な試験を可能にする変異体TREM1タンパク質のアレイを使用する方法が開発された。同じ方法を使用して、PGLYRP1リガンドの結合部位を決定する。試験抗体（又はPGLYRP1）の結合部位を形成するTREM1上のアミノ酸残基を同定するこのような方法は、

a) TREM1の3D構造情報を取得することと、

b) 取得された3D構造データを使用して、アクセス可能な表面領域内にあるアミノ酸残基を同定することと、

c) 同定されたアミノ酸の各々について、同定されたアミノ酸から所定の距離内にあり、アクセス可能な表面積内にある1個又は2個のアミノ酸を選択し、それにより、アミノ酸残基のこのような組合せが、2個又は3個のアミノ酸のパッチ（パッチ）を形成することと、

d) 生成された多数の可能性のあるパッチから、TREM1タンパク質をミスフォールドさせる可能性のあるパッチの数を最小限に抑えながら、TREM1のアクセス可能な表面積の大部分をカバーする代表的なパッチのセットを選択することと、

e) 変異タンパク質のセットを作製することであって、変異タンパク質の各々が標的タンパク質の変異配列を含み、変異配列の各々が工程（c）で同定されたアミノ酸の単一変異パッチを含み、パッチのアミノ酸の各々が別のアミノ酸によって置換されている、ことと、

f) 各変異タンパク質の結合特性を測定することと、

g) そのようなパッチを含む対応する変異体TREM1タンパク質に対する抗体の結合特性の低下を示すパッチを同定することであって、そのようなパッチ中の残基が抗体の結合部位の一部であると同定される、ことと、

【0120】

好ましい実施形態では、抗体は、ヒトTREM1（ここで、番号付けは配列番号1に従う）の残基E26、E27、K28、Y29、E30、L31、K32及びQ35と相互作用する場合に選択される。

【0121】

TREM1の変異型を生成するためのアミノ酸残基を同定するために、TREM1について3D構造データを得る必要がある。そのようなデータは、PDB構造（PDBコード：1SMO、チェーンA）の形態で入手可能である。あるいは、そのような構造データは、当業者に公知の技術を使用して得ることができる。そのような技術には、X線分析又はNMRデータが含まれる。好ましくは、そのような3Dデータは、標的残基の同定を可能にするのに十分な空間分解能のものである。

【0122】

10

20

30

40

50

特に、各パッチの残基間の所定の距離は、4、5、6、又は7 Åである。好ましくは、そのような距離は6 Åである。好ましくは、アラニン及びグリシンは置換のために選択されない。3D構造におけるCys残基の関連性に依拠して、上記は置換されていてもよく、又は置換のために選択されなくてもよい。Cysは、多くの場合、タンパク質におけるS-S結合の形成に関与し、三次構造にとって重要である。Glyは非常に柔軟なアミノ酸であり、Alaなどのより大きなアミノ酸で置換することも構造的効果を有し得る。場合により、Pro残基は、二次構造形成に関与することが多いので、分析から除外することもできる。

【0123】

より具体的には、アクセス可能な表面積内のアミノ酸は、側鎖の計算された溶媒アクセス可能な表面積に基づいて選択される。溶媒アクセス可能性を計算するための標準的な方法を適用することができる。典型的な例では、1.4 Åのプロープが計算に使用される（そのようなプロープがH₂O分子と同様のサイズを有するH₂O分子の簡略版）。そのような計算では、プロープに接触するアミノ酸残基の原子は、表面アクセス可能原子として分類される。各アミノ酸の表面接近可能性をA²で計算する。続いて、実際の表面露出面積（Å²）と理論上の可能性のある表面露出（Å²）との比を計算する。所望の精度及びタンパク質のサイズに応じて、異なるカットオフを選択することができる。そのようなカットオフは0.5、0.2から選択することができ、好ましくはそのようなカットオフは0.05〜0.1であり、より好ましくはそのようなカットオフは0.07である。そのような濾過工程は、潜在的にミスフォールディングタンパク質を排除するのに有用である。

【0124】

最終アレイ中のミスフォールドしたTREM1タンパク質の量を減少させるさらなる工程を実施することができる。例えば、各変異パッチの元の残基のいずれか（2又は3残基）とタンパク質の残りの部分との間の2つ以上の水素結合の破壊を引き起こす残基は、好ましくは回避される。同様に、塩橋の破損も好ましくは回避されるべきである。更に、タンパク質の大きな疎水性領域を露出させる変異残基も回避される。別の実施形態では、タンパク質内の3つ以上の水素結合の破壊を引き起こす残基も回避される。同様に、塩橋の破損も好ましくは回避されるべきである。

【0125】

したがって、方法の好ましい実施形態では、方法は、1）水素結合の破壊（好ましくは最大2個の破壊された結合が許容される）をもたらすパッチ、及び2）塩架橋（好ましくは最大1個の破壊された結合が許容される）、並びに3）大きな疎水性パッチの露出（好ましくは最大15 Å²の露出した疎水性表面が許容される）を除外又はフィルタリングする。パッチを画定するための距離閾値を6 Åと6.5 Åとの間に設定することができ、最小側鎖表面露出を7%に設定することができる。

【0126】

任意選択的に、相互作用持続性のその後の分析と共に、任意の広く使用されているシミュレーションパッケージ（例えば、AMBER、GROMACS、DESMONDなど）を用いて分子動力学シミュレーションを実行することによって、さらなる粒度を達成することができる。シミュレーション軌跡の大部分に存在する水素結合及び塩架橋は「必須」と考えることができ、Ala突然変異によって破壊されるべきではないが、シミュレーションの小部分でのみ観察される結合はタンパク質の安定性にほとんど影響を与えない可能性が高い。

【0127】

更に、残基の全てのパッチが識別された後、冗長性を生成するパッチを排除することによって、そのような冗長性は排除される。この工程は、アクセス可能な表面領域の被覆率にいくらかの冗長性を有することが有益であり得るので任意選択であるが、このような冗長性を有することは、その後に突然変異クローンを生成することに技術的困難性をもたらす可能性がある。したがって、そのような冗長性は、対応する変異タンパク質を設計する

際のタンパク質サイズ、複雑さ及び技術的制限の文脈で考慮されるべきである。

【0128】

理想的には、上記の工程は、タンパク質表面全体に対して実行されて、最大表面アクセス可能領域が識別されたパッチによって覆われることを確実にする。そのようなパッチによって覆われていない表面アクセス可能領域のいくつかの部分の有することを回避することが好ましいであろう。その目的は、生成されるミスフォールドタンパク質の数を最小限に抑えながら、溶媒に接触可能な表面を覆うことである。

【0129】

例えば、2つの置換のパッチを使用しても表面アクセス可能領域全体をカバーしない場合、3つの置換からなる追加のパッチを設計することができる。3つを超える置換のより大きなパッチも使用することができるが、3つを超える置換は、変異体 T R E M 1 タンパク質のミスフォールディングをもたらし得る。したがって、好ましくは、2つ又は3つの A l a 置換を含むパッチが使用される。必要に応じて、追加の単一 A l a 置換を選択することもできる。しかしながら、これは、2つ又は3つの置換と比較して所望の感度を提供しない可能性がある。

【0130】

この戦略に従う2つ又は3つの A l a パッチを有する変異体 T R E M 1 タンパク質のアレイを例に提供する。

【0131】

変異 T R E M 1 タンパク質の生成された配列は、その後、実験試験のために生成される。そのようなものを作製する典型的な方法は、配列を適切な発現ベクターにクローニングすることによるものである。対照として、目的の標的タンパク質の野生型配列もクローニングする。

【0132】

突然変異体 T R E M 1 タンパク質のアレイは、当業者に公知の技術を使用して製造することができる。標的細胞においてタンパク質を発現させるための任意の適切な発現系を使用することができる。好ましくは、クローン化変異体ペプチドの発現のために哺乳動物細胞系が使用される。哺乳動物細胞は、変異体ポリペプチドがそのような細胞から分泌されることを可能にし、そのようなペプチドの試験をより容易にする。各変異ペプチドの十分な発現が可能である限り、任意の哺乳動物細胞又は細胞株を使用することができる。そのような哺乳動物系では、適切な発現ベクターを使用することができる。多くの哺乳動物発現ベクターが市販されている。典型的には、そのようなベクターは、サイトメガロウイルス (C M V) プロモーターなどの構成的プロモーターを含むであろう。

【0133】

変異体 T R E M 1 タンパク質のそれぞれは、F c 領域、好ましくはヒト F c ドメインに融合することができた。そのような融合タンパク質における F c ドメインの使用は、検出におけるより高い口バスト性及び表面上のそのような融合タンパク質の捕捉の容易さなどの実用的な利点を提供する。必要に応じて、1つ又は複数のリンカー配列を、F c ドメインと標的突然変異体タンパク質との間の融合タンパク質配列、例えば三重 A l a リンカーに導入することができる。

【0134】

好ましくは、ヒト F c ドメインを含むそのような融合タンパク質は、哺乳動物 E x p i 2 9 3 細胞、又は十分な濃度のタンパク質を生成することができる任意の他の細胞において発現される。

【0135】

場合により、T R E M 1 に対するポリクローナル抗体（複数のエピトープを標的とする）又は E L I S A アッセイに適した公知のエピトープの任意の市販のモノクローナル抗体（そのような抗体は構造エピトープを認識する）を使用してアレイを事前スクリーニングすることによって、ミスフォールドしている可能性がある T R E M 1 タンパク質をアレイから除去することができる。

10

20

30

40

50

【0136】

最後に、アレイ上の各変異標的タンパク質に対する抗体の結合特性を測定する。そのような測定は、利用可能な任意の適切な方法を使用して行うことができる。好ましくは、そのような測定は、ハイスループット法を使用して行われる。

【0137】

目的の分子の親和性、並びにそのような分子が標的タンパク質への結合を阻害する程度は、従来の技術、例えば *Scatchard et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660-672 (1949)) によって記載されているものを使用して、又は *BIAcore* などのシステムを使用する表面プラズモン共鳴 (SPR) によって当業者によって決定することができる。表面プラズモン共鳴のために、変異タンパク質を固相に固定化し、フローセルに沿って移動相中のリガンド及び／又は目的の分子に曝露する。固定化された標的にリガンドが結合すると、局所屈折率が変化して SPR 角が変化し、反射光の強度の変化を検出することによってリアルタイムで監視することができる。SPR シグナルの変化速度を分析して、結合反応の会合相及び解離相の見かけの速度定数を得ることができる。これらの値の比は、見かけの平衡定数 (親和性) を与える (例えば、*Wolff et al.*, *Cancer Res.* 53: 2560-65 (1993) を参照)。

【0138】

SPR と同様の技術を使用する代替プラットフォームは、*Carterra LSA Platform* などの *Carterra* (*carterra-bio.com*) によって提供される。これは、フロー印刷マイクロ流体と高スループット表面プラズモン共鳴 (SPR) 検出技術とを組み合わせた高スループット抗体特性評価プラットフォームである。

【0139】

他の種類のプラットフォームには、細胞表面発現アレイを利用する技術が含まれる。そのようなプラットフォームの例は、細胞表面受容体へのタンパク質結合を追跡するのに特に適しており、オンレート及びオフレート並びに親和性を測定することを可能にする *Ligand Tracer* (*ligandtracer.com*) である。

【0140】

測定を簡単にするために、アレイの各変異タンパク質を分子又はタンパク質に融合させて、結合特性の検出を容易にするために表面に捕捉することができる。

【0141】

好ましくは、各変異タンパク質への結合は、無標識技術であるバイオレイヤー干渉法 (BLI) を用いて決定される。それは、バイオセンサチップ上の固定化タンパク質の層及び内部参照層の 2 つの表面から反射された白色光の干渉パターンを分析する光学分析技術である。バイオセンサチップに結合した分子の数が増加すると、リアルタイムで測定できる干渉パターンのシフトが生じる (REF)。

【0142】

典型的には、30 個、60 個のクローン化変異タンパク質のアレイが使用される。しかしながら、そのようなアレイのサイズは、標的タンパク質のサイズ及び溶媒アクセス可能領域の所望の被覆率に依存する。好ましくは、変異タンパク質は、96 ウェルプレート又は 384 ウェルプレート上に提供される。一般に、BLI 機器は、測定のために 96 ウェルプレート又は 384 ウェルプレートを扱うことができる。

【0143】

BLI 技術を使用する場合、典型的には、各センサは、結合部位が決定されている対象分子 (抗体又はリガンドなど) を含む溶液に曝露される。BLI 技術の利点は、通常の *BIAcore* とほぼ同じくらい高感度であり、高スループット (96 個のクローンを同時に試験することができる) であり、使い捨てのセンサチップを使用するため、通常 *BIAcore* で行うように表面を再生し、チップを再使用する必要がないことである。

【0144】

変異体 TREM1 タンパク質に対する試験抗体の結合の異なる測定値を使用して、どの

変異体タンパク質が結合の減少を示すかを決定することができる。典型的には、解離定数又は結合定数が測定される。典型的には、結合の完全な喪失又は目的の分子が変異タンパク質からどれだけ速く離れているかを測定することができる。抗体の結合特性を測定する場合、適切な対照が一般に使用される。一般に、結合特性は、標的タンパク質の親配列（野生型、WT）と比較される。典型的には、変異タンパク質の大部分は、WTと同じ K_d を示す。結合の差を示す変異タンパク質を考慮すべきである。典型的には、野生型TREM1と比較して少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍又は10倍以上の任意の解離定数差が考慮される。好ましくは、少なくとも3倍の任意の差が有意であると考えられる。低ノイズからシグナルへの分解で結果をもたらす変異体TREM1タンパク質は無視又は再測定される。

10

【0145】

所望であれば、異なるサイズのパッチ、例えば2つ又は3つの置換のパッチを含む変異タンパク質をアレイ上で使用することができる。測定可能な効果を得るのに十分な感度を提供する限り、より高い精度が必要な場合、単一置換を含む変異タンパク質も結合特性について更に試験することができる。

【0146】

TREM1に結合する抗体

本発明は、ヒトTREM1（標的ポリペプチド）に結合し、本明細書に更に記載される機能的及び構造的特性を有する抗TREM1抗体を提供する。

【0147】

本発明の文脈における抗体には、全抗体及び機能的に活性な抗体フラグメント（すなわち、抗原に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む分子（抗原結合フラグメントとも呼ばれる））が含まれる。本明細書中に記載される特徴は、文脈が別途指示しない限り、抗体フラグメントにも適用される。抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、多価、多重特異性、二重特異性、完全ヒト、ヒト化、又はキメラであり得る（又はそれらに由来し得る）。

20

【0148】

更に記載される抗体は、特定の抗体タイプであり、本発明の範囲を限定しない。

【0149】

本発明に従って使用される抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり得、好ましくはモノクローナル抗体である。本発明に従って使用される抗体は、キメラ抗体、CDR移植抗体（例えば、マウス、霊長類及びヒトフレームワーク領域を含むCDRが由来するドナー抗体のクラス／タイプを考慮して、任意の適切な受容体可変領域フレームワーク配列を使用することができる）、ナノボディ、ヒト又はヒト化抗体であり得る。モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の両方の產生のために、そのような抗体を產生するために使用される動物は、典型的には、ヤギ、ウサギ、ラット又はマウス等の非ヒト哺乳動物であるが、抗体はまた、他の種で產生されてもよい。

30

【0150】

ポリクローナル抗体は、目的の抗原による適切な動物の免疫化等の日常的な方法によって產生され得る。その後、血液をそのような動物から取り出し、產生された抗体を精製することができる。

40

【0151】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない様々な技術によって作製され得る。モノクローナル抗体を作製するためのいくつかの例示的な方法が本明細書に記載される。

【0152】

例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術（Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., 1983, Immunology

50

Today, 4:72)、及びEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985)を使用して調製することができる。

【0153】

抗体はまた、例えば国際公開第9202551号、国際公開第2004051268号及び国際公開第2004106377号に記載されている方法によって、特異的抗体の産生のために選択された単一リンパ球から生成された免疫グロブリン可変領域cDNAをクローニング及び発現することによって、単一リンパ球抗体法を使用して生成され得る。

【0154】

標的ポリペプチドに対して生成された抗体は、動物の免疫化が必要な場合、周知の慣習的なプロトコルを使用して動物、好ましくは非ヒト動物にポリペプチドを投与することによって得ることができる(例えば、Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986)を参照)。ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ、ラクダ又はブタ等の多くの動物を免疫化することができる。しかしながら、マウス、ウサギ、ブタ及びラットが一般に使用される。

【0155】

モノクローナル抗体は、当技術分野で公知の様々なファージディスプレイ法を使用して生成することもでき、Brinkman et al. (in J. Immunol. Methods, 1995, 182:41-50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177-186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic et al. (Gene, 1997 187 9-18), Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280)によって開示されているものが挙げられる。特定のファージディスプレイ法では、Winter et al., Ann. Rev. Immunol, 12:433-455 (1994). に記載されるように、VH及びVL遺伝子のレパートリは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別々にクローニングされるか、又はファージライブラリにおいて無作為に組換えられ、抗原結合ファージに対してスクリーニングされ得る。ファージは、典型的には、抗体フラグメントを一本鎖Fv(scFv)フラグメント又はFabフラグメントのいずれかとして提示する。免疫化された供給源からのライブラリは、ハイブリドーマを構築する必要なしに免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., EMBO J 12:725-734 (1993)に記載されているように、免疫化することなく、ナイーブレパートリをクローニングして(例えば、ヒト由来)、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対する単一の抗体源を提供することができる。最後に、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol, 227:381-388 (1992)によって記載されているように、幹細胞から再編成されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して高可変CDR3領域をコードし、インビトロで再編成を達成することによって、ナイーブラライブラリを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリを記載する特許刊行物には、例えば、米国特許第5,750,373号、及び米国特許第2005/0079574号、米国特許第2005/0119455号、米国特許第2005/0266000号、米国特許第2007/0117126号、米国特許第2007/0160598号、米国特許第2007/0237764号、米国特許第2007/0292936号、及び米国特許第2009/0002360号が含まれる。

【0156】

抗体のスクリーニングは、標的ポリペプチドへの結合を測定するアッセイ及び／又は抗

10

20

30

40

50

体が特定の相互作用を遮断する能力を測定するアッセイを使用して行うことができる。結合アッセイの例は、例えば、プレート上に固定化された標的ポリペプチドの融合タンパク質を使用し、標的に結合した抗体を検出するためにコンジュゲート化二次抗体を使用する E L I S A である。ブロックアッセイの例は、標的ポリペプチドに結合するリガンドタンパク質の遮断を測定するフローサイトメトリに基づくアッセイである。蛍光標識二次抗体を使用して、標的ポリペプチドに結合するそのようなリガンドタンパク質の量を検出する。

【0157】

抗体は、所望の1つ又は複数の活性を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、ファージディスプレイライブラリを作製し、所望の結合特性を有する抗体についてそのようなライブラリをスクリーニングするための様々な方法が当技術分野で公知である。

10

【0158】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体又は抗体フラグメントは、ヒト抗体又はヒト抗体フラグメントと見なされる。

【0159】

抗体は、完全長抗体であり得る。より具体的には、抗体は、I g G アイソタイプであり得る。より具体的には、抗体は、I g G 1 又は I g G 4 であり得る。

【0160】

抗体の定常領域ドメインは、存在する場合、抗体分子の提案された機能、特に必要とされ得るエフェクター機能を考慮して選択され得る。例えば、定常領域ドメインは、ヒト I g A、I g D、I g E、I g G 又は I g M のドメインであり得る。特に、抗体分子が治療用途を意図し、抗体エフェクター機能が必要とされる場合、ヒト I g G 定常領域ドメイン、特に I g G 1 及び I g G 3 アイソタイプを使用することができる。あるいは、抗体分子が治療目的を意図しており、抗体エフェクター機能が必要とされない場合、I g G 2 及び I g G 4 アイソタイプを使用してもよい。これらの定常領域ドメインの配列変異体も使用され得ることが理解されるであろう。抗体が種々の翻訳後修飾を受け得ることも当業者に公知であろう。これらの修飾の種類及び程度は、多くの場合、抗体を発現するために使用される宿主細胞株並びに細胞培養条件に依存する。そのような修飾には、グリコシル化、メチオニン酸化、ジケトピペラジン形成、アスパラギン酸異性化及びアスパラギン脱アミド化のバリエーションが含まれ得る。頻繁な修飾は、カルボキシペプチダーゼの作用によるカルボキシ末端塩基性残基（リジン又はアルギニン等）の喪失である（H a r r i s , R J . J o u r n a l o f C h r o m a t o g r a p h y 705:129-134, 1995に記載されている）。したがって、抗体重鎖のC末端リジンは、存在しなくてもよい。

20

30

【0161】

あるいは、抗体は、抗原結合フラグメントである。

【0162】

特定の抗原結合フラグメントの総説については、H u d s o n e t a l . N a t . M e d . 9 : 129-134 (2003) を参照されたい。s c F v フラグメントの総説については、例えば、P l u c k t h u n , i n T h e P h a r m a c o l o g y o f M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s , v o l . 113, R o s e n b u r g a n d M o o r e e d s . , (S p r i n g e r - V e r l a g , N e w Y o r k) , p p . 269-315 (1994) を参照されたい。また国際公開第93/16185号、米国特許第5,571,894号及び米国特許第5,587,458号を参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、増加したインビボ半減期を有する F a b 及び F (a b ')₂ フラグメントが米国特許第5,869,046号に開示されている。

40

【0163】

抗原結合フラグメント及びそれらを作製する方法は、当技術分野で周知であり、例えば

50

、Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181; Adair and Lawson, 2005. Therapeutic antibodies. Drug Design Reviews-Online 2 (3): 209-217. を参照されたい。Fab-Fvフォーマットは国際公開第2009/040562号に最初に開示され、そのジスルフィド安定化バージョンであるFab-dsFvは国際公開第2010/035012号に最初に開示され、TrYbeフォーマットは国際公開第2015/197772号に開示されている。

【0164】

抗体フラグメントを産生するための様々な技術が開発されてきた。そのようなフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解消化を介して誘導され得る（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985) を参照されたい）。しかしながら、抗体フラグメントはまた、組換え宿主細胞によって直接産生され得る。例えば、抗体フラグメントは、上記の抗体ファージライブラリから単離され得る。あるいは、Fab'-SHフラグメントを大腸菌（E. coli）から直接回収し、化学的に結合させてF(ab')₂フラグメントを形成することができる（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。

【0165】

F(ab')₂フラグメントは、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体は、一本鎖Fvフラグメント（scFv）であり得る。これは国際公開第93/16185号；米国特許第5,571,894号；米国特許第5,587,458号に記載される。抗体フラグメントはまた、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されているように、「線状抗体」であってもよい。そのような線状抗体フラグメントは、単一特異性又は二重特異性であり得る。

【0166】

抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dsFv、scFv、又はdsscFvであり得る。抗体は、単一ドメイン抗体又はナノボディ、例えばVH又はVL又はVHH又はVNARであり得る。抗体は、国際公開第2011/117648号、国際公開第2005/003169号、国際公開第2005/003170号及び国際公開第2005/003171号に記載されているFab又はFab'フラグメントであり得る。

【0167】

抗体は、ジスルフィド安定化一本鎖可変フラグメント（dsscFv）であり得る。

【0168】

可変ドメインVHとVLとの間のジスルフィド結合は、以下に列挙される残基のうちの2つの間であり得る。

・V_H37+V_L95、例えば、Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997)；

・V_H44+V_L100、例えば、Weatherill et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25 (321-329), 2012を参照；

・V_H44+V_L105、例えば、J Biochem. 118, 825-831 Luo et al (1995)；

・V_H45+V_L87、例えば、Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997)；

・V_H55+V_L101、例えばFEBS Letters 377 135-139 Young et al (1995) 参照；

・V_H100+V_L50、例えば、Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber et al (1990)を参照；

・V_H100b+V_L49、例えば、Biochemistry 29 1362-1367 Glockshuber et al (1990) を参照；
・V_H98+V_L46、例えば、Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997) を参照；
・V_H101+V_L46、例えば、Protein Science 6, 781-788 Zhu et al (1997) を参照；
・V_H105+V_L43、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90 pp. 7538-7542 Brinkmann et al (1993)；又は Proteins 19, 35-47 Jung et al (1994) を参照；
・V_H106+V_L57、例えば FEBS Letters 377 135-139 Young et al (1995) 参照

10

及び分子内に位置する可変領域対におけるそれに対応する1つ又は複数の位置。

【0169】

ジスルフィド結合は、位置V_H44と位置V_L100との間に形成され得る。

【0170】

本明細書に記載の抗原結合フラグメントは、モノクローナル、キメラ、ヒト化、完全ヒト、多重特異性、二重特異性等としても特徴付けられ得、これらの用語の議論もそのようなフラグメントに関することが当業者によって理解されるであろう。

【0171】

多重特異性抗体

20

本発明の抗体は多重特異性抗体であり得る。

【0172】

本開示との関連で使用することも企図される多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントの例としては、二価、三価又は四価抗体、Bis-scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、バイボディ及びトリボディ（例えば、Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech 23 (9): 1126-1136; Schoonjans et al. 2001, Biomolecular Engineering, 17 (6), 193-202を参照されたい）が挙げられる。

【0173】

様々な多重特異性抗体フォーマットが生成されている。様々な分類が提案されているが、多重特異性IgG抗体フォーマットは、一般に、例えばSpiess et al., Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 67 (2015): 95-106. に記載されているように、二重特異性IgG、付加IgG、多重特異性（例えば二重特異性）抗体フラグメント、多重特異性（例えば二重特異性）融合タンパク質、及び多重特異性（例えば二重特異性）抗体コンジュゲートを含む。Mol Immunol. 67 (2015): 95-106.

30

【0174】

抗体は二重特異性抗体であり得る。一態様において、抗体は2つの抗原結合ドメインを含み、一方の結合ドメインはTREM1に結合し、他方の結合ドメインは別の抗原に結合し、すなわち各結合ドメインは各抗原に対して一価である。一実施形態において、抗体は四価二重特異性抗体であり、すなわち抗体は4つの抗原結合ドメインを含み、例えば2つの結合ドメインはTREM1に結合し、他の2つの結合ドメインは別の抗原に結合する。一実施形態では、抗体は、三価二重特異性抗体である。

40

【0175】

二重特異性抗体を作製するための技術としては、CrossMab technology (Klein et al. Engineering therapeutic bispecific antibodies using CrossMab technology, Methods 154 (2019) 21-31), Knobs-in-

50

holes engineering (例えば、国際公開第1996027011号、国際公開第1998050431号), DuoBody technology (例えば、国際公開第2011131746号), Azymeric technology (例えば、国際公開第2012058768号)が挙げられるが、これらに限定されない。二重特異性抗体を作製するための更なる技術が、例えば、Godar et al., 2018, Therapeutic bispecific antibody formats: a patent applications review (1994-2017), Expert Opinion on Therapeutic Patents, 28:3, 251-276に記載されている。二重特異性抗体には、特にCrossMa抗体、DAF (ツー・イン・ワン)、DAF (フォー・イン・ワン)、DutaMa b、DT-lgG、ノブス・イン・ホール共通LC、ノブス・イン・ホール (Knobs-in-holes) アセンブリ、電荷対、Fabアーム交換、SEEDbody、Triomab、LUZ-Y、Fcab、κλ-body及び直交Fabが含まれる。

10

【0176】

抗体構築物は三重特異性抗体であり得る。

【0177】

抗体は、マルチパラトピック抗体であり得る。

【0178】

一実施形態では、各結合ドメインは、一価である。好ましくは、各結合ドメインは、1つ以下のVH及び1つのVLを含む。

20

【0179】

付加IgGは、古典的には、IgGの重鎖及び／又は軽鎖のN末端及び／又はC末端に追加の抗原結合ドメイン又は抗原結合フラグメントを付加することによって操作された全長IgGを含む。そのような追加の抗原結合フラグメントの例としては、sdAb抗体 (例えばVH又はVL)、Fv、scFv、dsscFv、Fab、scFabが挙げられ、付加IgG抗体フォーマットとしては、特にDVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)lgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、lgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgC(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、lgG-2scFv、scFv4-Ig、Zybody及びDVI-IgG (フォー・イン・ワン)が挙げられ、例えば、Spiess et al., Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 67 (2015): 95-106.に記載されている。

30

【0180】

多重特異性抗体フラグメントには、例えば、Spiess et al., Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol. 67 (2015): 95-106.に記載されるように、ナノボディ、ナノボディーHSA、BiTE、ダイアボディ、DART、TandAb、scDiabody、sc-Diabody-CH3、Diabody-CH3、Triple Body、Miniantibody、ミニボディ、Tri Biミニボディ、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂、F(ab')₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価HC Ab、scDiabody-Fc、Diabody-Fc、Tandem scFv-Fc; 及びイントラボディが含まれる。Mol Immunol. 67 (2015): 95-106.

40

【0181】

多重特異性融合タンパク質としては、Dock及びLock、ImmTAC、HSAbody、scDiabody-HSA、及びTandem scFv-Toxinが挙げ

50

られる。

【0182】

多重特異性抗体コンジュゲートとしては、 $IgG-IgG; Cov-X$ -ボディ；及び $scFv1-PEG-scFv2$ が挙げられる。

【0183】

更なる多重特異性抗体フォーマットは、例えば Brinkmann et al, The making of bispecific antibodies, mAbs, 9: 2, 182-212 (2017)、特に図2、例えばタンデム $scFv$ 、三重体、 $Fab-VHH$ 、 $taFv-Fc$ 、 $scFv4-Ig$ 、 $scFv2-Fcab$ 、 $scFv4-IgG$ に記載されている。バイオボディ、トリボディ及びこれらを製造する方法は、例えば、国際公開第99/37791号に開示されている。

10

【0184】

本発明で使用するための抗体は、2つの $scFv$ 又は $ds scFv$ に連結された Fab であり得、各 $scFv$ 又は $ds scFv$ は同じ又は異なる標的に結合する（例えば、治療標的に結合する1つの $scFv$ 又は $ds scFv$ 及び1つの $scFv$ 又は $ds scFv$ は、例えばアルブミンに結合することによって半減期を延長する）。そのような抗体フラグメントは、国際公開第2015/197772号に記載されている。本発明フラグメントに使用するための別の好ましい抗体は、例えば国際公開第2013/068571号及び Dave et al., mAbs, 8(7)1319-1335 (2016) に記載されているように、ただ1つの $scFv$ 又は $ds scFv$ に連結された Fab を含む。

20

【0185】

本発明で使用するための別の抗体は、ノブス・イン・ホール抗体（「 KiH 」）である。これは、ヘテロ二量体化のための重鎖ホモ二量体（例えば、二重特異性抗体、多重特異性抗体又は一腕抗体の効率的な産生のために）からなる多重特異性抗体フォーマットである。一般に、そのような技術は、第1のポリペプチド（第1の抗体重鎖中の第1の $CH3$ ドメイン等）の界面に突起（「ノブ」）を導入し、第2のポリペプチド（第2の抗体重鎖中の第2の $CH3$ ドメイン等）の界面に対応する空洞（「ホール」）を導入することを含み、それにより、突起は、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨げるように空洞内に配置され得る。突起は、第1のポリペプチドの界面からの小さなアミノ酸側鎖（第1の抗体重鎖中の第1の $CH3$ ドメイン等）をより大きな側鎖（例えば、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン又はトリプトファン）で置き換えることによって構築される。突起と同一又は類似のサイズの代償的な空洞が、大きいアミノ酸側鎖をより小さいアミノ酸側鎖（例えば、アラニン、セリン、バリン、又はトレオニン）で置き換えることによって、第2のポリペプチドの境界面（第2の抗体重鎖中の第2の $CH3$ ドメイン等）に作り出される。隆起及び空洞は、例えば部位特異的突然変異誘発又はペプチド合成によって、ポリペプチドをコードする核酸を改変することによって作製することができる。「ノブス・イン・ホール」技術に関する更なる詳細は、例えば、米国特許第5,731,168号；米国特許第7,695,936号；国際公開第2009/089004号；米国特許出願公開第2009/0182127号明細書；Marvin md Zu, Acta Pharmacologica Sincia (2005) 26(6): 649-658；Kontermann Acta Pharmacologica Sincia (2005) 26: 1-9；Ridgway et al, Prot Eng 9, 617-621 (1996)；and Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)。に記載される。

30

40

【0186】

ヒト化抗体、ヒト抗体及びキメラ抗体並びにそのような抗体を産生する方法

本発明の抗体は、ヒト化抗体、完全ヒト抗体又はキメラ抗体であり得るが、これらに限定されない。

【0187】

一実施形態では、抗体はヒト化されている。より詳細には、抗体は、キメラ、ヒト、又

50

はヒト化抗体である。

【0188】

特定の実施形態では、本明細書中に提供される抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体の例は、例えば米国特許第4,816,567;及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載される。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト霊長類、例えばサルに由来する可変領域）及びヒト定常領域を含む。更なる例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが、親抗体のクラス又はサブクラスから変更された「クラス切替」抗体である。キメラ抗体には、その抗原結合フラグメントが含まれる。

10

【0189】

一実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。

【0190】

ヒト化抗体は、任意に、CDRが由来する非ヒト種に由来する1つ又は複数のフレームワーク残基を更に含み得る。CDR全体ではなくCDRの特異性決定残基を移入するだけでよいことが理解されよう（例えば、Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34を参照）。

【0191】

適切には、本発明によるヒト化抗体は、ヒト受容体フレームワーク領域並びに1つ又は複数のCDRを含み、任意に1つ又は複数のドナーフレームワーク残基を更に含む可変ドメインを有する。

20

【0192】

したがって、一実施形態では、可変ドメインがヒト受容体フレームワーク領域及び非ヒトドナーCDRを含む、ヒト化抗体が提供される。

【0193】

CDR又は特異性決定残基がグラフトされる場合、マウス、霊長類及びヒトフレームワーク領域を含む、CDRが由来するドナー抗体のクラス／タイプを考慮して、任意の適切な受容体可変領域フレームワーク配列が使用され得る。

【0194】

本発明において使用され得るヒトフレームワークの例は、KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY及びPOM (Kabata et al.)である。例えば、KOL及びNEWMを重鎖に使用することができ、REIを軽鎖に使用することができ、EU、LAY及びPOMを重鎖及び軽鎖の両方に使用することができる。あるいは、ヒト生殖系列配列を使用してもよく、これらは、www.imgt.orgで入手可能である。実施形態では、受容体フレームワークがIGKV1-9ヒト生殖細胞系及び／又はIGHV3-66ヒト生殖細胞系である。実施形態では、ヒトフレームワークは、1~5、1~4、1~3又は1~2個のドナー抗体アミノ酸残基を含む。

30

【0195】

本発明のヒト化抗体において、受容体重鎖及び軽鎖は、必ずしも同じ抗体に由来する必要はなく、所望であれば、異なる鎖に由来するフレームワーク領域を有する複合鎖を含み得る。

40

【0196】

特定の実施形態では、本明細書中に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を使用して産生され得る。

【0197】

ヒト抗体は、抗体の可変領域又は完全長鎖がヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られる場合、特定の生殖系列配列の「生成物」又はそれに「由来する」重鎖若しくは軽鎖可変領域又は完全長重鎖若しくは軽鎖を含む。そのようなシステムには、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを目的の抗原で免疫すること、又はファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリを目的の抗原でス

50

クリーニングすることが含まれる。ヒト生殖系列免疫グロブリン配列の「生成物」又はそれに「由来する」ヒト抗体又はそのフラグメントは、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、ヒト抗体の配列に配列が最も近い（すなわち、最大%の同一性）ヒト生殖系列免疫グロブリン配列を選択することによって、そのように同定することができる。特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列の「生成物」又はそれに「由来する」ヒト抗体は、例えば、天然に存在する体細胞変異又は部位特異的変異の意図的な導入に起因して、生殖系列配列と比較してアミノ酸の相違を含み得る。しかしながら、選択されたヒト抗体は、典型的には、他の種の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、マウス生殖系列配列）と比較した場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列が少なくとも90%同一であり、ヒト抗体をヒトであると同定するアミノ酸残基を含有する。特定の場において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列において少なくとも60%、70%、80%、90%、又は少なくとも95%、又は更には少なくとも96%、97%、98%、又は99%同一であり得る。典型的には、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と10個以下のアミノ酸差を示すであろう。特定の場において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列から5個以下、又は更には4個、3個、2個又は1個以下のアミノ酸差を示し得る。

10

【0198】

抗体の構造的特徴

20

本発明の抗体は結合ドメインを含む。結合ドメインは、一般に、3つが重鎖由来であり、3つが軽鎖由来である、6つのCDRを含む。一実施形態では、CDRはフレームワーク内にあり、共に可変領域を形成する。したがって、抗体は、抗原に特異的な結合ドメインを有し、当該結合ドメインは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む。

【0199】

一実施形態では、抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖はCH1ドメインを含み、軽鎖はカッパ又はラムダのいずれかのCLドメインを含む。

【0200】

本発明の例によって実証されるように、重鎖及び軽鎖の可変領域の異なる変異体を作製し、それらの結合親和性について試験した。これらの変異体は、CDR配列の同じセットを含み、同様の範囲の結合親和性を示す。選択された抗体変異体の異なる構造要素の概要を表3に示す。

30

【0201】

表3. 抗TREM1抗体のアミノ酸配列

40

50

【表 3】

略語	12172 gL2gH11 配列番号	12172 gL6gH6 配列番号
CDR-L1	11	11
CDR-L2	12	12
CDR-L3	13	13
CDR-H1	14	14
CDR-H2	15	15
CDR-H3	16	16
軽鎖V領域	29	33
重鎖V領域	79	57
軽鎖	31	35
重鎖IgG1	85	63
重鎖IgG1 LALA	87	65
重鎖IgG4P	81	59
重鎖IgG4P FALA	83	61

10

20

【0202】

一実施形態では、本発明は、ヒトTREM1に結合する抗体であって、
 配列番号11を含むCDR-L1、
 配列番号12を含むCDR-L2、及び
 配列番号13を含むCDR-L3
 のうちの少なくとも1つを含む軽鎖可変ドメインを含む、抗体を提供する。

【0203】

一実施形態では、本発明は、ヒトTREM1に結合する抗体であって、
 配列番号11を含むCDR-L1、
 配列番号12を含むCDR-L2、及び
 配列番号13を含むCDR-L3
 を含む軽鎖可変ドメインを含む、抗体を提供する。

30

【0204】

一実施形態では、本発明は、ヒトTREM1に結合する抗体であって、
 配列番号14を含むCDR-H1、
 配列番号15を含むCDR-H2、及び
 配列番号16を含むCDR-H3
 のうちの少なくとも1つを含む重鎖可変ドメインを含む、抗体を提供する。

40

【0205】

一実施形態では、本発明は、ヒトTREM1に結合する抗体であって、
 配列番号14を含むCDR-H1、
 配列番号15を含むCDR-H2、及び
 配列番号16を含むCDR-H3
 を含む重鎖可変ドメインを含む、抗体を提供する。

【0206】

本発明の抗体分子は、それぞれ相補的軽鎖又は相補的重鎖を含み得る。

【0207】

したがって、一実施形態において、本発明は、ヒトTREM1に結合する抗体であって

50

、
配列番号 11 を含む C D R - L 1 、
配列番号 12 を含む C D R - L 2 、 及び
配列番号 13 を含む C D R - L 3
を含む軽鎖可変領域と、
配列番号 14 を含む C D R - H 1 、
配列番号 15 を含む C D R - H 2 、 及び
配列番号 16 を含む C D R - H 3
を含む重鎖可変領域と、
を含む抗体を提供する。

10

【0208】

一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号 29 又は配列番号 33 に示される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0209】

一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号 57 又は配列番号 79 に示される配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0210】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 33 に示される配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 57 に示される配列を含む重鎖可変領域とを含む。

【0211】

20

代替的な実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 29 に示される配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 79 に示される配列を含む重鎖可変領域とを含む。

【0212】

一実施形態では、本発明の抗体は、
配列番号 11 を含む C D R - L 1 、
配列番号 12 を含む C D R - L 2 、 及び
配列番号 13 を含む C D R - L 3
を含む軽鎖可変領域と、
配列番号 14 を含む C D R - H 1 、
配列番号 15 を含む C D R - H 2 、 及び
配列番号 16 を含む C D R - H 3
を含む重鎖可変領域と、
を含む、全長抗体である。

30

【0213】

一実施形態では、本発明の抗体は、
配列番号 11 を含む C D R - L 1 、
配列番号 12 を含む C D R - L 2 、 及び
配列番号 13 を含む C D R - L 3
を含む軽鎖可変領域と、
配列番号 14 を含む C D R - H 1 、
配列番号 15 を含む C D R - H 2 、 及び
配列番号 16 を含む C D R - H 3
を含む重鎖可変領域と、
を含む、I g G 1 L A L A である。

40

【0214】

別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 35 に示される配列を含む軽鎖と、配列番号 65 に示される配列を含む重鎖とを含む I g G 1 L A L A である。

【0215】

別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 31 に示される配列を含む軽鎖と、配列番号 87 に示される配列を含む重鎖とを含む I g G 1 L A L A である。

50

【0216】

別の実施形態では、IgG4Pが好ましい。本明細書に記載される12172抗体のいくつかの変異体を、それらの物理化学的特性を決定するために複数のアッセイで試験したところ、それらは全て、他の変異体よりもあまり好ましい特性を有さないIgG4P変異体と非常に類似した発達プロファイルを示した。しかしながら、IgG4P変異体は、他の変異体では観察されない驚くべき生物学的特性を示し、したがって、そのような特性が有益である用途にとって好ましい変異体である。例えば、そのような特性が治療効果を提供する状態の治療においてである。

【0217】

IgG4Pは、ヒンジ安定性を改善するためにヒンジ領域にSer-228-Pro変異を含み、ナンバリングはEUNナンバリングに従う(Kabatナンバリングに従うSer-241-Pro)(Angal Set al, (1993), Mol Immunol, 30(1), 105-108)。

【0218】

したがって、一実施形態では、本発明の抗体は、

配列番号11を含むCDR-L1、

配列番号12を含むCDR-L2、及び

配列番号13を含むCDR-L3

を含む軽鎖可変領域と、

配列番号14を含むCDR-H1、

配列番号15を含むCDR-H2、及び

配列番号16を含むCDR-H3

を含む重鎖可変領域と、

を含む、IgG4Pである。

【0219】

なお別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号35に示される配列を含む軽鎖と、配列番号59に示される配列を含む重鎖とを含むIgG4Pである。

【0220】

より具体的な実施形態において、本発明の抗体は、配列番号31に示される配列を含む軽鎖と、配列番号81に示される配列を含む重鎖とを含むIgG4Pである。

【0221】

抗TREM1抗体の機能的特性

一実施形態では、本発明の抗体は中和抗体である。好ましくは、本発明による抗体は、1つ又はそれを超えるTREM1活性を中和するものである。

【0222】

本発明の抗体は、ヒトTREM1、より具体的にはヒトTREM1の細胞外ドメイン内の特定の領域に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、TREM1リガンド(例えば、PGLYRP1)が結合するTREM1上の異なる部位又は最小重複部位に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体はアンタゴニスト抗体であり、すなわち、それらは細胞上のTREM1の活性を阻害又は抑制する。そのような細胞は、単球、マクロファージ、及び／又は好中球であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、単一のリガンドに対してオルソステリックではなくアロステリックにTREM1に特異的に結合し、したがって、PGLYRP1とは異なるTREM1上の部位に結合する他のリガンドの結合のより効果的な阻害を提供し得る。

【0223】

例によって実証されるように、PGLYRP1はTREM1上のエピトープに結合し、当該エピトープは、4 Å未満の接触距離で測定されるヒトTREM1(配列番号1)のE27、D42-E46、A49、Y90-L95及びF126からなるリストから選択される残基を含む。

【0224】

特定の一実施形態では、本発明は、結合が T R E M 1 と P G L Y R P 1 との間の相互作用を依然として妨げるように、P G L Y R P 1 の結合部位とは異なる T R E M 1 上の領域に結合する抗体を提供する。

【0225】

いくつかの実施形態では、抗 T R E M 1 抗体は、カニクイザル T R E M 1 に対して非常に弱い結合を示す。いくつかの実施形態では、抗 T R E M 1 抗体は、マウス、ラット、ブタ又はイヌ T R E M 1 に対する検出可能な結合を示さない。

【0226】

いくつかの実施形態では、抗 T R E M 1 抗体は、活性化ヒト単球からの複数のサイトカイン及びケモカイン、例えば C C L - 3、C C L - 20、C X C L - 9、G M - C S F、I F N - γ 、I L - 1 α 、I L - 1 β 、I L - 6、I L - 10、I L - 12 p 40、I L - 15、I L - 18、I L - 27、T N F - α 及び T N F - β の放出を減少させる。

【0227】

いくつかの実施形態では、抗 T R E M 1 抗体は、I g G 4 P であり、初代ヒト単球からの I L - 1 経路の抗炎症性負調節因子である I L - 1 R アンタゴニスト (I L - 1 R A) の放出を有意に増加させる。

【0228】

本発明による抗体は、ヒト T R E M 1 に特異的である。

【0229】

いくつかの実施形態では、抗体は、十分な親和性及び特異性でヒト T R E M 1 に結合する。特定の実施形態では、抗体は、約 1 μ M、100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.5 nM のいずれか 1 つの K D でヒト T R E M 1 に結合し、これらの値の間の任意の範囲を含む。一実施形態では、本発明による抗体は、600 pM 未満の K D でヒト T R E M 1 に結合する。より具体的な実施形態では、本発明による抗体は、300 ~ 1200 pM、より好ましくは 300 ~ 600 pM の K D でヒト T R E M 1 に結合する。

【0230】

抗体の親和性、並びに抗体が結合を阻害する程度は、従来の技術、例えば S c a t c h a r d e t a l . (A n n . K Y . A c a d . S c i . 51 : 660 - 672 (1949)) に記載されている技術を使用して、又は B I A c o r e 等のシステムを使用する表面プラズモン共鳴 (S P R) によって当業者が決定することができる。表面プラズモン共鳴の場合、標的分子を固相に固定化し、フローセルに沿って移動する移動相中のリガンドに曝露する。固定化された標的にリガンドが結合すると、局所屈折率が変化して S P R 角が変化し、反射光の強度の変化を検出することによってリアルタイムで監視することができる。S P R シグナルの変化速度を分析して、結合反応の会合相及び解離相の見かけの速度定数を得ることができる。これらの値の比は、見かけの平衡定数 (親和性) を与える (例えば、W o l f f e t a l , C a n c e r R e s . 53 : 2560 - 65 (1993)) を参照)。

【0231】

好ましくは、本発明による抗体はヒト T R E M 1 に特異的である。

【0232】

抗体に関する、特に結合親和性及び結合特異性、並びに活性に関する本明細書の開示は、抗原結合フラグメント及び抗体様分子にも適用可能である。

【0233】

同じエピトープに結合する抗体

抗体は、T R E M 1 への結合について、軽鎖、重鎖、軽鎖可変領域 (L C V R)、重鎖可変領域 (H C V R) 又は C D R 配列に関して上で定義したエピトープと競合するか、又は同じエピトープに結合し得る。

【0234】

特に、本発明は、配列番号 11 / 12 / 13 / 14 / 15 / 16 の C D R - L 1 / C D

10

20

30

40

50

R-L2 / CDR-L3 / CDR-H1 / CDR-H2 / CDR-H3 配列の組合せを含む抗体と TREM1 への結合について競合するか、又は同じエピトープに結合する抗体を提供する。抗体は、配列番号 29 / 79 の LCVR 及び HCVR 配列対を含む抗体と TREM1 への結合について競合するか、又は同じエピトープに結合し得る。抗体は、配列番号 11 / 12 / 13 / 14 / 15 / 16 の CDR-L1 / CDR-L2 / CDR-L3 / CDR-H1 / CDR-H2 / CDR-H3 配列の組合せを含む IgG4P と TREM1 への結合について競合するか、又は同じエピトープに結合し得る。

【0235】

いくつかの実施形態では、抗 TREM1 抗体は、ヒト TREM1 上のエピトープに結合し、当該エピトープは、残基 E26、E27、K28、Y29、E30、L31、K32 及び Q35（ここで、番号付けは配列番号 1 に従う）を含む。そのようなエピトープは、変異体 TREM1 タンパク質のアレイを設計すること、及び Ala などのより小さなアミノ酸に変異している 2 又は 3 個の当該残基を含む変異体 TREM1 タンパク質への当該抗体の結合を測定することを含む、本明細書に開示される方法を使用して決定することができる。

10

【0236】

一実施形態では、本発明は、ヒト TREM1 のエピトープに結合する IgG4P 抗体であって、エピトープが、ヒト TREM1（配列番号 1）の残基 E26、E27、K28、Y29、E30、L31、K32 及び Q35 を含む、IgG4P 抗体を提供する。

【0237】

一実施形態では、本発明は、TREM1 上のエピトープに結合する抗 TREM1 抗体であって、当該エピトープが、4 Å 未満の接触距離で測定されるヒト TREM1（配列番号 1）の E26、E27、K28、Y29、E30、L31、K32、Q35、T36、D38、K40、D42、R97、D127、T134 及び G136 からなるリストから選択される残基の少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、又は全てを含む、抗 TREM1 抗体を提供する。

20

【0238】

一実施形態では、本発明は、ヒト TREM1 のエピトープに結合する IgG4P 抗体であって、当該エピトープが、4 Å 未満の接触距離で測定されるヒト TREM1（配列番号 1）の E26、E27、K28、Y29、E30、L31、K32、Q35、T36、D38、K40、D42、R97、D127、T134 及び G136 からなるリストから選択される残基の少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、又は全てを含む IgG4P 抗体を提供する。

30

【0239】

いくつかの実施形態では、本発明は、PGLYRP1 とは異なるエピトープに結合する抗 TREM1 抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、TREM1 上のエピトープに結合する抗 TREM1 抗体を提供し、当該エピトープは、4 Å 未満の接触距離で測定されるヒト TREM1（配列番号 1）の E27、D42-E46、A49、Y90-L95 及び F126 からなるリストから選択される 1 又は 2 残基以下を含む。

40

【0240】

エピトープは、本発明によって提供される抗体のいずれか 1 つと組み合わせて、当技術分野で公知の任意の適切な結合部位マッピング方法によって同定することができる。変異体残基のどれが特定の抗体の結合に重要であるかを確立するために変異体 TREM1 タンパク質のアレイに依存する特定の方法及び、本開示によって提供される。そのような方法を使用して、本発明によって提供される抗体と本質的に同じアミノ酸残基に結合する抗体を同定することが可能である。エピトープマッピング方法の他の例としては、全長標的タンパク質に由来する様々な長さのペプチドを本発明の抗体又はそのフラグメントに結合するためにスクリーニングし、抗体によって認識されるエピトープの配列を含む抗体に特異的

50

に結合することができるフラグメントを同定することが挙げられる。標的ペプチドは、合成的に産生され得る。抗体に結合するペプチドは、例えば、質量分析によって同定することができる。別の例では、NMR分光法又はX線結晶学を使用して、本発明の抗体が結合したエピトープを同定することができる。典型的には、エピトープ決定をX線結晶学によって行う場合、CDRから4 Å以内の抗原のアミノ酸残基は、エピトープのアミノ酸残基部分であると考えられる。一旦同定されると、エピトープは、本発明の抗体に結合するフラグメントを調製するのに役立ち得、必要に応じて、同じエピトープに結合する更なる抗体を得るための免疫原として使用され得る。

【0241】

一実施形態では、抗体のエピトープは、X線結晶学によって決定される。

10

【0242】

抗体が参照抗体と同じエピトープに結合するか、又は参照抗体と結合について競合するかどうかは、当技術分野で公知の日常的な方法を使用することによって容易に決定することができる。例えば、試験抗体が本発明の参照抗体と同じエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照抗体を飽和条件下でタンパク質又はペプチドに結合させる。次に、タンパク質又はペプチドに結合する試験抗体の能力を評価する。試験抗体が参照抗体との飽和結合後にタンパク質又はペプチドに結合することができる場合、試験抗体は参照抗体とは異なるエピトープに結合すると結論付けることができる。一方、試験抗体が参照抗体との飽和結合後にタンパク質又はペプチドに結合することができない場合、試験抗体は、本発明の参照抗体によって結合されるエピトープと同じエピトープに結合し得るか、又は参照抗体は、抗原の配座変化を引き起こし、したがって試験抗体の結合を妨げる。

20

【0243】

抗体が参照抗体との結合について競合するかどうかを決定するために、上記の結合方法を2つの異なる実験設定で行う。第1の設定では、参照抗体を飽和条件下で抗原に結合させ、続いて試験抗体の抗原への結合を評価する。第2の設定では、試験抗体を飽和条件下で抗原に結合させ、続いて参照抗体のタンパク質／ペプチドへの結合を評価する。両方の実験設定において、第1の（飽和）抗体のみがタンパク質／ペプチドに結合することができる場合、試験抗体及び参照抗体は抗原への結合について競合すると結論付けられる。当業者には理解されるように、参照抗体と結合について競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同一のエピトープに結合するわけではないが、重複又は隣接するエピトープに結合することによって参照抗体の結合を立体的に遮断し得るか、又は結合の欠如をもたらす立体構造変化を引き起こし得る。

30

【0244】

2つの抗体は、各々が抗原への他方の結合を競合的に阻害（遮断）する場合、同じ又は重複するエピトープに結合する。あるいは、一方の抗体の結合を低減又は排除する抗原中の本質的に全てのアミノ酸変異が他方の結合を低減又は排除する場合、2つの抗体は同じエピトープを有する。一方の抗体の結合を低減又は排除するいくつかのアミノ酸変異が他方の結合を低減又は排除する場合、2つの抗体は重複エピトープを有する。

【0245】

次いで、試験抗体の結合の観察された欠如が実際に参照抗体と同じ抗原の部分への結合によるものであるかどうか、又は立体的遮断（又は別の現象）が観察された結合の欠如の原因であるかどうかを確認するために、更なる日常的な実験（例えば、ペプチド変異及び結合分析）を行うことができる。この種の実験は、ELISA、RIA、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリ、又は当技術分野で利用可能な任意の他の定量的若しくは定性的抗体結合アッセイを使用して行うことができる。

40

【0246】

抗体変異体

特定の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸の置換、挿入及び／又は欠失を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異誘発のための関心部位としては、CDR及びFRが挙げられる。アミノ酸置換を目的の抗体に導入し、所望の活性、例えば、保持された／改

50

善された抗原結合、低下した免疫原性、又は改善された A D C C 若しくは C D C についてスクリーニングすることができる。

【0247】

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗 T R E M 1 抗体のアミノ酸配列変異体は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することによって、又はペプチド合成によって調製され得る。そのような修飾としては、例えば、抗 T R E M 1 抗体のアミノ酸配列内（例えば、1つ又は複数の C D R 及び／又はフレームワーク配列内、あるいは V H 及び／又は V L ドメイン内）の残基からの欠失及び／若しくは残基への挿入及び／又は残基の置換が挙げられる。最終構築物が所望の特性を有する限り、最終構築物に到達するために、欠失、挿入、及び置換の任意の組合せを行うことができる。

10

【0248】

本明細書で提供される変異体 V H 及び V L 配列の特定の実施形態では、各 H V R は変化していないか、又は1つ、2つ又は3つ以下のアミノ酸置換を含む。

【0249】

抗体が T R E M 1 に結合し、T R E M 1 活性を中和する能力を有意に変化させることなく、本発明によって提供される C D R に対して1つ又は複数のアミノ酸の置換、付加及び／又は欠失が行われ得ることが理解されるであろう。任意のアミノ酸置換、付加及び／又は欠失の効果は、当業者によって、例えば、本明細書に記載の方法、特に例に例示される方法を使用して、T R E M 1 の結合及びその天然リガンドとの T R E M 1 相互作用の阻害を決定することによって容易に試験することができる。

20

【0250】

その結果、変異体 V H 及び V L 配列の特定の実施形態では、各 C D R は、1つ、2つ又は3つ以下のアミノ酸置換を含み、そのようなアミノ酸置換は保存的であり、抗体は T R E M 1 に対するその結合特性を保持する。

【0251】

したがって、本発明は、C D R - L 1（配列番号11を含む）、C D R - L 2（配列番号12を含む）、C D R - L 3（配列番号13を含む）、C D R - H 1（配列番号14を含む）、C D R - H 2（配列番号15を含む）及びC D R - H 3（配列番号16を含む）から選択される1つ又は複数のC D Rを含む抗 T R E M 1 抗体を提供し、1つ又は複数のC D R中の1つ又は複数のアミノ酸は、別のアミノ酸、例えば、本明細書中下で定義される類似のアミノ酸で置換されている。

30

【0252】

一実施形態では、本発明は、C D R - L 1（配列番号11を含む）、C D R - L 2（配列番号12を含む）、C D R - L 3（配列番号13を含む）、C D R - H 1（配列番号14を含む）、C D R - H 2（配列番号15を含む）及びC D R - H 3（配列番号16を含む）を含む抗 T R E M 1 抗体を提供し、例えば、1つ又は複数のC D R中の1つ又は複数のアミノ酸は、本明細書で以下に定義する類似のアミノ酸等の別のアミノ酸で置換されている。

40

【0253】

一実施形態では、本発明は、配列番号12の最初のアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている抗 T R E M 1 抗体 C D R - L 2（配列番号12を含む）を提供する。より詳細には、KはSで置換される。

【0254】

一実施形態では、本発明の抗 T R E M 1 抗体は、3つのC D Rを含む軽鎖可変ドメインを含み、C D R - L 1の配列は、配列番号11に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性又は類似性を有する配列を含み、C D R - L 2は、配列番号12に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、若しくは98%の同一性又は

50

類似性を有する配列を含み、並びに／あるいはCDR-L3は、配列番号13に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

【0255】

一実施形態では、本発明の抗TREM1抗体は、3つのCDRを含む重鎖可変ドメインを含み、CDR-H1の配列は、配列番号14に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性又は類似性を有する配列を含み、CDR-H2は、配列番号15に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性又は類似性を有する配列を含み、並びに／あるいはCDR-H3は、配列番号16に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

10

【0256】

一実施形態では、本発明の抗TREM1抗体は、配列番号29に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性又は類似性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0257】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号79に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性又は類似性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。

20

【0258】

一実施形態では、本発明の抗TREM1抗体は、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号29に示されるものと少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性若しくは類似性を有する配列を含み、及び／又は重鎖可変領域は、配列番号79に示されるものと少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性若しくは類似性を有する配列を含む。

【0259】

一実施形態では、本発明の抗TREM1抗体は、それぞれ配列番号11／12／13／14／15／16を含むCDR-L1／CDR-L2／CDR-L3／CDR-H1／CDR-H2／CDR-H3配列を含み、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域の残りの部分は、それぞれ配列番号29及び79と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性又は類似性を有する。

30

【0260】

一実施形態において、本発明の抗TREM1抗体は、配列番号31に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性又は類似性を有する配列を含む軽鎖と、配列番号81に示される配列と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性又は類似性を有する配列を含む重鎖とを含むIgG4Pである。

40

【0261】

一実施形態において、本発明の抗TREM1抗体は、それぞれ配列番号11／12／13／14／15／16に示されるCDR-L1／CDR-L2／CDR-L3／CDR-H1／CDR-H2／CDR-H3配列を含むIgG4Pであり、軽鎖及び重鎖の残りの部分は、それぞれ配列番号31及び81と少なくとも70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性又は類似性を有する。

50

【0262】

一実施形態では、本発明の抗体は、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号29に示される配列を含み、1、2、3、18及び50の位置の1つ又は複数の残基は、別のアミノ酸によって置換されており、重鎖可変領域は、配列番号79に示される配列を含み、23、48、49、71、73、75及び78の位置の1つ又は複数の残基は別のアミノ酸によって置換されている。

【0263】

配列同一性及び類似性

配列間の同一性及び類似性の程度を容易に計算することができる。「配列同一性%」（又は「配列類似性%」）は、（1）比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列した配列を比較すること（例えば、より長い配列の長さ、より短い配列の長さ、指定されたウィンドウ等である）と、（2）一致した位置の数を得るために、同一の（又は類似の）アミノ酸を含む位置の数を決定すること（例えば、同一のアミノ酸が両方の配列に存在する、類似のアミノ酸が両方の配列に存在する）と、（3）一致した位置の数を比較ウィンドウ（例えば、より長い配列の長さ、より短い配列の長さ、指定されたウィンドウ）内の位置の総数で割ることと、（4）結果に100を掛けて、配列同一性%又は配列類似性%を得ることと、によって計算される。

【0264】

比較のための配列のアラインメント方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) の相同性整列アルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装によって (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis)、又は手動アラインメント及び目視検査によって（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplementを参照されたい)）行うことができる。

【0265】

配列同一性パーセント及び配列類似性パーセントを決定するのに適したアルゴリズムの好ましい例としては、Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1977) 及び Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) に記載されるBLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムを含む。ポリペプチド配列はまた、デフォルトパラメータ又は推奨パラメータを使用してFASTAを使用して比較することができる。FASTA（例えば、FASTA 2及びFASTA 3）は、クエリ配列と検索配列との間の最良の重複の領域のアラインメント及び配列同一性パーセントを提供する。

【0266】

特定の実施形態では、置換、挿入又は欠失は、そのような変化が、抗体が標的に結合する能力を実質的に低下させない限り、1つ又は複数のCDR内で起こり得る。

【0267】

例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的変更をCDRにおいて行うことができる。そのような改変は、CDR中の抗原接触残基の外側で行われ得る。

【0268】

保存的置換を、より実質的な「例示的な置換」と共に表4に示す。

【0269】

表4. アミノ酸置換の例

【表 4】

元の残基	例示的な置換	保存的置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys(C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala;	Leu

【0270】

抗体変異体の生物学的特性における実質的な修飾は、置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、標的部位における分子の電荷若しくは疎水性、又は側鎖のバルクの維持に対する効果が有意に異なる置換を選択することによって達成することができる。アミノ酸は、それらの側鎖の特性の類似性に従ってグループ化され得る（A. L. Lehninger, Biochemistry second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)）。

【0271】

1つのタイプの置換変異体は、親抗体（ヒト化抗体又はヒト抗体）の1つ又は複数のCDR領域残基を置換することを含む。一般に、更なる研究のために選択された得られた変異体（複数可）は、親抗体と比較して特定の生物学的特性（例えば、親和性の増加、免疫原性の低下）に変化を有する、及び／又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持している。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えばファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を使用して簡便に生成することができる。簡潔には、1つ又は複数のCDR残基を変異させ、変異体抗体をファージ上に提示し、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。

【0272】

例えば、抗体親和性を改善するために、CDRに変更（例えば、置換）を行うことができる。そのような変化は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス

中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)を参照されたい）、及び／又は抗原と接触する残基において行われ得、得られた変異体VH又はVLは結合親和性について試験される。二次ライブラリの構築及び二次ライブラリからの再選択による親和性成熟は、例えばHoogenboom et al. Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態では、多様性は、様々な方法（例えば、エラープロンプPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発）のいずれかによって成熟のために選択された可変遺伝子に導入される。次に、二次ライブラリが作成される。次いで、ライブラリをスクリーニングして、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。

10

【0273】

突然変異誘発の標的となり得る抗体の残基又は領域の同定に使用できる方法の1つは、アラニンスキャニング突然変異誘発である（Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085）。この方法では、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定するために、残基又は多数の標的残基が同定され、アラニンで置換される。あるいは、又は更に、抗原-抗体複合体のX線構造を使用して、抗体とその抗原との間の接触点を同定することができる。変異体をスクリーニングして、所望の特性を含むかどうかを決定することができる。

20

【0274】

定常領域変異体

いくつかの実施形態において、1つ又は複数のアミノ酸修飾が、本明細書中に提供される抗体のFc領域に導入され得、それにより、Fc領域変異体が作製される。Fc領域変異体は、1つ又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4Fc領域）を含み得る。

【0275】

FcRへの結合が改善又は減少した特定の抗体変異体が記載されている。（例えば、米国特許第6,737,056号；国際公開第2004/056312号、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).を参照されたい）

30

【0276】

半減期が増加し、新生児型Fc受容体（FcRn）に対する結合が改善された抗体は、米国特許第2005/0014934号に記載されている。これらの抗体は、Fc領域とFcRnとの結合を改善する1つ又は複数の置換を有するFc領域を含む。

【0277】

特定の実施形態では、抗体変異体は、ADCCを改善する1つ又は複数のアミノ酸置換、例えばFc領域の298、333及び／又は334の位置の置換（残基のEUNアンバリング）を有するFc領域を含む。

40

【0278】

エフェクター機能が低下した抗体には、Fc領域残基234、235、237、238、265、269、270、297、327及び329のうちの1又は複数が置換されたものが含まれる（例えば、米国特許第6,737,056号を参照されたい）。そのようなFc変異体には、アミノ酸残基がEUNアンバリングシステムに従ってナンバリングされている、アミノ酸位置265、269、270、297及び327のうちの二つ以上に置換を有するFc変異体が含まれる。

【0279】

CDC及び／又はADCC活性の減少／枯渇を確認するために、インビトロ及び／又はインビボ細胞傷害性アッセイを行うことができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合ア

50

ッセイを実施して、抗体がFcγR結合を欠く（したがって、おそらくADCC活性を欠く）が、FcRn結合能を保持することを確実にすることができる。ADCC、NK細胞を媒介するための初代細胞はFcγRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991) に要約される。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号、米国特許第5,821,337号に記載されている。代替において、又は、加えて、目的の分子のADCC活性は、インビボにおいて、Clynes et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998) に開示されるもの等、例えば、動物モデルにおいて評価され得る。抗体がClqに結合することができず、したがってCDC活性を欠くことを確認するために、Clq結合アッセイを行うこともできる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のClq及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施することができる（例えば、Gazzano-Santoro et al, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996); Cragg, M. S. et al, Blood 101: 1045-1052 (2003); and Cragg, M. S. and M. I. Glennie, Blood 103: 2738-2743 (2004) を参照されたい）。FcRn結合及びインビボでのクリアランス／半減期の決定もまた、当該分野で公知の方法（例えば、Petkova, S. B. et al, Int'l. Immunol. 18 (12): 1759-1769 (2006) を参照されたい）を用いて行うことができる。

10

20

30

40

50

【0280】

本発明の抗体分子の定常領域ドメインは、存在する場合、抗体分子の提案された機能、特に必要とされ得るエフェクター機能を考慮して選択され得る。例えば、定常領域ドメインは、ヒトIgA、IgD、IgE、IgG又はIgMのドメインであり得る。特に、抗体分子が治療用途を意図し、抗体エフェクター機能が必要とされる場合、ヒトIgG定常領域ドメイン、特にIgG1及びIgG3アイソタイプを使用することができる。あるいは、抗体分子が治療目的を意図しており、抗体エフェクター機能が必要とされない場合、IgG2及びIgG4アイソタイプを使用してもよい。これらの定常領域ドメインの配列変異体も使用され得ることが理解されるであろう。

【0281】

いくつかの態様において、抗体はIgG1 LALA、すなわちIgG1の定常領域におけるアミノ酸置換L234A／L235A（EUNアンバリングによる）が導入されている野生型ヒトIgG1アイソフォームの変異体である。

【0282】

いくつかの実施形態では、抗体は、IgG4P、例えばAngal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108に記載されているように、アミノ酸228（EUNアンバリングによると）がプロリンで置き換えられている野生型ヒトIgG4アイソフォームの変異体である。

【0283】

グリコシル化変異体

特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように変更される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、1つ又は複数のグリコシル化部位が作成又は除去されるようにアミノ酸配列を変更することによって都合よく達成され得る。

【0284】

ヒト化抗体、ヒト抗体及びキメラ抗体

本発明の抗体は、ヒト化抗体、完全ヒト抗体又はキメラ抗体であり得るが、これらに限定されない。

【0285】

一実施形態では、抗体はヒト化されている。より具体的には、抗TREM1抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体又はヒト化抗体である。

【0286】

特定の実施形態では、本明細書中に提供される抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体の例は、例えば米国特許第4,816,567；及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載される。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト霊長類、例えばサルに由来する可変領域）及びヒト定常領域を含む。別の例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが、親抗体のクラス又はサブクラスから変更された「クラス切替」抗体である。

10

【0287】

キメラ抗体は、要素がそれが由来する種の特徴を保持するように、2つの異なる種に由来する要素から構成される。一般に、キメラ抗体は、1つの種由来の可変領域、例えばマウス、ラット、ウサギ、又はヒト等の別の種由来の類似の定常領域を含むであろう。

【0288】

特定の実施形態では、キメラ抗体はヒト化抗体である。

【0289】

CDR全体ではなくCDRの特異性決定残基を移入するだけでよいことが理解されよう（例えば、Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34を参照）。ヒト化抗体は、任意に、CDRが由来する非ヒト種に由来する1つ又は複数のフレームワーク残基を更に含み得る。

20

【0290】

適切には、本発明によるヒト化抗体は、ヒト受容体フレームワーク領域並びに1つ又は複数のCDRを含み、任意に1つ又は複数のドナーフレームワーク残基を更に含む可変ドメインを有する。

【0291】

一実施形態では、抗体はヒト化抗体であり、可変ドメインはヒト受容体フレームワーク領域及び非ヒトドナーCDRを含む。

【0292】

CDRがグラフトされる場合、マウス、霊長類及びヒトフレームワーク領域を含む、CDRが由来するドナー抗体のクラス／タイプを考慮して、任意の適切な受容体可変領域フレームワーク配列が使用され得る。

30

【0293】

本発明において使用され得るヒトフレームワークの例は、KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY及びPOM (Kabata et al.) である。例えば、KOL及びNEWMを重鎖に使用することができ、REIを軽鎖に使用することができ、EU、LAY及びPOMを重鎖及び軽鎖の両方に使用することができる。あるいは、ヒト生殖系列配列を使用してもよく、これらは、www.imgt.orgで入手可能である。実施形態では、受容体フレームワークがIGKV1-9ヒト生殖細胞系及び／又はIGHV3-66ヒト生殖細胞系である。実施形態では、ヒトフレームワークは、1-5、1-4、1-3又は1-2個のドナー抗体アミノ酸残基を含む。

40

【0294】

本発明のヒト化抗体において、受容体重鎖及び軽鎖は、必ずしも同じ抗体に由来する必要はなく、所望であれば、異なる鎖に由来するフレームワーク領域を有する複合鎖を含み得る。

【0295】

いくつかの実施形態では、抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を使用して産生され得る。より具体的には、抗TREM1抗体は、ヒト抗体重鎖定常領域及びヒト軽鎖定常領域を含む。

50

【0296】

ヒト抗体は、抗体の可変領域又は全長鎖がヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られる場合、特定の生殖系列配列に由来する重鎖若しくは軽鎖可変領域又は全長重鎖若しくは軽鎖を含む。そのようなシステムには、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを目的の抗原で免疫すること、又はファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリを目的の抗原でスクリーニングすることが含まれる。ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来するヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、ヒト抗体の配列に配列が最も近い（すなわち、最大%の同一性）ヒト生殖系列免疫グロブリン配列を選択することによって、そのように同定することができる。特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来するヒト抗体は、例えば、天然に存在する体細胞変異又は部位特異的変異の意図的な導入に起因して、生殖系列配列と比較してアミノ酸の相違を含み得る。しかしながら、選択されたヒト抗体は、典型的には、他の種の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、マウス生殖系列配列）と比較した場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列が少なくとも90%同一であり、ヒト抗体をヒトであると同定するアミノ酸残基を含有する。特定の場合において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列において少なくとも60%、70%、80%、90%、又は少なくとも95%、又は更には少なくとも96%、97%、98%、又は99%同一であり得る。典型的には、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と10個以下のアミノ酸差を示すであろう。特定の場合において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列から5個以下、又は更には4個、3個、2個又は1個以下のアミノ酸差を示し得る。

【0297】

ヒト抗体は、当業者に公知の多くの方法によって産生され得る。ヒト抗体は、ヒト骨髄腫又はマウス-ヒトヘテロミエロマ細胞株を使用するハイブリドーマ法によって作製することができる（Kozbor, J Immunol; (1984) 133:3001; Brodeur, Monoclonal Isolated Antibody Production Techniques and Applications, pp 51-63, Marcel Dekker Inc, 1987）。代替的な方法には、ファージライブラリ又はトランスジェニックマウスの使用が含まれ、その両方がヒト可変領域レパートリを利用する（（Winter G; (1994) Annu Rev Immunol 12:433-455, Green LL, (1999) J Immunol Methods 231:11-23）。ヒト抗体は、例えば、マウス免疫グロブリン可変遺伝子及び場合により定常領域遺伝子が、例えば、米国特許第5,545,806号、米国特許第5,569,825号、米国特許第5,625,126号、米国特許第5,633,425号、米国特許第5,661,016号及び米国特許第5,770,429号に記載されるように、それらのヒト対応物によって置き換えられているマウスによって産生され得る。

【0298】

エフェクター分子

所望であれば、本発明による抗体は、1つ又は複数のエフェクター分子（複数可）にコンジュゲート化され得る。一実施形態では、抗体は、エフェクター分子に結合していない。

【0299】

エフェクター分子は、本発明の抗体に結合され得る単一部分を形成するように連結された単一のエフェクター分子又は2つ以上のそのような分子を含み得ることが理解されるであろう。エフェクター分子に連結された抗体フラグメントを得ることが望ましい場合、これは、抗体フラグメントが直接又はカップリング剤を介してエフェクター分子に連結される標準的な化学的又は組換えDNA手順によって調製され得る。そのようなエフェクター

分子を抗体にコンジュゲートさせるための技術は、当技術分野で周知である（Hellsstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62: 119-58 and Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123を参照）。特定の化学的手順としては、例えば、国際公開第93/06231号、国際公開第92/22583号、国際公開第89/00195号、国際公開第89/01476号及び国際公開第03/031581号に記載されているものが挙げられる。あるいは、エフェクター分子がタンパク質又はポリペプチドである場合、例えば国際公開第86/01533号及び欧州特許第0392745号に記載されるように、組換えDNA手順を使用して連結を達成することができる。

10

【0300】

エフェクター分子の例としては、細胞に有害な（例えば、殺傷）任意の薬剤を含む細胞毒又は細胞傷害剤が挙げられ得る。例としては、コンプレスタチン、ドラスタチン、エポチロン、スタウロスポリン、メイタンシノイド、スポンジスタチン、リゾキシシン、ハリコンドリン、ロリジン、ヘミアステリン、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びビューロマイシン並びにそれらの類似体又はホモログが挙げられる。

20

【0301】

エフェクター分子には、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）及びロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC及びシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）及びドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン（AMC）、カリケアマイシン又はデュオカルマイシン）及び抗有糸分裂剤（例えば、ピンクリスチン及びビンブラスチン）も含まれるが、これらに限定されない。

30

【0302】

他のエフェクター分子としては、 ^{111}In 及び ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{213}Bi 、 ^{252}Cf 、 ^{192}Ir 及びタングステン188/レニウム188等のキレート化放射性核種；又は限定されないが、アルキルホスホコリン、トポイソメラーゼI阻害剤、タキソイド及びスラミン等の薬物が挙げられ得る。

【0303】

他のエフェクター分子としては、タンパク質、ペプチド及び酵素が挙げられる。目的の酵素には、タンパク質分解酵素、加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼが含まれるが、これらに限定されない。目的のタンパク質、ポリペプチド及びペプチドとしては、限定されないが、免疫グロブリン、毒素、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素又はジフテリア毒素、タンパク質、例えば、インスリン、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子又は組織プラスミノゲン活性化因子、血栓剤又は抗血管新生剤、例えば、アンギオスタチン又はエンドスタチン、又は生物学的応答調節剤、例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、神経成長因子（NGF）あるいは他の成長因子及び免疫グロブリンが挙げられる。

40

50

【0304】

他のエフェクター分子は、例えば診断に有用な検出可能な物質を含み得る。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性核種、（陽電子放出断層撮影に使用するための）陽電子放出金属、及び非放射性常磁性金属イオンが含まれる。診断薬として使用するために抗体にコンジュゲート化させることができる金属イオンについては、一般に米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、適切な補欠分子族としては、ストレプトアビジン、アビジン及びビオチンが挙げられ、適切な蛍光材料としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル及びフィコエリトリン；適切な発光材料としては、ルミノールが挙げられ、適切な生物発光材料としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンが挙げられ、適切な放射性核種としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 及び ^{99}Tc が挙げられる。

10

【0305】

別の例では、エフェクター分子は、インビボでの抗体の半減期を増加させ、及び／又は抗体の免疫原性を低下させ、及び／又は免疫系に対する上皮バリアを横切る抗体の送達を増強し得る。このタイプの適切なエフェクター分子の例としては、ポリマー、アルブミン、アルブミン結合タンパク質、又は国際公開第2005/117984号に記載されているもの等のアルブミン結合化合物が挙げられる。

20

【0306】

エフェクター分子がポリマーである場合、それは一般に、合成又は天然に存在するポリマー、例えば任意に置換された直鎖若しくは分岐鎖ポリアルキレン、ポリアルケニレン若しくはポリオキシアルキレンポリマー又は分岐若しくは非分岐多糖、例えばホモ又はヘテロ多糖であり得る。

【0307】

上記の合成ポリマー上に存在し得る特定の任意選択の置換基としては、1つ又は複数のヒドロキシ、メチル又はメトキシ基が挙げられる。

【0308】

合成ポリマーの具体例としては、置換されていてもよい直鎖又は分岐鎖のポリ（エチレングリコール）、ポリ（プロピレングリコール）ポリ（ビニルアルコール）又はその誘導体、特に置換されていてもよいポリ（エチレングリコール）、例えばメトキシポリ（エチレングリコール）又はその誘導体が挙げられる。

30

【0309】

具体的な天然に存在するポリマーとしては、ラクトース、アミロース、デキストラン、グリコーゲン又はそれらの誘導体が挙げられる。

【0310】

一実施形態では、ポリマーは、アルブミン又はそのフラグメント、例えばヒト血清アルブミン又はそのフラグメントである。

【0311】

ポリマーのサイズは、所望に応じて変えることができるが、一般に、500 Da～50000 Da、例えば5000～40000 Da、例えば20000～40000 Daの平均分子量範囲である。ポリマーサイズは、特に、生成物の意図される用途、例えば腫瘍等の特定の組織に局在する能力又は循環半減期を延長する能力に基づいて選択され得る（総説については、Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545を参照されたい）。したがって、例えば、生成物が循環を離れ、例えば腫瘍の治療に使用するために組織に浸透することを意図している場合、例えば約5000 Daの分子量を有する低分子量ポリマーを使用することが有利であり得る。生成物が循環中に留まる用途では、例えば20000 Da～40000 Daの範囲の分子量を有する高分子量ポリマーを使用することが有利であり得る。

40

50

【0312】

適切なポリマーとしては、ポリアルキレンポリマー、例えばポリ（エチレングリコール）又は特にメトキシポリ（エチレングリコール）又はその誘導体、特に約15000Da～約40000Daの範囲の分子量を有するものが挙げられる。

【0313】

一例において、本発明による抗体は、ポリ（エチレングリコール）（PEG）部分に結合している。特定の一実施形態では、本発明による抗原結合フラグメント及びPEG分子は、抗体フラグメント中に位置する任意の利用可能なアミノ酸側鎖又は末端アミノ酸官能基、例えば任意の遊離アミノ、イミノ、チオール、ヒドロキシル又はカルボキシル基を介して結合され得る。そのようなアミノ酸は、抗体フラグメント中に天然に存在し得るか、又は組換えDNA法を使用してフラグメントに操作され得る（例えば、米国特許第5,219,996号；米国特許第5,667,425号；国際公開第98/25971号；国際公開第2008/038024号を参照されたい）。1つの例において、本発明の抗体分子は、修飾されたFabフラグメントであり、ここで、修飾は、エフェクター分子の結合を可能にするためのその重鎖のC末端への1つ又は複数のアミノ酸の付加である。適切には、追加のアミノ酸は、エフェクター分子が結合し得る1つ又は複数のシステイン残基を含む修飾ヒンジ領域を形成する。複数の部位を使用して、2つ以上のPEG分子を結合することができる。

10

【0314】

適切には、PEG分子は、抗体フラグメントに位置する少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を介して共有結合している。修飾抗体フラグメントに結合した各ポリマー分子は、フラグメント中に位置するシステイン残基の硫黄原子に共有結合していてもよい。共有結合は、一般にジスルフィド結合、又は特に硫黄-炭素結合である。チオール基が結合点として使用される場合、適切に活性化されたエフェクター分子、例えば、マレイミド及びシステイン誘導体等のチオール選択的誘導体を使用することができる。活性化ポリマーは、上記のポリマー修飾抗体フラグメントの調製における出発材料として使用され得る。活性化ポリマーは、 α -ハロカルボン酸又はエステル、例えばヨードアセトアミド、イミド、例えばマレイミド、ビニルスルホン又はジスルフィド等のチオール反応性基を含む任意のポリマーであり得る。そのような出発材料は、商業的に得られてもよく（例えば、Nektar、以前はShearwater Polymers Inc., Huntville, AL, USAから）、又は従来の化学的手順を使用して商業的に入手可能な出発材料から調製されてもよい。特定のPEG分子には、20KメトキシPEG-アミン（Nektar、以前はShearwater；Rapp Polymere；及びSunBioから得ることができる）及びM-PEG-SPA（Nektar、以前はShearwaterから得ることができる）が含まれる。

20

30

【0315】

一実施形態では、抗体は、例えば欧州特許第0948544号又は欧州特許第1090037号[“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, “Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications”, 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and “Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54: 531-545も参照されたい]に開示されている方法に従って、PEG化されている、すなわちPEG（ポリ（エチレングリコール））がそれに共有結合している修

40

50

飾 F a b フラグメント、F a b ' フラグメント又は d i F a b である。一例では、P E G はヒンジ領域内のシステインに結合している。一例では、P E G 修飾 F a b フラグメントは、修飾ヒンジ領域内の単一のチオール基に共有結合したマレイミド基を有する。リジン残基は、マレイミド基に共有結合していてもよく、リジン残基上の各アミン基に、約 20,000 Da の分子量を有するメトキシポリ（エチレングリコール）ポリマーが結合していてもよい。したがって、F a b フラグメントに結合した P E G の総分子量は、約 40,000 Da であり得る。

【0316】

一実施形態では、抗体は、その重鎖の C 末端に、エフェクター分子が結合している少なくとも 1 つのシステイン残基を含む修飾ヒンジ領域を有する修飾 F a b ' フラグメントである。適切には、エフェクター分子は P E G であり、（国際公開第 98 / 25971 号及び国際公開第 2004072116 号又は国際公開第 2007 / 003898 号に記載されている方法を使用して結合される。エフェクター分子は、国際特許出願国際公開第 2005 / 003169 号、国際公開第 2005 / 003170 号及び国際公開第 2005 / 003171 号に記載されている方法を使用して、抗体フラグメントに結合され得る。

【0317】

一実施形態では、抗体は、エフェクター分子に結合していない。

【0318】

ポリヌクレオチド及びベクター

本発明はまた、本発明による抗体又はその一部（例えば、表 5 に列挙されるアミノ酸配列番号）をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。本発明による単離されたポリヌクレオチドは、例えば化学処理によって生成された合成 D N A、c D N A、ゲノム D N A 又はそれらの任意の組合せを含み得る。

【0319】

表 5 . 抗 T R E M 1 抗体のアミノ酸配列及びそれらの対応する核酸配列。

【表 5】

抗体配列	アミノ酸配列番号	核酸配列番号
12172 gL6gH6軽鎖V領域	33	34
12172 gL6gH6重鎖V領域	57	58
12172 gL6gH6軽鎖	35	36
12172 gL6gH6重鎖IgG1	63	64
12172 gL6gH6重鎖IgG1 LALA	65	66
12172 gL6gH6重鎖IgG4P	59	60
12172 gL6gH6重鎖IgG4P FALA	61	62
12172 gL2gH11軽鎖V領域	29	30
12172 gL2gH11重鎖V領域	79	80
12172 gL2gH11軽鎖	31	32
12172 gL2gH11重鎖IgG1	85	86
12172 gL2gH11重鎖IgG1 LALA	87	88
12172 gL2gH11重鎖IgG4P	81	82
12172 gL2gH11重鎖IgG4P FALA	83	84

【0320】

好適な配列の例を本明細書中に提供する。したがって、一実施形態では、本発明は、配列番号34、58、36、64、66、60、62、30、80、32、86、88、82又は84で示される配列を含む、抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0321】

一実施形態では、本発明は、それぞれ配列番号88又は82に示される配列を含む本発明のIgG1 LALA又はIgG4P抗体の重鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0322】

配列番号32に示される配列を含む本発明のIgG1 LALA又はIgG4P抗体の軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドも提供される。

【0323】

別の実施形態において、本発明は、重鎖をコードするポリヌクレオチドが配列番号82に示される配列を含み、軽鎖をコードするポリヌクレオチドが配列番号32に示される配列を含む、本発明のIgG4P抗体の重鎖及び軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0324】

本発明はまた、本明細書に記載の1つ又は複数のポリヌクレオチドを含むクローニング又は発現ベクターを提供する。一例において、本発明によるクローニング又は発現ベクターは、配列番号34、58、36、64、66、60、62、30、80、32、86、88、82又は84から選択される配列を含む1つ又は複数の単離されたポリヌクレオチドを含む。

【0325】

分子生物学の標準的な技術を使用して、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードするDNA配列を調製することができる。所望のDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成技術を使用して完全に又は部分的に合成され得る。部位特異的突然変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術が必要に応じて使用され得る。

【0326】

ベクターを構築することができる一般的な方法、トランスフェクション方法及び培養方法は、当業者に周知である。この点に関しては、“Current Protocols in Molecular Biology”，1999，F. M. Ausubel（ed），Wiley Interscience，New York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishingを参照されたい。

【0327】

抗体及びその抗原結合フラグメントを産生するための宿主細胞

本発明による1つ又は複数の単離されたポリヌクレオチド配列、又は本発明の抗体をコードする1つ又は複数の単離されたポリヌクレオチド配列を含む1つ又は複数のクローニングベクター又は発現ベクターを含む宿主細胞も提供される。任意の適切な宿主細胞／ベクター系を、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列の発現のために使用することができる。細菌、例えば大腸菌（E. coli）、及び他の微生物系を使用してもよく、又は真核生物、例えば哺乳動物、宿主細胞発現系を使用してもよい。適切な哺乳動物宿主細胞には、CHO、骨髓腫又はハイブリドーマ細胞が含まれる。

【0328】

更なる実施形態では、そのような核酸（複数可）又はベクター（複数可）を含む宿主細胞が提供される。そのような一実施形態では、宿主細胞は、（1）抗TREM1抗体のVLを含むアミノ酸配列及び抗TREM1抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は（2）抗TREM1抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核

10

20

30

40

50

酸を含む第1のベクター及び抗TREM1抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む（例えば、それらによって形質転換されている）。一実施形態では、宿主細胞は真核生物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又はリンパ球系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。一実施形態では、宿主細胞は原核細胞、例えば大腸菌（E. coli）細胞である。一実施形態では、抗TREM1抗体を作製する方法が提供され、上記の抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養すること、及び場合により抗体を宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から回収することを含む方法が提供される。

【0329】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適した宿主細胞には、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要でない場合、細菌において産生され得る。細菌における抗体フラグメント及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号及び同第5,840,523号を参照されたい。（Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003)、大腸菌（E. coli）における抗体フラグメントの発現を記載している、pp. 245-254も参照されたい）。発現後、抗体は、可溶性画分で細菌細胞ペーストから単離され得、更に精製され得る。

【0330】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母等の真核微生物は、グリコシル化経路が部分的又は完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす「ヒト化」真菌及び酵母株を含む、抗体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)、及びLiet al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照されたい。

【0331】

本発明での使用に適した種類のチャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）には、DHFR選択可能マーカーと共に使用され得るCHO-DG44細胞及びCHO-DXB11細胞等のdhfr-CHO細胞を含むCHO及びCHO-K1細胞、又はグルタミンシンセターゼ選択可能マーカーと共に使用され得るCHO-K1-SV細胞が含まれ得る。抗体の発現に使用される他の細胞型としては、リンパ球系細胞株、例えば、NS0骨髓腫細胞及びSP2細胞、COS細胞が挙げられる。宿主細胞は、本発明による単離されたポリヌクレオチド配列又は発現ベクターで安定に形質転換又はトランスフェクトされ得る。

【0332】

抗体の製造プロセス

本発明はまた、本発明による抗体を産生するのに適した条件下で本発明による宿主細胞を培養すること、及び抗体を単離することを含む、本発明による抗体の産生方法を提供する。

【0333】

抗体は、重鎖又は軽鎖ポリペプチドのみを含み得、その場合、宿主細胞をトランスフェクトするために重鎖又は軽鎖ポリペプチドコード配列のみを使用する必要がある。重鎖及び軽鎖の両方を含む抗体又はその抗原結合フラグメントの産生のために、細胞株を、軽鎖ポリペプチドをコードする第1のベクター及び重鎖ポリペプチドをコードする第2のベクターの2つのベクターでトランスフェクトすることができる。あるいは、軽鎖及び重鎖ポリペプチドをコードする配列を含む単一のベクターを使用してもよい。

【0334】

したがって、宿主細胞を培養し、抗体を発現させ、抗体を単離し、場合により抗体を精製して単離された抗体を提供するためのプロセスが提供される。一実施形態では、プロセスは、単離された抗体にエフェクター分子をコンジュゲートさせる工程を更に含む。

【0335】

本発明はまた、本発明のベクターを含む宿主細胞を、本発明の抗体分子をコードするDNAからタンパク質の発現をもたらすのに適した条件下で培養すること、及び抗体分子を単離することを含む、本発明による抗体の製造方法を提供する。

【0336】

抗体分子は、重鎖又は軽鎖ポリペプチドのみを含み得、その場合、宿主細胞をトランスフェクトするために重鎖又は軽鎖ポリペプチドコード配列のみを使用する必要がある。重鎖及び軽鎖の両方を含む産物の製造のために、細胞株を、軽鎖ポリペプチドをコードする第1のベクター及び重鎖ポリペプチドをコードする第2のベクターの2つのベクターでトランスフェクトすることができる。あるいは、軽鎖及び重鎖ポリペプチドをコードする配列を含む単一のベクターを使用してもよい。

10

【0337】

本発明による抗体は、宿主細胞から良好なレベルで発現される。したがって、抗体の特性は、商業的処理のために最適化されていると思われる。

【0338】

精製抗体

一実施形態では、精製抗体、例えばヒト化抗体、特に本発明による抗体が、エンドトキシン及び／又は宿主細胞タンパク質若しくはDNAから実質的に精製されている、特にエンドトキシン及び／又は宿主細胞タンパク質若しくはDNAを含まない、又は実質的に含まないもので提供される。

20

【0339】

エンドトキシンを実質的に含まないとは、一般に、抗体産物1mg当たり1EU又はそれ未満、例えば産物1mg当たり0.5又は0.1EUのエンドトキシン含有量を指すことを意図する。

【0340】

宿主細胞タンパク質又はDNAを実質的に含まないとは、一般に、必要に応じて、宿主細胞タンパク質及び／又はDNA含有量が抗体産物1mg当たり400µg以下、例えば100µg/mg以下、特に20µg/mgを指すことを意図する。

【0341】

抗体の治療的使用

本発明の抗体、その製剤又は医薬組成物は、予防的処置及び／又は治療的処置のために投与され得る。

30

【0342】

本発明は、医薬品として使用するための本発明の抗TREM1抗体又はその医薬組成物を提供する。

【0343】

予防的適用において、抗体、製剤又は組成物は、本明細書中に記載されるような障害又は状態のリスクがある対象に、その状態又はその症状の1つ若しくは複数のその後の影響を防止するか又は低下させるのに十分な量で投与される。

【0344】

治療用途では、抗体は、本明細書に記載の障害又は状態に既に罹患している対象に、その状態又はその症状の1つ又は複数を治療、緩和又は部分的に停止させるのに十分な量で投与される。そのような治療的処置は、疾患症状の重症度の低下、又は無症状期間の頻度若しくは持続期間の増加をもたらし得る。

40

【0345】

処置される対象は、動物であり得る。好ましくは、本発明による医薬組成物は、ヒト対象への投与に適合されている。

【0346】

本発明は、本明細書に記載の障害又は状態を治療することを必要とする対象において本明細書に記載の障害又は状態を治療する方法を提供し、方法は、本発明による抗体を対象

50

に投与することを含む。そのような抗体は、治療有効量で投与される。

【0347】

本発明はまた、本明細書中に記載されるような障害又は状態の治療において使用するための本発明の抗体を提供する。

【0348】

治療適応症

本発明の抗体は、TREM1活性、例えば、TREM1を介したシグナル伝達から全体的又は部分的に生じる任意の条件に関連する任意の症状の処置、予防又は改善において使用され得る。

【0349】

TREM1及びその複数の経路は、多数の神経学的、神経発達の、精神医学的、全身性及び自己免疫性の炎症状態に関係している。本発明の抗体及び組成物を使用して処置することができる状態のいくつかの例としては、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、タウオパチー疾患、認知症、前頭側頭型認知症、血管性認知症、混合型認知症、多系統萎縮症、てんかん（結節性硬化症複合及び限局性皮質形成異常を含む）、ハンチントン病、脊髄損傷、外傷性脳損傷、慢性外傷性脳症、虚血性脳卒中、多発性硬化症、自己免疫性神経炎、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、大鬱病性障害、双極性障害、遺伝性状態、又はそれらの任意の組合せが挙げられる。

【0350】

本発明の抗体及び組成物は、神経障害を処置するために使用することができる。より具体的には、当該神経障害は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）又はアルツハイマー病である。

【0351】

抗体及びその抗原結合フラグメントの診断的使用

【0352】

本発明はまた、診断的に活性な薬剤としての、又は、例えば、疾患又はその重症度を診断するための診断アッセイにおける本発明の抗体の使用を提供する。

【0353】

診断は、好ましくは、生物学的試料に対して行われ得る。「生物学的試料」は、個体から得られた様々な試料タイプを包含し、診断アッセイ又はモニタリングアッセイに使用することができる。定義は、脳脊髄液、血漿及び血清等の血液、並びに尿及び唾液等の生物学的起源の他の液体試料、生検標本又は組織培養物等の固体組織試料、又はそれらに由来する細胞及びそれらの子孫を包含する。この定義はまた、例えば、試薬による処置、可溶化、又はポリヌクレオチド等の特定の成分の濃縮等によって、それらの調達後に何らかの方法で操作された試料を含む。

【0354】

診断試験は、好ましくは、ヒト又は動物の身体と接触していない生物学的試料に対して行われ得る。このような診断試験は、インビトロ試験とも呼ばれる。インビトロ診断試験は、対象から得られた生物学的試料中のTREM1を検出するインビトロ方法に依存し得る。

【0355】

医薬組成物及び診断組成物

本発明の抗体は、医薬組成物中に提供され得る。医薬組成物は通常無菌であり、薬学的に許容され得るアジュバント及び／又は担体を更に含み得る。

【0356】

本発明の抗体は、本明細書中に記載されるような障害又は状態の治療、診断及び／又は予防において有用であるので、本発明はまた、本発明による抗体又はその抗原結合フラグメントを薬学的に許容され得る担体、賦形剤又は希釈剤の1つ又は複数と組み合わせて含む医薬組成物又は診断組成物を提供する。

【0357】

特に、抗体又はその抗原結合フラグメントは、1つ又は複数の薬学的に許容され得る賦形剤、希釈剤又は担体を含む医薬組成物として提供される。

【0358】

これらの組成物は、治療活性成分（複数可）に加えて、薬学的に許容され得る賦形剤、担体、希釈剤、緩衝液、安定剤又は当業者に周知の他の材料を含み得る。そのような材料は非毒性であるべきであり、活性成分の有効性を妨害してはならない。

【0359】

本発明の抗TREM1抗体、又は本発明の抗体をコードする配列を含むポリヌクレオチドを含む組成物（医薬製剤を含む）も提供される。特定の実施形態では、組成物は、本発明の1つ若しくは複数の抗体、又は本発明の1つ若しくは複数の抗体をコードする配列を含む1つ若しくは複数のポリヌクレオチドを含む。これらの組成物は、当技術分野で周知の適切な担体、例えば薬学的に許容され得る賦形剤及び／又は緩衝液を含むアジュバントを更に含み得る。

【0360】

本発明の抗体の医薬組成物は、所望の純度を有するそのような抗体を、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態の1つ又は複数の任意の薬学的に許容され得る担体と混合することによって調製される。

【0361】

上記の技術及びプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkinsに見ることができる。

【0362】

薬学的に許容され得る担体は、一般に、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに対して非毒性であり、限定されないが、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等の緩衝液：アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；及び／又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における例示的な薬学的に許容され得る担体としては、間質性薬物分散剤、例えば、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）が更に挙げられる。rHuPH20を含む特定の例示的なsHASEGP及び使用方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様では、sHASEGPは、コンドロイチナーゼ等の1つ又は複数の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0363】

活性成分は、例えばコアセルベーション技術によって、又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース、又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）に、コロイド薬物送達系（例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）に、又はマクロエマルジョンに封入され得る。そのような技術

は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されている。

【0364】

徐放性製剤も調製され得る。徐放性調製物の適切な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは成形物品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。

【0365】

インビボ投与に使用される製剤は、一般に無菌である。滅菌は、例えば滅菌濾過膜による濾過によって容易に達成され得る。

【0366】

本発明の医薬組成物は、1つ又は複数の薬学的に許容され得る塩を含み得る。

【0367】

薬学的に許容され得る担体は、水性担体又は希釈剤を含む。本発明の医薬組成物に用いられ得る適切な水性担体の例としては、水、緩衝水及び生理食塩水が挙げられる。他の担体の例としては、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）及びそれらの適切な混合物、オリーブ油等の植物油、並びにオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルが挙げられる。多くの場合、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、又は塩化ナトリウムを組成物に含めることが望ましい。

【0368】

医薬組成物は、典型的には、製造及び貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は高薬物濃度に適した他の秩序構造物として製剤化することができる。

【0369】

一実施形態では、本発明の抗体は唯一の有効成分である。別の実施形態では、本発明の抗体は、1つ又は複数の追加の活性成分と組み合わせられる。あるいは、医薬組成物は、唯一の有効成分である本発明の抗体を含み、他の薬剤、薬物又はホルモンと組み合わせて（例えば、同時に、連続的に、又は別々に）患者に個別に投与され得る。

【0370】

担体又は他の材料の正確な性質は、投与経路、例えば経口、静脈内、皮膚又は皮下、経鼻、筋肉内及び腹腔内の経路に依存し得る。例えば、固体経口形態は、活性物質と共に、希釈剤、例えばラクトース、デキストロース、サッカロース、セルロース、コーンスターチ又はジャガイモデンプン；潤滑剤、例えばシリカ、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム若しくはステアリン酸カルシウム、及び／又はポリエチレングリコール；結合剤、例えば、デンプン、アラビアガム、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース又はポリビニルピロリドン；離解剤（disaggregating agent）、例えばデンプン、アルギン酸、アルギン酸塩又はデンプングリコール酸ナトリウム；発泡混合物；染料；甘味料；湿潤剤、例えばレシチン、ポリソルベート、ラウリル硫酸塩、並びに一般に、医薬製剤に使用される非毒性及び薬理学的に不活性な物質を含有し得る。そのような医薬調製物は、例えば、混合、造粒、打錠、糖衣又はフィルムコーティングプロセスによって公知の方法で製造することができる。

【0371】

経口製剤には、例えば、医薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等のような通常用いられる賦形剤が含まれる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤又は粉末の形態をとり、10%～95%、好ましくは25%～70%の活性成分を含有する。医薬組成物が凍結乾燥される場合、凍結乾燥材料は、投与前に再構成され得る（例えば、懸濁液）。再構成は、好ましくは緩衝液中で行われる。

【0372】

静脈内投与又は注入のための溶液は、担体として、例えば滅菌水を含んでもよく、又

10

20

30

40

50

は好ましくは滅菌水性等張食塩水の形態であってもよい。

【0373】

好ましくは、医薬組成物又は診断組成物は、本発明によるヒト化抗体を含む。

【0374】

治療有効量及び投与量の決定

本発明による抗体及び医薬組成物は、必要とされる治療有効量を特定するために患者に適切に投与され得る。任意の抗体について、治療有効量は、細胞培養アッセイ又は動物モデル、通常はげっ歯類、ウサギ、イヌ、ブタ又は霊長類のいずれかで最初に推定することができる。動物モデルを使用して、適切な濃度範囲及び投与経路を決定することもできる。次いで、そのような情報を使用して、ヒトにおける有用な投与量及び投与経路を決定することができる。

10

【0375】

ヒト対象に対する正確な治療有効量は、疾患状態の重症度、対象の一般的な健康状態、対象の年齢、体重及び性別、食事、投与の時間及び頻度、薬物の組合せ（複数可）、反応感受性及び治療に対する耐性／応答に依存するであろう。組成物は、用量当たり所定量の本開示の活性剤を含有する単位用量形態で好都合に提供され得る。本明細書中に記載される実施形態のいずれかのための用量範囲及びレジメンは、1 mg ~ 1000 mg 単位用量の範囲の用量が含まれるが、これらに限定されない。

【0376】

本発明の抗体又は医薬組成物の適切な投与量は、当業者によって決定され得る。本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性でなく、特定の患者、組成物、及び投与様式に対して所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分の量を得るように変化し得る。選択される投与量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、用いられる特定の化合物の排泄速度、治療の期間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物及び／又は材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康状態及び以前の病歴、並びに医学分野で周知の同様の因子を含む様々な薬物動態学的因子に依存する。

20

【0377】

適切な用量は、例えば、治療される患者の約0.01 µg / kg ~ 約1000 mg / kg 体重、典型的には約0.1 µg / kg ~ 約100 mg / kg 体重の範囲であり得る。

30

【0378】

投与レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整され得る。例えば、単回用量を投与してもよく、いくつかの分割用量を経時的に投与してもよく、又は治療状況の緊急性によって示されるように用量を比例的に減少又は増加させてもよい。本明細書で使用される場合、投与単位形態は、治療される対象に対する単位投与量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要とされる医薬担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された所定量の活性化合物を含有する。

【0379】

医薬組成物又は製剤の投与

本明細書中に記載される抗体又はその製剤若しくは組成物は、予防的処置及び／又は治療的処置のために投与され得る。

40

【0380】

本発明の抗体又は医薬組成物は、当技術分野で公知の様々な方法のうち1つ又は複数を使用して、1つ又は複数の投与経路を介して投与され得る。当業者には理解されるように、投与経路及び／又は投与様式は、所望の結果に応じて変化する。本発明の抗体又は医薬組成物の投与経路の例としては、例えば注射又は注入による、静脈内、筋肉内、皮内、眼内、腹腔内、皮下、脊髄又は他の非経口投与経路が挙げられる。あるいは、本発明の抗体又は医薬組成物は、局所、表皮又は粘膜投与経路等の非経口経路を介して投与され得る。本発明の抗体又は医薬組成物は、経口投与用であり得る。

【0381】

50

投与に適した形態としては、例えば注射又は注入による、例えばボーラス注射又は持続注入による、静脈内、吸入可能又は皮下形態での非経口投与に適した形態が挙げられる。製品が注射又は注入用である場合、それは油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又はエマルジョンの形態をとることができ、懸濁剤、防腐剤、安定剤及び／又は分散剤等の追加の薬剤を含有することができる。あるいは、本発明による抗体又はその抗原結合フラグメントは、使用前に適切な滅菌液で再構成するための乾燥形態であってもよい。注射前の液体ビヒクル中への溶解又は液体ビヒクル中への懸濁に適した固体形態も調製することができる。

【0382】

製剤化されると、本発明の医薬組成物は対象に直接投与され得る。したがって、医薬品を製造するための本発明による抗体又はその抗原結合フラグメントの使用が本明細書で提供される。

10

【0383】

製品及びキット

本開示はまた、本発明の抗TREM1抗体と、使用説明書と、を含むキットを提供する。キットは、1つ又は複数の追加の試薬、例えば上で検討される追加の治療薬又は予防薬を更に含み得る。

【0384】

本発明は、医薬品を製造するための本発明による抗体又はその医薬組成物の使用を提供する。

20

【0385】

本発明はまた、本明細書中に記載されるような障害又は状態を治療するための医薬品を製造するための本発明の抗体の使用を提供する。

【0386】

特定の実施形態では、製造品又はキットは、本発明の1つ又は複数の抗体又は本明細書に記載される組成物を含有する容器を含む。特定の実施形態では、製造品又はキットは、本明細書に記載の1つ（又は複数）の抗体をコードする核酸（複数可）又は組成物を含有する容器を含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の抗体を産生する細胞又は細胞株を含む。

【0387】

特定の実施形態では、製品又はキットは、容器と、容器上の又は容器に関連するラベル又は添付文書とを含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグ等が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は、それ自体で、又は治療、予防及び／又は診断に有効な別の組成物と組み合わせて組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有してもよい。組成物中の少なくとも1つの薬剤は、本発明の抗体である。ラベル又は添付文書は、組成物が本明細書に記載の障害又は状態の治療に使用されることを示す。

30

【0388】

上記の実施形態は本発明を限定するものではなく例示するものであり、当業者は特許請求の範囲から逸脱することなく多くの代替実施形態を設計することができることに留意されたい。特許請求の範囲において、括弧の間に置かれたいかなる参照符号も、特許請求の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

40

【0389】

本発明に含まれる配列を表6及び7に示す：

【0390】

表6. TREM1の配列

50

【表 6】

名称	配列	配列 番号
ヒトTREM1 アイソフォーム1 (受託番号 NP_061113.1) SwissProt:Q9NP99	MRKTRLWGGLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDDVKCDYTLKFA ASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLL RVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSN ENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINL TNVTDIIRVPVFENIVILLAGGFLSKSLVFSVLFVAVTLRSFVP	1
ヒトTREM1 アイソフォーム1 (21~234) シグナルペプチドなし	ATKLTEEKYELKEGQTLDDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLA CTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIY QPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSNENSTQNVYKIPPTTTKALC LYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINLTNVTDIIRVPVFENIVILLAG GFLSKSLVFSVLFVAVTLRSFVP	2
ヒトTREM1 アイソフォーム2 (受託番号 NP_001229518.1)	MRKTRLWGGLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDDVKCDYTLKFA ASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLL RVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSN ENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINL TNVTDIIRYSFQVPGPLVWTLSPFLFPSLCAERM	3
ヒトTREM1 アイソフォーム3 (受託番号 NP_001229519)	MRKTRLWGGLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDDVKCDYTLKFA ASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLL RVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFRCTLSF SWLVDS	4
カニクイザルTREM1 タンパク質 (XP_001082517)	MRKTRLWGGLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDDVKCDYALEKY ANSRKAWQKMEGKMPKILAKTERPSENSHPVQVGRIILEDYPDHGLLQ VQMTNLQVEDSGLYQCVIYQHPKESHVLFNPICLVVTKGSSGTPGSSE NSTQNVYRTPSTTAKALGPRYTSPRTVTQAPPESTVVVSTPGSEINLT NVTDIIRVPVFENIVIIVAGGFLSKSLVFSVLFVAVTLRSFGP	5
PGLYRP1 (NP_005082.1)	MSRRSMLLAWALPSLLRLGAAQETEDPACCSPIVPRNEWKALASECAQ HLSLPLRYVVVSHTAGSSCNTPASCQQQARNVQHYHMKTLGWCDVGYN FLIGEDGLVYEGRGWNFTGAHSGHLWNPMSIGISFMGNMYMDRVPTPQA IRAAQGLLACGVAQAGALRSNYVLKGRDVGQRTLSPGNQLYHLIQNWPH YRSP	6
CID101904 hTREM1 1-200-Avi- Tev-HKH	MRKTRLWGGLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDDVKCDYTLKFA ASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLL RVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSGTPGSN ENSTQNVYKIPPTTTKALCPLYTSPRTVTQAPPKSTADVSTPDSEINL TNVTDIIRLEGGGSGGSGGLNDIFEAQKIEWHENLYFQGGSHHHHHHK AKGSKGKGSKKAGHHHHHHHHHH	7
CID101953 cTREM1 1-201-Avi- Tev-HKH	MRKTRLWGGLWMLFVSELRAATKLTEEKYELKEGQTLDDVKCDYALEKY ANSRKAWQKMEGKMPKILAKTERPSENSHPVQVGRIILEDYPDHGLLQ VRMTNLQVEDSGLYQCVIYQHPKESHVLFNPICLVVTKGSSGTPGSSE NSTQNVYRTPSTTAKALGPRYTSPRTVTQAPPESTVVVSTPGSEINLT NVTDIIRVPLEGGGSGGSGGLNDIFEAQKIEWHENLYFQGGSHHHHHHK KAKGSKGKGSKKAGHHHHHHHHHH	8
CID101907 hTREM1 IgV (His-Smt- TREM1 21-139)	MGHHHHHSGEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLME AFAKRQKGEMDSLRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIEAHREQIGG ATKLTEEKYELKEGQTLDDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLA CTERPSKNSHPVQVGRIILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIY QPPKEPHMLFDRIRLVVTKGFSG	9
CID101951 hPGLYRP1 1-196-His	MSRRSMLLAWALPSLLRLGAAQETEDPACCSPIVPRNEWKALASECAQ HLSLPLRYVVVSHTAGSSCNTPASCQQQARNVQHYHMKTLGWCDVGYN FLIGEDGLVYEGRGWNFTGAHSGHLWNPMSIGISFMGNMYMDRVPTPQA IRAAQGLLACGVAQAGALRSNYVLKGRDVGQRTLSPGNQLYHLIQNWPH YRSPHHHHHH	10

10

20

30

40

【0391】

表 7. 12172 抗体及び関連変異体の配列

【表 7 - 1】

名称	配列	配列 番号
CDRL1	QASQNIGSDLA	11
CDRL2	KAATLAS	12
CDRL3	QYYYGSAGADTD	13
CDRH1	GFSLSSYAMT	14
CDRH2	IIYAGGSPSYASWAKG	15
CDRH3	GTGDTVYTYFNI	16
ウサギAb 12172 VL領域	AVVLTQTASPVSAFVGTVTIKQASQNIGSDLAWYQQEFGQPPKLLI YKAATLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISGVQCEDGATYYCQYYYGSA GADTDTFGGGTEVVVK	17
ウサギAb 12172 VL領域	gccgtcgtgctgacccagactgcatecccccggtgtctgcacctgtggga ggcacagtcaccatcaagtgccaggccagtcagaacattggttagcgac ttagcctggtatcagcaggaaccagggcagccaccaagctcctgac tacaaggcagccactctggcatctgggtgccatcgcggttcaaaggc agtggatctgggacagagtctcactctcaccatcagtgccgtgcagtg gaagatggtgccacttactactgtcaacagtattattatggtagtgt ggtgctgatacggatacttctggcgaggagaccgagtggtggtcaaa	18
CID102770:ウサギ Ab 12172軽鎖(Fab)	AVVLTQTASPVSAFVGTVTIKQASQNIGSDLAWYQQEFGQPPKLLI YKAATLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISGVQCEDGATYYCQYYYGSA GADTDTFGGGTEVVVKRTPVAPTFLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKY FPDVTVTWEVDGTTQTGTGIENTSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYNS HKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC	19
ウサギAb 12172軽鎖	gccgtcgtgctgacccagactgcatecccccggtgtctgcacctgtggga ggcacagtcaccatcaagtgccaggccagtcagaacattggttagcgac ttagcctggtatcagcaggaaccagggcagccaccaagctcctgac tacaaggcagccactctggcatctgggtgccatcgcggttcaaaggc agtggatctgggacagagtctcactctcaccatcagtgccgtgcagtg gaagatggtgccacttactactgtcaacagtattattatggtagtgt ggtgctgatacggatacttctggcgaggagaccgagtggtggtcaaa cgtacgccagttgcacctactgtctcatcttccaccagctgctgat caggtggcaactggaacagtcaccatcgtgtgtgtggcgaataaatac tttcccgatgtcaccgtcacctgggaggtggatggcaccacccaaaca actggcatcgagaacagtaaaacaccgcagaattctgcagattgtacc tacaacctcagcagcactctgacactgaccagcacacagtacaacagc caciaagagtacacctgcaaggtgaccagggcacgacctcagtcgtc cagagcttcaataggggtgactgt	20

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

ウサギAb 12172 VH 領域	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWIG IIYAGGSPSYASWAKGRFTISKSTSTTVDLKMTSPTTEDTATYFCARGT GDTVYTYFNIWGPGLTVTVSS	21
ウサギAb 12172 VH 領域	cagtcgctggaggagtcggtgggtcgctggtcacgcctgggacaccc ctgacactcacctgcacagcctctggtattctccctcagtagctatgca atgacctgggtccgccaggctccagggaagggctggaatggatcgga atcatttatgctggtggttagcccatcctacgcgagctgggcgaaaggc cgattcaccatctccaaaacctcgaccacggtggatctgaaaatgacc agtccgacaaccgaggacacggccacctatttctgtgccagagggact ggtgatactgtttatacctactttaataatttggggcccaggcacccctg gtcacctgtctcgagt	22
CID120769:ウサギ Ab 12172重鎖 (Fab)	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWIG IIYAGGSPSYASWAKGRFTISKSTSTTVDLKMTSPTTEDTATYFCARGT GDTVYTYFNIWGPGLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPTSSTVTLGC LVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVTRFSPVRQSSGLYSLSVSVTS QPVTCNVAHPATNTKVDTKTVAPSTCSKP	23
ウサギAb 12172重鎖 (Fab)	cagtcgctggaggagtcggtgggtcgctggtcacgcctgggacaccc ctgacactcacctgcacagcctctggtattctccctcagtagctatgca atgacctgggtccgccaggctccagggaagggctggaatggatcgga atcatttatgctggtggttagcccatcctacgcgagctgggcgaaaggc cgattcaccatctccaaaacctcgaccacggtggatctgaaaatgacc agtccgacaaccgaggacacggccacctatttctgtgccagagggact ggtgatactgtttatacctactttaataatttggggcccaggcacccctg gtcacctgtctcgagtgggcaacctaaaggctccatcagtcctccactg gccccctgtgctgggggacacacccagctccacggtgacctgggtgc ctggtcaaaaggctacctcccgagcgagtgacggtgacctggaactcg ggcaccctcaccatggggtacgcaccttcccgctccgctccgagctcc tcaggcctctactcgctgagcagcgtggtgagcgtgacctcaagcagc cagccgctcacctgcaacgtggcccacccagccaccaacaccaaagtg gacaagaccgttgcgccctcgacatgcagcaagccc	24
12172gL1 V領域	AVVLTQSPSFLSASVGRVTTTCQASQNIQSDLAWYQQKPKGKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYYS GADTDTFGGGTKVEIK	25
12172gL1 V領域	gcctggtgctgactcagtcacccctccttctgagcgctcagtgga gatcgctgacctcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaacgcggaagctgctgac tacaaggccgctactctcgctcggtgagtgccatcccggttttcgggt tcgggaagcgggacggagttcacccctaccatttctcgtccaaacg gaggacttcgcacgtactactgccagcagtaactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcgaggacccaaggctcgaatcaag	26
12172gL1軽鎖	AVVLTQSPSFLSASVGRVTTTCQASQNIQSDLAWYQQKPKGKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYYS GADTDTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	27
12172gL1軽鎖	gcctggtgctgactcagtcacccctccttctgagcgctcagtgga gatcgctgacctcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaacgcggaagctgctgac tacaaggccgctactctcgctcggtgagtgccatcccggttttcgggt tcgggaagcgggacggagttcacccctaccatttctcgtccaaacg gaggacttcgcacgtactactgccagcagtaactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcgaggacccaaggctcgaatcaag cgtagcgttagcgccccatctgtcttcattctcccgccatctgatgag cagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttc tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa tcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacgaaggacagc acctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaacgagactacgag aaacacaaagtctacgctgcgaagtacccatcagggcctgagctcg cccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg	28
12172gL2 V-領域	DIQLTQSPSFLSASVGRVTTTCQASQNIQSDLAWYQQKPKGKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYYS GADTDTFGGGTKVEIK	29

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

12172gL2 V-領域	gacatccagctgactcagtcceccctccttctcctgagcgccctcagtgga gatcgctgacctcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaagcgccgaagctgctgac tacaaggccgctactctcgctcgaggagtccatcccggttttccggt tcgggaagcgggaccgagttcaccttaccatttctcgtccaaaccg gaggacttcgccacgtactactgccagcagtaactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcggaggcaccgaagtcgaaatcaag	30
12172gL2軽鎖	DIQLTQSPSFLSASVGDRTTTCQASQNIQSDLAQYQKPKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQYYGSA GADTDTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREKQVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	31
12172gL2軽鎖	gacatccagctgactcagtcceccctccttctcctgagcgccctcagtgga gatcgctgacctcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaagcgccgaagctgctgac tacaaggccgctactctcgctcgaggagtccatcccggttttccggt tcgggaagcgggaccgagttcaccttaccatttctcgtccaaaccg gaggacttcgccacgtactactgccagcagtaactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcggaggcaccgaagtcgaaatcaag cgtaacgtggcgctccctcctgttcatcttcccaccctccgacgag cagctgaagtcggcaccgctcctcgtcgtgtgctgctgaacaacttc taccctcgcgaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgacctgcag tccggcaactccagggaatecgtcacgagcaggactccaaggacagc acctactccctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgag aagcacaaggtgtacgctgcgaagtgaaccaccagggtcgtccagc cccgtagccaagtccttcaaccggggcgagtgc	32
12172gL6 V領域	DIVLTQSPSFLSASVGDRTTTCQASQNIQSDLAQYQKPKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQYYGSA GADTDTFGGGTKVEIK	33
12172gL6 V領域	gacatcgctgactcagtcceccctccttctcctgagcgccctcagtgga gatcgctgacctcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaagcgccgaagctgctgac tacaaggccgctactctcgctcgaggagtccatcccggttttccggt tcgggaagcgggaccgagttcaccttaccatttctcgtccaaaccg gaggacttcgccacgtactactgccagcagtaactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcggaggcaccgaagtcgaaatcaag	34
12172gL6軽鎖	DIVLTQSPSFLSASVGDRTTTCQASQNIQSDLAQYQKPKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQYYGSA GADTDTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREKQVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC	35
12172gL6軽鎖	gacatcgctgactcagtcceccctccttctcctgagcgccctcagtgga gatcgctgacctcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaagcgccgaagctgctgac tacaaggccgctactctcgctcgaggagtccatcccggttttccggt tcgggaagcgggaccgagttcaccttaccatttctcgtccaaaccg gaggacttcgccacgtactactgccagcagtaactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcggaggcaccgaagtcgaaatcaag cgtaacgtggcgctccctcctgttcatcttcccaccctccgacgag cagctgaagtcggcaccgctcctcgtcgtgtgctgctgaacaacttc taccctcgcgaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgacctgcag tccggcaactccagggaatecgtcacgagcaggactccaaggacagc acctactccctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgag aagcacaaggtgtacgctgcgaagtgaaccaccagggtcgtccagc cccgtagccaagtccttcaaccggggcgagtgc	36
12172gL9 V領域	DIQLTQSPSFLSASVGDRTTTCQASQNIQSDLAQYQKPKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQYYGSA GADTDTFGGGTKVEIK	37
12172gL9 V領域	gacatccagctgactcagtcceccctccttctcctgagcgccctcagtgga gatagctgacctcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaagcgccgaagctgctgac tacaaggccgctactctcgctcgaggagtccatcccggttttccggt	38

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

	tcgggaagcgggaccgagttcacccctaccatttcctcgctccaaccg gaggacttcgccacgtactactgccagcagtagtactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcggaggcaccgaagtcgaaatcaag	
12172gL9 軽鎖	DIQLTQSPSFLSASVGDSTVITTCQASQNIIGSLAWYQQKPGKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYYYGSA GADTDTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	39
12172gL9 軽鎖	gacatccagctgactcagtcacccctccttcctgagcgcctcagtgga gatagcgtgaccatcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaagcgccgaagctgctgac tacaagccgctactctcgctcgaggagtgccatcccggttttcgggt tcgggaagcgggaccgagttcacccctaccatttcctcgctccaaccg gaggacttcgccacgtactactgccagcagtagtactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcggaggcaccgaagtcgaaatcaag cgtacggtagcggccccatctgtcttcctcctcccgccatctgatgag cagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttc tatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaa tcgggtaactcccaggagagtgteacagagcaggacagcaaggacagc acctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgag aaacacaaagtctacgctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcg cccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt	40
12172gL11 V領域	DIQLTQSPSFLSASVGDSTVITTCQASQNIIGSLAWYQQKPGKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYYYGSA GADTDTFGGGTKVEIK	41
12172gL11 V領域	gacatccagctgactcagtcacccctccttcctgagcgcctcagtgga gatcgctgaccatcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaagcgccgaagctgctgac tacagcgcgctactctcgctcgaggagtgccatcccggttttcgggt tcgggaagcgggaccgagttcacccctaccatttcctcgctccaaccg gaggacttcgccacgtactactgccagcagtagtactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcggaggcaccgaagtcgaaatcaag	42
12172gL11 軽鎖	DIQLTQSPSFLSASVGDSTVITTCQASQNIIGSLAWYQQKPGKAPKLLI YKAATLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYYYGSA GADTDTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	43
12172gL11 軽鎖	gacatccagctgactcagtcacccctccttcctgagcgcctcagtgga gatcgctgaccatcacctgtcaagccagccagaacattgggtccgac ttggcctggtatcagcagaagcctggcaaagcgccgaagctgctgac tacagcgcgctactctcgctcgaggagtgccatcccggttttcgggt tcgggaagcgggaccgagttcacccctaccatttcctcgctccaaccg gaggacttcgccacgtactactgccagcagtagtactactacggttcagcc ggagcagacactgataccttcggcggaggcaccgaagtcgaaatcaag cgtacggtagcggccccatctgtcttcctcctcccgccatctgatgag cagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttc tatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaa tcgggtaactcccaggagagtgteacagagcaggacagcaaggacagc acctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgag aaacacaaagtctacgctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcg cccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt	44
12172gH1 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIITYAGGSFSYASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGTLVTVSS	45
12172gH1 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgcacccgagcgggttctcgctttcctcctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaagggcctcgaatggatt ggcattatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcacatctcgaaggactcctccaagaacacgggtgacttg caaatgaactcactgagggcggaggacactcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaacttaacatctggggccag ggaacctggtcactgtctcgagc	46

10

20

30

40

【表 7 - 5】

12172gH1重鎖 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKFREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	47
12172gH1重鎖 (IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcacccagcgggttctcgtcttctcctctac gcatatgacctgggtcagacagcagcgggaagggcctcgaatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggcggttaccatctcgaaggactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctgggtcactgtctcgagcgttctacaaaggcccatcgtc tccccctggcgccctgctccaggagcactccgagagcacagccgccc ctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg tggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtc ctcattgtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacggtgcc tccagcagcttgggcacgaagacctaactgcaacgtagatcacaag cccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcacaaataggtccc ccatgcccccatgccagcactgagttcctggggggaccatcagtc tctcgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcacgtgcgtgggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtagcgtgatggcgtggaggtgcataatgccaa acaaagccggggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggaactggctgaacggcaaggagtaaa tgcaaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacccctgcc ccatccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaat gggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccggtgctggactcc gacggctccttctctctacagcaggttaaccgtggacaagagcagg tggcaggagggaatgtcttctcatgctcgtgatgcaggtgctctg cacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctctgggtaaa	48
12172gH2 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYYAMTWVRQAPGKGLEWV GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLTVTVSS	49
12172gH2 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggttctcgtcttctcctctac gcatatgacctgggtcagacagcagcgggaagggcctcgaatgggtc ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggcggttaccatctcgaaggactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctgggtcactgtctcgagc	50
12172gH2重鎖 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYYAMTWVRQAPGKGLEWV GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKFREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	51
12172gH2重鎖 (IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggttctcgtcttctcctctac gcatatgacctgggtcagacagcagcgggaagggcctcgaatgggtc ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggcggttaccatctcgaaggactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctgggtcactgtctcgagc	52

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

	ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggggttcaccatctcgaaggactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaaccttggtcactgtctcgagcgcttctacaaagggcccatccgtc ttccccctggcgccctgctccaggagcactccgagagcacagccgcc ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg tggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggtgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcggtgtgacggtgcc tccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag cccagcaacaccaagggtggacaagagagttgagtcctaaataggtccc ccatgcccccatgcccagcactgagttcctggggggaccatcagtc ttcctgttcccccaaaaaccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcactgctggtggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtccggttcaactggtacgtggtggtggaggtgcataatgccaaag acaaagccggggaggagcagttcaacagcagctacggtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggaactggtgacggcgaaggagtacaag tgcaaggcttccaacaaaggcctccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaaggcgagcccgagagccacaggtgtacacccctgcc ccatcccgaggagatgaccaagaacagggtcagcctgacctgcctg gtcaaaaggcttctaccccgagacatcgccgtggagtgaggagcaat gggcagccggagaacaactacaagaccagcctccgctgctggactcc gacggctccttctctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagg tggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatcatgaggtctg cacaaccactacacacagaagacctctcctgtctctgggtaaa	
12172gH4 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISRDSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLTVTVSS	53
12172gH4 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgcaccgccagcggttctcgtcttctcctac gacctgacctgggtcagacagcccggaaggccctcgatggtt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcaccatctcgcgcgactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaaccttggtcactgtctcgagc	54
12172gH4重鎖 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISRDSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV SSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPAEFLGGPSV FLFPPPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLK	55
12172gH4重鎖 (IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgcaccgccagcggttctcgtcttctcctac gacctgacctgggtcagacagcccggaaggccctcgatggtt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcaccatctcgcgcgactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaaccttggtcactgtctcgagcgcttctacaaagggcccatccgtc ttccccctggcgccctgctccaggagcactccgagagcacagccgcc ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg tggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggtgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcggtgtgacggtgcc tccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag cccagcaacaccaagggtggacaagagagttgagtcctaaataggtccc ccatgcccccatgcccagcactgagttcctggggggaccatcagtc ttcctgttcccccaaaaaccaaggacactctcatgatctcccgacc	56

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

	cctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtagctggatggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgccc ccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat gggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgctgctggactcc gacggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagg tggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctg cacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctctgggtaaa	
12172gH6 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCA RGTDVYTYFNIWGQGITLVTVSS	57
12172gH6 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcaccgccagcgggttctcgcttctcctctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaaaggcctcgaatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ssslgTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	58
12172gH6重鎖 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCA RGTDVYTYFNIWGQGITLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	59
12172gH6重鎖 (IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcaccgccagcgggttctcgcttctcctctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaaaggcctcgaatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa gggcgggttcacatctcgaaggactcctccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacactcttaacatctggggccag ggaaacctgggtcactgtctcgagcgcttctacaaagggcccatccgtc ttcccccctggcgccctgctccaggagcactccgagagcacagccgcc ctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctg tggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacgtgccc tccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaaag cccagcaacaccaagggtggacaagagagttgagtcctaaataggtccc ccatgcccaccatgcccagcacctgagttcctggggggaacatcagtc ttcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctccggacc cctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtagctggatggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgccc ccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat gggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgctgctggactcc gacggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagg tggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctg cacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctctgggtaaa	60

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

12172gH6重鎖 (IgG4P F234A L235A)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYYAMTWVRQAPGKGLEWIGIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGDTVYTYFNIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPFPCCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSLGK	61
12172gH6重鎖 (IgG4P F234A L235A)	gaagtgcagctcgtggagtcggggcggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcaccgccagcgggtctcgtcttctcctcctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaagggtcctgaatggatt ggcatctatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggtctaaa gggcggttcaccatctcgaaggactcctccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacactcttaacatctggggccag ggaaccctggtcactgtctcgagcgtctctacaaaggcccatccgtc ttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgcc ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg tggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccc tccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag ccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcctaatatggtccc ctatgcccacatgcccagcacctgaagccgcgggggggacggtcagtc ttcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcacgtgcgtggtggtggagctgagccaggaaagaccccgag gtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaaag acaaagccgcggggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgagcggcgaaggagtaacaag tgcgaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgccc ccattcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaat gggcagccgggagaaacactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc gacggctccttcttctctacagcaggtcaacgtggacaagagcagg tggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa	62
12172gH6重鎖 (IgG1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYYAMTWVRQAPGKGLEWIGIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGDTVYTYFNIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	63
12172gH6重鎖 (IgG1)	gaagtgcagctcgtggagtcggggcggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcaccgccagcgggtctcgtcttctcctcctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaagggtcctgaatggatt ggcatctatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggtctaaa gggcggttcaccatctcgaaggactcctccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacactcttaacatctggggccag ggaaccctggtcactgtctcgagcgtctctacaaaggcccatccgtc ttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggcc ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg tggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccc tccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaag ccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttctgtgac	64

10

20

30

40

【表 7 - 9】

	aaaactcacacatgccacccgtgccagcacctgaactcctgggggga ccgtcagttcttctcttcccccaaaacccaaggacacccctcatgatc tcccggaacccctgaggtcacatgcgtgggtggagcgtgagccacgaa gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat aatgccaaagcaaaagccgaggagagcagtaacaagcagcgtaccgt gtggtcagcgtcctcacgcgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag gagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctccagcccccatcgag aaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac accctgcccccatccccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg acctgctcgtggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgg gagagcaatgggcagccggagaaacactacaagaccagcctcccggtg ctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacgcgtggac aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat gaggtctcgcaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccg ggtaaa	
12172gH6重鎖 (IgG1 L234A L235A)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMH EALHNNHYTQKSLSLSPGK	65
12172gH6重鎖 (IgG1 L234A L235A)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagccggagga agcctgcgcctgtcatgcaccgccagcgggtctcgccttctcctctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaagggcctcgaatggatt ggcatatatcatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggtctaaa gggcggttcacccatctcgaaggactcctccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaacccctggctcactgtctcgcagcgttctacaaagggccctccgtg tcccgctcgcctccatcatcgaagtctaccagcggaggcactgcggtc ctcggttgctcgtgaaggactacttcccgagccgggtgaccgtgtcg tggaaacagcggagccctgaccagcggggtgcacaccttccggccgtc ttgcagtcgaagcggccttactcctgtcatcagtggtgactgtcccg tcccgctcattgggaacccaaacctacatctgcaatgtgaatcacaaa cctagcaacaccaaggttgacaagaaagtcgagcccaaatcgtgtgac aagactcacacttgtccgcgtgcccggcaccggaagccgcaggaggt cccagcgtcttctgttccctccaaagccgaaagacacgctgatgatc tcccgcaaccccgagggtcacttgctggtcgtggagcgtgtcacatgag gacccagaggtgaagttcaattggtacgtggatggcgtcgaagtccac aatgccaaaactaagcccagagaagaacagtacaattcgacctaccgc gtcgtgtccgtgctcacggtgttgcatcaggattggctgaacgggaag gaatacaagtgcgaagtgtccaacaaggcgtgccggcaccgatcgag aaaactatctccaaagcgaaggacagcctagggaacctcaagtctac acgctgccaccatcacgggatgaactgactaagaatcaagtctcactg acttgtctggtgaaggggtttaccctagcgacattgcggtggagtgg gaatccaacggccagccagagaacaactacaagactaccctccagtgc ctgcactcggatggatcgttcttcttactcgaagctcacccgtggat aagtcgccgtggcagcagggaaaacgtgttctcctgctcgtgatgcat gaagccctccataaccactatacccaaaagtcgctgtcctgtcgccg ggaaag	66
12172gH8 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLVTVSS	67
12172gH8 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagccggagga agcctgcgcctgtcatgcgtgccagcgggtctcgccttctcctctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaagggcctcgaatggatt ggcatatatcatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggtctaaa gggcggttcacccatctcgaaggactcctccaagaacacggtgtacttg	68

10

20

30

40

【表 7 - 10】

	caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctgggtcactgtctcgagc	
12172gH8重鎖 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPFPCCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSLGK	69
12172gH8重鎖 (IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgcgctgccagcgggttctcgtcttctcctctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaggccctcgaatggatt ggcattatctatgcgggtggcagcccttctcagcctcctgggctaaa gggagggtcaccatctcgaaggactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctgggtcactgtctcgagcgttctcacaaggccatccgtc tccccctggcgccctgtccaggagcacctccgagagcacagccgcc ctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctg tggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtc ctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacggtgccc tcacagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaa cccagcaacaccaagggtggacaagagagttgagtcacaaataggtccc ccatgcccacatgcccagcacctgagttcctggggggacatcagtc ttcctgttcccccaaaaaccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcagctgcgtggtggtgagcgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgcaag acaaagcgcgggagagcagttcaacagcacgtacccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaacggcaaggagtacaag tggcaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacccctgccc ccatccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat ggcgagcgggagaaactacaagaccacgctcctccgtgctggactcc gacggctccttctcctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagg tggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctg cacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctctgggtaaa	70
12172gH9 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGGLTVTVSS	71
12172gH9 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgcgctgccagcgggttctcgtcttctcctctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaggccctcgaatggatt ggcattatctatgcgggtggcagcccttctcagcctcctgggctaaa gggagggtcaccatctcgcgcgacaattccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctgggtcactgtctcgagc	72
12172gH9重鎖 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPFPCCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSLGK	73

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

12172gH9重鎖(IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggttctcgcttctcctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaaggcctcgaatggatt ggcattatctatcggggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggcggttcaccatctcgcgcgacaattccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaacctgtgactgtctcgagcgcttctacaaaggcccatccgtc ttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgcc ctgggctgctggtaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtcg tggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggtgtc ctacagtcctcaggactctactcctcagcagcggtgacggtgccc tccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag ccagcaacaccaagggtggacaagaggttgagtcacaatatggtccc ccatgccaccatgccagcacctgagttcctggggggaccatcagtc ttcctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctccggacc cctgaggtcacgtgcgtgggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtcaggttcaactggtacgtggatggcggtggaggtgcataatgccaa gaaagccggggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacgggcaaggagtacaag tgcaagggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaagccaaaggcgagcccgagagccaaggtgtacacctgccc ccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg gtcaaggtcttctacccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaat ggcgagccgggagaacaaactacaagaccgacctccgtgctggactcc gacggtccttcttctctacagcaggtacacctgggacaagagcagg tgccaggaggggaatgtcttctcatgctcctgtagcatgaggtctg cacaaccactacacacagaagacccctcctcctgtctctgggtaaa	74
12172gH10 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKLEWI GIITYAGGSFSYASWAKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLVTVSS	75
12172gH10 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggttctcgcttctcctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaaggcctcgaatggatt ggcattatctatcggggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggcggttcaccatctcgcgcgactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaacctgtgactgtctcgagc	76
12172gH10重鎖(IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKLEWI GIITYAGGSFSYASWAKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPCCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSMHEAL HNHYTQKSLSLGLK	77
12172gH10重鎖(IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggttctcgcttctcctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaaggcctcgaatggatt ggcattatctatcggggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggcggttcaccatctcgcgcgactcctccaagaacacggtgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaacctgtgactgtctcgagcgcttctacaaaggcccatccgtc ttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgcc ctgggctgctggtaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtcg tggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggtgtc ctacagtcctcaggactctactcctcagcagcggtgacggtgccc tccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag	78

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

	ccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcctcaaatatggtccc ccatgcccaccatgcccagcacctgagttcctggggggaccatcagtc ttcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaa acaaagccgaggagagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacccctgcc ccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg gtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaat gggcagccggagacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactcc gacggctccttctctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagg tggaaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcataggctctg cacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa	
12172gH11V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGQTLVTVSS	79
12172gH11V領域	gaagtgcagctcgtggagtcggcgagggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgctgctgccagcgggttctcgttttctcctac gccatgacctgggtcagacagggcacccggaaagggcctcgaatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcaccatctcgaaggacaattccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcgggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctggctcactgtctcgagc	80
12172gH11重鎖(IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV SSSLGTQTYTCNVDPKPKNTKVDKRVESKYGPCCPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQNWYVDGVEVHNAK TKPREQFNSTYRVVSVLTVHQDLNKGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	81
12172gH11重鎖(IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcggcgagggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgctgctgccagcgggttctcgttttctcctac gccatgacctgggtcagacagggcacccggaaagggcctcgaatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcaccatctcgaaggacaattccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcgggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctggctcactgtctcgagcgttctacaaagggccctcctgt ttcctcttggtcccttgctcccggtccacctccgaggtctaccgcgct ctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgagcccggtgacagtgtcc tggaactctggcgccctgacctccggcgtgcacaccttccctgacctg ctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacctgccc tctccagcctgggacccaagacctacacctgttaacgtggaccacaag ccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatctaagtaacggccct cctgccccccctgcccctgcccctgaatttctggcggaaccttccgtg ttcctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctcccgacc ccgaagtgcactgctggtggtggacgtgtccaggaagatcccgag gtccagttcaattgtacgtggacggcgtggaaagtgcacaatgccaag accaagcccagagagggaacagttcaactcacctacccgggtggtgtcc gtgctgacctgctgcaccaggactggtgacggcaagagtagacaag tgcaaggtgtccaacaaaggcctgcctccagcatcgaaaagaccatc tccaaggccaagggccagcccccgagccccaggtgtacacctgccc cctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctg gtcaagggttctacccctccgacattgacctggaatggaggtccaac ggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagc gacggctccttcttctgtactctcggtgacctggacaagtcccg	82

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 3】

	tgccaggaagcgaactctctctctgctccgtgatgcacgagccctg cacaaccactacaccagaagtcctctgctccctgagcctgggcaag	
12172gH11重鎖 (IgG4P F234A L235A)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	83
12172gH11重鎖 (IgG4P F234A L235A)	gaagtgcagctcgtggagtcggggcggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggttctcgtcttctcctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaaggcctcgaatggatt ggcattatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcaccatctcgaaggacaattccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactcgggtgtactactgtgcc cggggaaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaaccctgggtcactgtctcagcgccttctacaaaggcccatccgtc ttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgcc ctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctg tggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccgctgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacgtgccc tccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag ccagcaacaccaaaggtggacaagagagttgagtcacaatatgggtccc ccatgcccaccatgccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtc ttcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcacgtgcgtgggtggtagcgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcacctcctcgcaccagcagcgtggtgacggcaaggagtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaaggcagcccgagagccacaggtgtacacctgccc ccatccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg gtcaaaaggcttctaccccgagcagatcgccgtggagtgaggagcaat gggcagccggagaaactacaagaccagcctcccgctgctggactcc gacggctccttctcctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagg tggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcagtgaggctctg cacaaccactacacacagaagagcctctcctctgctctgggtaaa	84
12172gH11重鎖 (IgG1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	85
12172gH11重鎖 (IgG1)	gaagtgcagctcgtggagtcggggcggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggttctcgtcttctcctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaaggcctcgaatggatt ggcattatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcaccatctcgaaggacaattccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactcgggtgtactactgtgcc cggggaaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaaccctgggtcactgtctcagcgccttctacaaaggcccatccgtc ttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggcc ctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctg tggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccgctgtc ctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacccgtgccc	86

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 4】

	tcacagcagcttggggcaccagacctaactctgcaacgtgaatcacaaagccacgcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttggtgacaaaactcacacatgccacogtgcccagcacctgaactcctggggggaacgtcagtccttctcttcccccaaaaaccaaggacacccctcatgatoctccggacccctgaggtcacatgcgtgggtggagctgagccacgaaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccggggaggagcagtagacaacagcagtagcgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggaactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaaggtgtacacctgcccccatcccggtatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgtaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggagagcaatgggcagccggagaaacaactacaagaccagcctcccgtgssslgtctcgacggctccttcttctctacagcaagctcacogtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggttaaa	
12172gH11重鎖 (IgG1 L234A L235A)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWIGIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGDTVYTYFNIWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPEAAGPVSFVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	87
12172gH11重鎖 (IgG1 L234A L235A)	gaagtgcagctcgtggagtcggggcggaggtctggtgcagcccgaggagaacctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggtctctcgtttctctctacgccatgacctgggtcagacaggaacccggaaagggcctcgaatggattggcattatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggtctaaagggcggttcacacatctcgaaggacaattccaagaacacgctgtactgcaaatgaactcactgagggccgaggacactgcgggtgtactactgtgcccggggaactggagatacogtgtacacctaactttaacatctggggccagggaacctgggtcactgtctcgagcgcttctacaaagggccccctccgtgttcccgctcgtctccatcatcgaagtctaccagcggaggcactgcggctctcggttgccctcgtgaaggactacttcccggagccggtgaccgtgtcgttgaacagcggagccctgaccagcgggtgcacaccttcccgccgtcttgagtcgaagcggccttactccctgtcatcagtggtgactgtcccgccagctcattgggaacccaaacctacatctgcaatgtgaatcacaaacctagcaacaccaaggttgacaagaaagtcagaccaaatcgtgtgacaagctcacactgttcggccgtgcccggcaccggaagccgcaggaggtcccagcgtcttctgttccctccaaagccgaagacacgctgatgactccccgacccccggaggtcactgcgtggctcgtggacgtgtcacatgaggacccagaggtgaagttcaattggtagctggatggcgtcgaagtcacaaatgccaaaactaagcccagagaagaacagtagacaattcgacctaccgcgtcgtgtccgtgctcacgggtgtgcatcaggattggctgaacgggaaggaatacaagtgcaaaagtgtccaacaaggcgtgcccggcaccgatcgagaaaactatctccaaagcgaaggacagccctagggaaacctcaagtcacacgtgccaccatcacgggatgaactgactaagaatcaagtctcactgactgtctggtgaaggggtttaccctagcgacattgcogtggagtgggaatccaacggccagcagagaacaactacaagactacccctccagtgctcgactcgatggatcgttcttcttactcgaagctcacogtggataagtcgggtggcagcagggaaacgtgttctcctgctcgggtgatgcatgaagccctccataaccactatacccaaaagtcgctgtccctgtcgcgggaaag	88
12172gH12 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWIGIIYAGGSPSYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGDTVYTYFNIWQGTLVTVSS	89
12172gH12 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcggggcggaggtctggtgcagcccgaggagaacctgcgcctgtcatgcgctgccagcgggtctcgtcttctctctacgccatgacctgggtcagacaggaacccggaaagggcctcgaatggatt	90

10

20

30

40

50

【表 7 - 15】

	ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgectcctgggctaaa gggcggttcaccatctcgcgcgacaattccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctggtcactgtctcgagc	
12172gH12重鎖 (IgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GI IYAGGSPSYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPFCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	91
12172gH12重鎖 (IgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgcgctgccagcgggttctcgtcttctcctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaggcctcgatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgectcctgggctaaa gggcggttcaccatctcgcgcgacaattccaagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctggtcactgtctcgagcgttctacaaaggcccatccgtc ttccccctggcgcctgtctcaggagcacctccgagagcagcggcc ctgggctgcctggcaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctg tggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtctg ctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacggtgcc tcacagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgttagatcacaag cccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcacaaataggtccc ccatgccaccatgccagcacctgagttcctggggggaccatcagtc ttcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtagctggatggcgtggaggtgcataatgccaa acaaagccgaggaggagcagttcaacagcagctaccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaggaagtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcc ccatccagaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg gtcaaaaggcttctaccccagcagacatcgccgtggagtgaggagcaat gggcagccggagaaactacaagaccacgctcccgtgctggactcc gacggctccttctcctctacagcaggttaaccgtggacaagagcagg tggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg cacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa	92
12172gH26 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GI IYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGTLVTVSS	93
12172gH26 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgctgtcatgcgctgccagcgggttctcgtcttctcctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaggcctcgatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgectcctgggctaaa gggcggttcaccatctcgaaggacaattccagcaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaactttaacatctggggccag ggaaccctggtcactgtctcgagc	94
12172gH26重鎖 (hIgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GI IYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPFCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN	95

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 6】

	GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSLGK	
12172gH26重鎖 (hIgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgtgccagcgggttctcgctttctcctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaaggcctcgaatggatt ggcattatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa gggagggttaccatctcgaaggacaattccagcaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggcaggagcactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaacttaacatctggggccag ggaaacctgggtcactgtctcgagcgttctacaaagggccatccgtc ttccccctggcgcctgtctcaggagcactccgagagcacagccgcc ctggggtgcctggtcaaggactacttccccgaacgggtgacggtgtcg tggaaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtc ctacgctcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacgctgcc tccagcagcttgggacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag ccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcacaaatattggtccc cctgcccaccatgccagcacctgagttcctggggggaccatcagtc ttcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaaagaccccgag gtccagttcaactgggtacgtggatggcgtggagggtgcataatgccaa acaaagccggcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgacggaaggaggtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctccgtcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaaggcagcccgagagccacaggtgtacacctgccc ccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctg gtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaat gggcagccggagaaactacaagaccagcctcccgctgctggaactcc gacggctccttctcctctacagcaggtcaacgtggacaagagcagg tggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcagaggtctgc cacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa	96
12172gH48 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKLEWI GIITYAGGSFSYASWAKGRFTISKDNSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGTLVTVSS	97
12172gH48 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgtgccagcgggttctcgctttctcctcctac gcatgacctgggtcagacaggcaccgggaaaggcctcgaatggatt ggcattatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa gggagggttaccatctcgaaggacaattccagaaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggcaggagcactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaacttaacatctggggccag ggaaacctgggtcactgtctcgagc	98
12172gH48重鎖 (hIgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKLEWI GIITYAGGSFSYASWAKGRFTISKDNSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLQDWLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSLGK	99
12172gH48重鎖 (hIgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcgggaggaggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgcgtgccagcgggttctcgctttctcctcctac gccatgacctgggtcagacaggcaccgggaaaggcctcgaatggatt ggcattatctatgcgggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa gggagggttaccatctcgaaggacaattccagaaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggcaggagcactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctaacttaacatctggggccag ggaaacctgggtcactgtctcgagcgttctacaaagggccatccgtc ttccccctggcgcctgtctcaggagcactccgagagcacagccgcc ctggggtgcctggtcaaggactacttccccgaacgggtgacggtgtcg tggaaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtc	100

10

20

30

40

50

【表 7 - 17】

	ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacggtgcc tcagcagccttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag cccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcacaaataggtccc ccatgcccccatgccagcacctgagttcctggggggaccatcagtc ttcctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaa acaaagccgaggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctcacgctcctgcaccaggaactggtgaacggcaaggagtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccc ccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg gtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaat gggcagccggagaacaactacaagaccagcctccgctgctggactcc gacggctccttctcctctacagcaggttaacgtggacaagagcagg tggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgagtcagtgaggtctg cacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa	
12172gH49 V領域	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQTLVTVSS	101
12172gH49 V領域	gaagtgcagctcgtggagtcggggcggagggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgctgctgccagcgggtctctcgctttctcctac gcatgacctgggtcagacaggcacccgggaaggccctcgaatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcaccatctcgaaggacaattccgagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaacctggtcactgtctcgagc	102
12172gH49重鎖 (hIgG4P)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMTWVRQAPGKGLEWI GIIYAGGSPSYASWAKGRFTISKDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGTGDTVYTYFNIWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVF SSSLGTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPFCPCPAPEFLGGPSV FLFPPPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLQDWLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQFENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	103
12172gH49重鎖 (hIgG4P)	gaagtgcagctcgtggagtcggggcggagggtctggtgcagcccgaggga agcctgcgcctgtcatgctgctgccagcgggtctctcgctttctcctac gcatgacctgggtcagacaggcacccgggaaggccctcgaatggatt ggcattatctatgcggtggcagcccttctacgcctcctgggctaaa ggggcggttcaccatctcgaaggacaattccgagaacacgctgtacttg caaatgaactcactgagggccgaggacactgcggtgtactactgtgcc cggggaactggagataccgtgtacacctactttaacatctggggccag ggaacctggtcactgtctcgagcgttctacaaaggcccatccgtc tccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgcc ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg tggaaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtc ctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacggtgcc tccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaag cccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcacaaataggtccc ccatgcccccatgccagcacctgagttcctggggggaccatcagtc ttcctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccgacc cctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccaggaagaccccgag gtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaa acaaagccgaggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc gtcctacccgtcctgcaccaggaactggtgaacggcaaggagtacaag tgcaaggtctccaacaaaggcctccgctcctccatcgagaaaaccatc tccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccc ccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg gtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaat	104

10

20

30

40

【表 7 - 1 8】

	gggcagccggagagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc gacggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagg tggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctg cacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa	
ヒトIGKV1-9 IGKJ4 受容体フレームワーク	DIQLTQSPSFLSASVGRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPKAPKLLI YAASLTQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPL TFGGGTKVEIK	105
ヒトIGKV1-9 IGKJ4 受容体フレームワーク	gacatccagttgaccagtcctccatccttctgtctgcatctgtagga gacagagtcaccatcacttgccgggcccagtcagggcattagcagttat ttagcctggtatcagcaaaaaccagggaagcccctaagctcctgatc tatgctgcatccactttgcaaagtgggggtcccatcaaggttcagcggc agtggatctgggacagaattcactctcacaatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcttaatagttaccctctc actttcggcggaggggaccaaggtggagatcaaa	106
ヒトIGHV3-66 IGHJ4 受容体フレームワーク	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYSWVRQAPGKLEWV SVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RYFDYWGQGTLLTVSS	107
ヒトIGHV3-66 IGHJ4 受容体フレームワーク	gaggtgcagctggtggagtcctgggggaggttgggtccagcctgggggg tccctgagactctctgtgcagcctctggattcaccgtcagtagcaac tacatgagctgggtccgcaggtccagggaaggggctggagtgggtc tcagttatttatagcgggtgtagcacatactacgcagactccgtgaag ggcagattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctt caaatgaacagcctgagagccgaggacacggtgtgtattactgtgcg agatactttgactactggggccaaggaaccctgggtcaccgtctcctca	108

10

20

【0392】

例

例 1：TREM1 タンパク質の作製

N末端ヘキサヒスチジンSUMO（小ユビキチン関連修飾因子）溶解度タグ（CID101907）と融合したヒトTREM1 IgV様ドメインを大腸菌（*Escherichia coli*）BL21（DE3）で発現させた。細菌を遠心分離によって回収し、100mMのTris pH8、300mMのNaCl、250Uベンゾナーゼ、1PIタブに再懸濁し、超音波処理によって溶解した。42,000RPM（Ti45）、4℃、45分での遠心分離によって溶解物を清澄化し、5mLのHiTrap Ni Chelating Columnに適用した。カラムを100mMのTris、pH8、300mMのNaClで5CV洗浄した。結合したTREM1タンパク質を、15CVの直線勾配2～60%100mMのTris、pH8、300mMのNaCl、500mMのイミダゾール緩衝液、次いで4CVの100%緩衝液Bで溶出した。TREM1を含有する画分をプールし、100mMのTris pH8、300mMのNaCl中で透析し（10kDa MWCO）、ULP-1で4℃で一晩消化した。切断したタンパク質を5mLのHiTrap Ni Chelating Columnに適用し、フロースルー画分を回収し、Vivaspin PES Turbo、10kDa MWCO濃縮器で濃縮した。次いで、superdex s75カラム（GE Healthcare）を使用して、切断されたIgVタンパク質を研磨し、100mM Tris pH8.0、300mMのNaCl、0.5mMのEDTAに緩衝液交換した。最終タンパク質濃度は、Nanodrop UV分光計で280nmの吸光度を測定することによって決定した。タンパク質純度をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によって評価した。

30

40

【0393】

天然のN末端シグナル配列並びにC末端アビジン親和性タグ（AVI）、TEVプロテアーゼ切断部位及びHKH親和性タグを含むヒト（CID101904）及びカニクイザル（CID101953）TREM1細胞外ドメイン（ECD）の両方を哺乳動物HEK細胞で発現させた。媒体をタンジェンシャルフロー濾過（TFF）に通し、HiTrap Ni Chelating 5mLカラムに適用し、100mM HEPES pH7.0、300mMのNaClで洗浄した。結合したTREM1タンパク質を、それぞれ2～

50

60%、次いで100%の100mMのHEPES pH7.0、300mMのNaCl、500mMのイミダゾール線形勾配で4CV溶出した。TREM1を含有する画分をプールし、Vivaspin PES Turbo、10kDa MWCO濃縮器で濃縮した。次いで、セファクリルS300カラムを使用して、タンパク質を研磨し、50mMのHEPES pH7.0、250mMのNaClに緩衝液交換した。最終タンパク質濃度及び純度を前述のように評価した。

【0394】

天然のN末端シグナル配列及び切断不可能なC末端hisタグ(CID101951)を含むヒトPGLYRP1を哺乳動物HEK細胞において発現させた。培地をHiTrap Ni Excel 2×5mLカラムに適用し、100mMのHEPES pH7.0、300mMのNaClで洗浄した。結合したPGLYRP1タンパク質を、それぞれ0~60%、次いで100%の100mMのHEPES pH7.0、300mMのNaCl、500mMのイミダゾール線形勾配で4CV溶出した。PGLYRP1を含有する画分をプールし、Vivaspin PES Turbo、10kDa MWCO濃縮器で濃縮した。次いで、superdex S200カラムを使用して、タンパク質を研磨し、PBS pH7.0に緩衝液交換した。最終タンパク質濃度及び純度を前述のように評価した。

10

【0395】

例2. 治療用抗TREM1抗体12172の作製及び選択

1匹の雌ニュージーランドホワイトウサギを、細胞表面上にヒトTREM1を一過性に発現する 3×10^7 個のウサギ線維芽細胞で皮下免疫した。細胞をエレクトロポレーションによってトランスフェクトし、TREM1の発現を、抗TREM1抗体(R&D FAB1278P)を使用したフローサイトメトリによって確認した。細胞による免疫と同時に、等量の完全フロイントアジュバントをウサギの別の部位に皮下注射した。

20

【0396】

ウサギに、細胞表面上にヒトTREM1を一過性に発現するウサギ線維芽細胞を用いて、14日間隔で2回のブースター注射を行った。各免疫化の前に、ヘパリン化した出血(200μl)を耳静脈から採取した。ベンチトップ型遠心分離機で10,000rpmで5分間スピンの後の採血から血清を収集し、-20℃で凍結した。終了は、脾臓、リンパ節、骨髄及び末梢血単核細胞の単一細胞懸濁液を調製し、B細胞発見目的に必要なまで-80℃で10%DMSO/FCS中で凍結した最終ブーストの14日後に起こった。終了時に採血も行い、血清を前述のように調製した。

30

【0397】

Tickle et al. (2015)によってJ Biomol Screen 20(4):492-7に記載されている方法を使用してメモリーB細胞培養物をセットアップし、TTP Labtech Mirror-ballシステムでの細胞ベースのアッセイにおいて、ヒト及びカニクイザルTREM1に結合する能力について上清を最初にスクリーニングした。細胞ベースのアッセイは、ヒトTREM1又はカニクイザルTREM1 DNAのいずれかで一過性にトランスフェクトしたHEK293細胞を使用した均一なマルチプレックスアッセイであり、無関係のDNAで一過性にトランスフェクトしたHEK293細胞に対してカウンタースクリーニングした。細胞を、Vybrant (商標) DIO又はDIL標識(ThermoFisher)及びリビール剤としてのヤギ抗ウサギFc-AF647コンジュゲートのいずれかで染色した。

40

【0398】

合計20×200プレートB細胞培養実験からの一次ミラーボールスクリーニングにおいて、訳7000個のTREM1特異的陽性ヒットが同定された。次いで、このアッセイからの陽性上清を、オフプレートを推定するためのBIAcoreでのプロファイリングによるさらなる特徴付けのために進行させた。

【0399】

蛍光焦点法並びに単一細胞逆転写(RT)及びPCR(RT-PCR)を使用して、3

50

00秒間の解離工程の調査中に結合の25%未満の喪失をもたらす解離速度を有するウェルをV領域遺伝子回収のために進行させた。

【0400】

選別された細胞の逆転写(RT)及びPCRに続いて、抗体のV領域をコードする「転写活性PCR」(TAP)産物を生成し、HEK-293細胞を一過性にトランスフェクトするために使用した。組換え抗体を含有する、得られたTAP上清を、ELISAによってヒト(CID101904;配列番号7)及びカニクイザル(CID101953;配列番号8)TREM1細胞外ドメイン(例1に記載のように作製)に結合し、BIAcoreにおいて少なくとも1000pMの親和性でヒトsTREM1に結合し、THP1単球TREM1/DAP12NF-κBルシフェラーゼレポーター細胞アッセイにおいてPGLYRP1媒介シグナル伝達を遮断する能力について試験した。

10

【0401】

機能性を、ヒトTREM1を介したPGLYRP1/PGN媒介NF-κBシグナル伝達活性化を阻害する抗体の能力によって評価した。これを行うために、THP1単球TREM1/DAP12NF-κBルシフェラーゼレポーター細胞を使用した(UCBで作製)。これらの細胞は、ヒトTREM1、ヒトDAP12及びNF-κBルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定に発現する。大腸菌(E.coli)由来の可溶性ペプチドグリカン(PGN)と複合体化したPGLYRP1をTREM1リガンドとして使用し、これはTREM1に結合することによってNF-κB活性化を誘導する。TREM1に結合しないPGNは、NF-κB活性化も誘導するが、程度は低い、代替シグナル伝達経路を介して誘導する。ルシフェラーゼ活性の阻害は、この系における抗体の機能的遮断活性を実証する。

20

【0402】

THP1単球TREM1/DAP12NF-κBルシフェラーゼレポーター細胞を、標準的な組織培養技術を使用して、選択抗生物質(RPMI+10%FBS+50μM2-メルカプトエタノール+10μg/mlブラストサイジン+1μg/mlピューロマイシン+200μg/mlジェネティシン)を含有する完全培地中で培養した。アッセイ設定の3日前に、細胞をT175フラスコ内の50ml完全培地(200,000細胞/ml)中に10×10⁶細胞で播種し、インキュベータ内に平らに置いた。アッセイの日に、細胞をフラスコから取り出し、50mlのファルコンに移し、300×gで5分間遠心分離した。培地を除去し、細胞を5~10mlの完全培地に再懸濁し、計数した。次いで、細胞懸濁液を完全培地に添加することによって細胞を1×10⁶細胞/mlで再懸濁し、10μl/ウェルをアッセイプレート(Corning#3570)に添加した。抗体を384ウェル希釈プレート(Greiner#781281)中の完全培地で段階希釈した。次いで、抗体の段階希釈物をアッセイプレート(10μl/ウェル)に移し、アッセイプレートを37℃/5%CO₂で1時間インキュベートした。組換えヒトPGLYRP1(R&D Systems#2590-PGB)を滅菌DPBS中室温で1時間PGN(Invivogen#tlrl-ks spgn)と複合体化させた。1時間後、溶液を完全培地で希釈し、次いでアッセイプレート(10μl/ウェル)に移して、2.5μg/mlのPGLYRP1及び10μg/mlPGNの最終アッセイ濃度にした。プレート対照(抗体を添加しない)には、それぞれアッセイ最大値及び最小値として、PGLYRP1/PGN複合体及びPGN単独を含めた。次いで、アッセイプレートを37℃/5%CO₂で16時間±2時間インキュベートした。インキュベーション後、ルシフェラーゼ活性を、Steady Gloルシフェラーゼアッセイシステム(Promega#E2520)を使用して測定した。Steady-Glo試薬を製造者の説明書に従って調製し、30μl/ウェルをアッセイプレートに添加した。次いで、プレートを200×gで3分間遠心分離し、次いで、Steady Glo試薬との総インキュベーション時間が5分になるように室温で更に2分間インキュベートした。次いで、Synergy Neo2プレートリーダーを使用して発光を測定し、生の発光値を使用して、対照ウェルと比較した相対阻害率を決定した。4PLカーブフィッティング及びIC₅₀値の計算は、Act

30

40

50

i v i t y B a s e v 9 . 4 を使用して行った。

【0403】

次いで、目的のTAP産物からの重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子対をウサギIgG抗体としてクローニングし、HEK-293-過性発現系で再発現させた。合計144個のV領域をクローニングした。次いで、組換えクローン化抗体を、ELISA、BIACoreにおける結合、及びNF-κBルシフェラーゼレポーター細胞アッセイにおけるPGLYRP1+PGN媒介シグナル伝達の阻害によって、ヒト及びカニクイザルTREM1に結合するそれらの能力について再試験した。ヒトTREM1アラニン変異体アレイ（TREM1阻害抗体について以下に更に記載されるのと同じアプローチ）を使用した既知のTREM1リガンドPGLYRP1のリガンド結合部位の特徴付けに続いて、同じ結合部位に結合する抗体は、直接リガンドブロッキングによってTREM1機能を調節すると仮定された。機能を付与するTREM1上の代替抗体結合部位を同定するために、NF-κBルシフェラーゼレポーター細胞アッセイにおいてTREM1活性を阻害することが証明された抗体を、ヒトTREM1アラニン変異体アレイを使用してエピトープ位置について評価した。

10

【0404】

ヒトTREM1 IgVドメイン変異体クローンのアレイを作製した。それらは、アラニンに変異した3つの表面残基を近接してそれぞれ有する58個のクローン；アラニンに変異した2つの表面残基を近接してそれぞれ有する65個のクローン；又はアラニンに変異した単一の表面残基をそれぞれ有する63個のクローンのいずれかからなっていた。全てのアレイは、野生型ヒトTREM1クローンを含んでいた。野生型を含む変異型ヒトTREM1アレイクローンの配列を表8、9及び10に示す。

20

【0405】

表8. 3-アラニン変異体アレイを設計するために使用されるTREM1タンパク質配列のリスト

【表8-1】

ID	配列番号	TREM1ポリペプチド配列
01_WT	109	MELRAATKLTTEKYELKEGQTLQVKGCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPCTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
02_6	110	MELRAAAKLTTEKYELKEGQTLQVKGCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPCTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
03_6_7	111	MELRAAAALTEKYELKEGQTLQVKGCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPCTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
04_6_7_9	112	MELRAAAALAEKYELKEGQTLQVKGCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPCTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
05_7_8_9	113	MELRAATAAAEKYELKEGQTLQVKGCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPCTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
06_9_10_111	114	MELRAATKLAAKYELKEGQTLQVKGCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPCTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFARIRLVVTLE
07_9_10_11	115	MELRAATKLAAKYELKEGQTLQVKGCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPCTLACTERPSKNSHPVQVGRILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE

30

40

50

10

20

【表 8 - 3】

41_60_75 76	149	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKASHPV QVGRIILEDYAAHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
42_60_76 77	150	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKASHPV QVGRIILEDYAAHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
43_28_76 77	151	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYALEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYAAHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
44_28_77 78	152	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYALEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHDAALLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
45_96_10 9_111	153	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYACVIYQPPKEPHMAFARIRLVVTLE
46_98_10 0_109	154	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCAIAQPPKEPHMAFARIRLVVTLE
47_35_10 0_102	155	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVAQAPKEPHMLFDRIRLVVTLE
48_102_1 03_104	156	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQAAAEPHMLFDRIRLVVTLE
49_103_1 04_105	157	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPAAPHMLFDRIRLVVTLE
50_104_1 05_106	158	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPAAHMLFDRIRLVVTLE
51_105_1 06_107	159	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKAAAMLFDRIRLVVTLE
52_106_1 07_108	160	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEAAALFDRIRLVVTLE
53_107_1 08_109	161	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPAAAFDRIRLVVTLE
54_109_1 10_111	162	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMAAARIRLVVTLE
55_11_11 3_114	163	MELRAATKLTEAKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRAALVVTLE
56_10_12 114	164	MELRAATKLTAAYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIALVVTLE
57_118_1 19_120	165	MELRAATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVA
58_16_11 9_120	166	MELRAATKLTEEKYELAEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPV QVGRIILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTAA

10

20

【0406】

表 9. 2 - アラニン変異体アレイを設計するために使用される T R E M 1 タンパク質配列のリスト

【表 9 - 1】

ID	配列 番号	T R E M 1 ポリペプチド配列
01_WT	167	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
02_2_3	168	AAAALTEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
03_3_4	169	AATAATEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
04_4_5	170	AATKAAEEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
05_5_104	171	AATKLAEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHALFDRIRLVVTKG
06_5_106	172	AATKLAEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLADRIRLVVTKG
07_5_107	173	AATKLAEKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFARIRLVVTKG
08_7_9	174	AATKLTEAKAELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
09_7_107	175	AATKLTEAKYELKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFARIRLVVTKG
10_8_10	176	AATKLTEAYALKEGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
11_11_12	177	AATKLTEEKYEAAGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
12_12_13	178	AATKLTEEKYELAAGQTLQVCKDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHGHLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG

30

40

50

【表 9 - 2】

13_12_15	179	AATKLTEEKYELAEATLDVKCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
14_13_85	180	AATKLTEEKYELKAGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
15_16_81	181	AATKLTEEKYELKEGQALQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
16_20_75	182	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
17_24_25	183	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYALAEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
18_24_26	184	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYALAEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
19_24_27	185	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYALAEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
20_25_26	186	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTAALKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
21_26_27	187	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLAEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
22_30_31	188	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASAAQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
23_30_53	189	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
24_37_38	190	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQAARDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
25_37_39	191	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQAADGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
26_37_45	192	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQAIRDGEMPATLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
27_37_47	193	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQAIRDGEMPKTAACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
28_38_44	194	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIARDGEMAKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
29_38_90	195	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIARDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGAYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
30_42_43	196	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGAAPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
31_42_45	197	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGAMPATLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
32_43_44	198	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEAAKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
33_43_10 1	199	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEAPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKAPHMLFDRIRLVVTKG
34_44_45	200	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMAATLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
35_45_47	201	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPATACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
36_47_65	202	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTAACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
37_51_55	203	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
38_56_57	204	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
39_58_59	205	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSAAVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
40_59_60	206	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHAAQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
41_59_61	207	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHAAVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
42_59_66	208	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHAAVQVGRI ALEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
43_60_61	209	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHAAVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
44_60_62	210	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHAAQAGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
45_61_62	211	AATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVAAAGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

46_61_66	212	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVAVGRI ALEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
47_62_65	213	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQAGRA ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
48_65_66	214	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRA ALEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
49_66_81	215	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ALEDYHDHGLLRVRMANLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
50_72_73	216	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHAAGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
51_73_75	217	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
52_81_82	218	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMAALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
53_85_86	219	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQAADSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
54_98_99	220	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQAAKEPHMLFDRIRLVVTKG
55_99_10_0	221	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPAAPPHMLFDRIRLVVTKG
56_100_1_01	222	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPAAPHMLFDRIRLVVTKG
57_101_1_02	223	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKAAHMLFDRIRLVVTKG
58_102_1_03	224	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEAAMLFDRIRLVVTKG
59_103_1_04	225	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPAALFDRIRLVVTKG
60_104_1_06	226	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHALADRIRLVVTKG
61_106_1_07	227	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLAARIRLVVTKG
62_8_10_112	228	AATKLTEEAYALKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLAVTKG
63_37_39_40	229	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
64_40	230	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
65_112	231	AATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLAVTKG

10

20

【0407】

30

表 10. 単一アラニン変異体アレイを設計するために使用される T R E M 1 タンパク質配列のリスト

【表 10 - 1】

ID	配列番号	T R E M 1 ポリペプチド配列
01_WT	232	ATKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
02_1	233	AAKLTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
03_2	234	ATALTEEKYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
04_4	235	ATKLAEKYLKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
05_5	236	ATKLTAEKYLKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
06_6	237	ATKLTEAKYLKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
07_7	238	ATKLTEEAYELKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
08_8	239	ATKLTEEKAELEKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
09_9	240	ATKLTEEKYALKEGQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE
10_11	241	ATKLTEEKYELAEQTLVDKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI ILEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTTLE

40

50

【表 10 - 2】

11_14	242	ATKLTEEKYELKEGATLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
12_17	243	ATKLTEEKYELKEGQTLAVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
13_19	244	ATKLTEEKYELKEGQTLDVACDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
14_21	245	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCAYTLEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
15_23	246	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYALEKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
16_24	247	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTAEFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
17_25	248	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLAKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
18_26	249	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
19_29	250	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
20_30	251	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
21_38	252	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRADGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
22_39	253	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRAGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
23_41	254	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
24_42	255	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEAPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
25_44	256	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
26_45	257	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
27_50	258	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTARPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
28_51	259	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTEAPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
29_52	260	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERASKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
30_54	261	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSANSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
31_55	262	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKASHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
32_56	263	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNAHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
33_57	264	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSAPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
34_58	265	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHAVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
35_59	266	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPAQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
36_60	267	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVAVGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
37_61	268	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQAGRII LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
38_63	269	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGAI LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
39_65	270	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRI LEDYHDHGLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
40_71	271	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHAGLLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
41_72	272	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDAGLLLRVRMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
42_78	273	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVAMVNLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
43_80	274	ATKLTEEKYELKEGQTLDVKCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMANLQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE

10

20

30

40

50

【表 10-3】

44_81	275	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
45_83	276	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
46_84	277	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
47_85	278	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
48_87	279	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
49_95	280	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLE
50_97	281	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQAPKEPHMLFDRIRLVVTLE
51_98	282	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPAKEPHMLFDRIRLVVTLE
52_99	283	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPAEPHMLFDRIRLVVTLE
53_100	284	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKAPHMLFDRIRLVVTLE
54_101	285	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEAHMLFDRIRLVVTLE
55_102	286	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEFAMLFDRIRLVVTLE
56_103	287	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHALFDRIRLVVTLE
57_104	288	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMAFDRIRLVVTLE
58_106	289	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFARIRLVVTLE
59_109	290	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIALVVTLE
60_111	291	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLAVTLE
61_113	292	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVALE
62_114	293	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTAE
63_115	294	ATKLTEEKYELKEGQTLQVCDYTLKFASSQKAWQIIRDGEMPKTLACTERPSKNSHPVQVGRII LEDYHDHGLLRVRMVALQVEDSGLYQCVIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTLA

10

20

【0408】

上記のクローンの各々を、TREM1 IgVドメインと、それに続くヒトFcドメインに融合した三重アラニンリンカーとからなる融合タンパク質として発現させた。各クローンを、抗ヒトFc抗体でコーティングされたセンサ上に捕捉した。その後、センサを目的の抗体を含有する溶液に浸漬した。Bio-Layer Interferometry (BLI) 装置 (Octet RED384又はOctet HTX, ForteBio) を用いて、結合動態をモニターした。

30

【0409】

各変異体TREM1クローンに対する抗体の結合動態をモニタリングし、それらを野生型タンパク質に対する動態と比較することによって、エピトープを推定することができた。抗体解離速度定数の増加又はタンパク質への抗体結合の喪失は、そのクローン中の変異残基が抗体結合、したがってそのエピトープの一部に重要であることを示した。

40

【0410】

12172抗体をTREM1活性の強力な阻害剤として選択した。興味深いことに、アラニンスキャニングアプローチは、この分子が、同定されたPGLYRP1リガンド結合部位に遠いエピトープを有することを実証した。これをしてリード分子として選択した。

【0411】

上記の方法を使用し、3つのアレイ全てを考慮して、12172抗体の重要なエピトープ残基を、残基E26、E27、K28、Y29、E30、L31、K32及びQ35 (ここで、番号付けは配列番号1に従う) であると決定した。

【0412】

50

例 3：抗体のヒト化

抗体 12172 を、ウサギ V 領域からの CDR をヒト生殖系列抗体 V 領域フレームワークに移植することによってヒト化した。抗体の活性を回復するために、ウサギ V 領域からの多数のフレームワーク残基もヒト化配列に保持した。これらの残基は、Adair et al. (1991) (国際公開第 91/09967 号) によって概説されたプロトコルを用いて選択した。ウサギ抗体 (ドナー) V 領域配列とヒト生殖系列 (受容体) V 領域配列とのアラインメントを、設計されたヒト化配列と共に図 1 及び図 2 に示す。ドナーから受容体配列にグラフトされた CDR は、Chothia/Kabat の組合せ定義が使用される CDR-H1 (Adair et al.、国際公開第 91/09967 号を参照されたい) を除いて、Kabat (Kabat et al.、1987) によって定義される通りである。

10

【0413】

ヒト V 領域 IGKV1-9+IGKJ4 J 領域 (IMGT、<http://www.imgt.org/>) を、抗体 12172 軽鎖 CDR の受容体として選択した。ヒト化グラフト変異体中の軽鎖フレームワーク残基は、いずれもヒト生殖細胞系遺伝子由来であるが、残基 1、2 及び 3 (配列番号 25 を参照して) を含む群からの残基 0、1、2 又は 3 である場合を除き、ドナー残基アラニン (A1)、バリン (V2) 及びバリン (V3) がそれぞれ保持されていた (図 1 及び表 11)。

【0414】

ヒト V 領域 IGHV3-66+IGHJ4 J 領域 (IMGT、<http://www.imgt.org/>) を、抗体 12172 の重鎖 CDR の受容体として選択した。多くのウサギ抗体と同様に、抗体 12172 の VH 遺伝子は、選択されたヒト受容体よりも短い。ヒト受容体配列と整列した場合、抗体 12172 の VH 領域のフレームワーク 1 は、ヒト化抗体に保持されている N 末端残基を欠く (図 2)。12172 ウサギ VH 領域のフレームワーク 3 はまた、ベータシート鎖 D と E との間のループに 2 つの残基 (配列番号 45 を参照して、75 及び 76) を欠いている：ヒト化グラフト変異体では、ギャップは選択されたヒト受容体配列からの対応する残基 (リジン 75、K75；アスパラギン 76、N76) で満たされている (図 2)。ヒト化グラフト変異体中の重鎖フレームワーク残基は、それぞれドナー残基トレオニン (T23)、イソロイシン (I48)、グリシン (G49)、リジン (K71)、セリン (S73) 及びバリン (V78) が保持されていた残基 23、48、49、71、73 及び 78 (配列番号 45 を参照して) を含む群からの 1 つ又は複数の残基を除いて、全てヒト生殖細胞系遺伝子由来である。

20

30

【0415】

ATUM (CA, USA) による自動合成アプローチによって、多数の変異重鎖及び軽鎖 V 領域配列をコードする遺伝子を設計及び構築した。重鎖 V 領域及び軽鎖 V 領域の更なる変異体は、オリゴヌクレオチド指向突然変異誘発によって VH 遺伝子及び VK 遺伝子を修飾することによって作製された。哺乳動物細胞における一過性発現のために、ヒト化軽鎖 V 領域遺伝子を、ヒト Kappa 鎖定常領域 (Km3 アロタイプ) をコードする DNA を含む UCB 軽鎖発現ベクター pMhCK にクローニングした。ヒト化重鎖 V 領域遺伝子を、ヒンジ安定化突然変異 S228P を有するヒトガンマ 4 重鎖定常領域をコードする DNA を含む UCB ヒトガンマ 4 重鎖発現ベクター pMhy4PFL に (Angal S., King D. J., Bodmer M. W., Turner A., Lawson A. D. G., Roberts G., Pedley B. and Adair J. R. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. Mol. Immunol. 1993, 30 (1): 105-8)、又は Fc ガンマ受容体 (FcγR) への結合を減少させるために突然変異 L234A 及び L235A を有するヒトガンマ 1 重鎖定常領域をコードする DNA を含む UCB ガンマ 1 LALA 重鎖発現ベクター pMhy1 L234A L235A にクローニングした (Canfield S. M. and Morrison S. L.

40

50

The Binding affinity of Human IgG for its High Affinity Fc Receptor Is Determined by Multiple Amino Acids in the CH2 Domain and Is Modulated by the Hinge Region. J. Exp. Med. 1991, 173:1483-1491)。ExpiFectamine (商標) 293トランスフェクション試薬 (A14525、ThermoFisher Scientific) を使用して、得られた重鎖及び軽鎖ペクターのExpi293 (商標) 懸濁細胞への同時トランスフェクションを達成し、ヒト化組換えIgG4P及びIgG1 LALA抗体の発現を得た。

【0416】

10

変異体ヒト化抗体鎖及びそれらの組合せを発現させ、親抗体と比較したヒトTREM1に対するそれらの結合親和性、蛍光ベースの熱シフトアッセイによるそれらの熱安定性 (例13に記載) 及びAC-SINSによる自己相互作用の傾向 (例17に記載の親和性捕捉自己相互作用ナノ粒子分光法) について評価した。グラフトgH11中のVHフレームワークのドナー残基I48、G49及びK71の保持は、表面プラズモン共鳴によって測定した場合、ヒトTREM1への最高親和性結合に必須であった (表11)。グラフトgL2中の軽鎖フレームワーク残基は全てヒト生殖細胞系遺伝子由来であった。グラフトgL6中のVLドナー残基V3の保持は、AC-SINSアッセイによって測定される自己相互作用の傾向を減少させた (表22)。

【0417】

20

耐熱性 (変性) は、コンフォメーション安定性及び長期保存安定性の指標である。ヒト化IgG4P抗体は良好な熱安定性を有し、Fabドメインのアンフォールディングの中心 (Tm) は73.5~74.6℃の範囲である (表11)。

【0418】

分子自己相互作用は、特に治療用mAbの皮下投与に使用される高タンパク質濃度で、天然の状態凝集及び低い溶解性をもたらし得る。抗体Fvドメインの正味の電荷は、アイソタイプ特異的な様式でpH7.4及びpH5.0でヒトIgGの天然の状態凝集に影響を及ぼすことが示されている (Heads JT, Lamb R, Kelm S, Adams R, Elliott P, Tyson K, Topia S, West S, Nan R, Turner A, Lawson ADG. Electrostatic interactions modulate the differential aggregation propensities of IgG1 and IgG4P antibodies and inform charged residue substitutions for improved developability. Protein Eng Des Sel. 2019 Dec 31;32(6):277-288. doi:10.1093/protein/gzz046. PMID:31868219; PMCID:PMC7036597)。ヒト化12172 hIgG4P抗体の自己相互作用の傾向を低下させるために、AC-SINSアッセイによって測定された高い $\Delta\lambda_{max}$ 値によって示されるように (この例の表12及び例17の表22)、Fvドメインの正味の正電荷は、正に荷電した残基を中性又は負に荷電した残基のいずれかに変異させることによって減少した。これらの残基は、Heads et al (2019) (国際公開第2019/234094号) によって概説された理論的根拠を用いて選択した。ヒト化軽鎖グラフト12712 gL2 (配列番号29) の残基18及び50を、それぞれグラフトgL9及びgL11においてアルギニン (R18) からセリン (S18) 及びリジン (K50) からセリン (S50) に変異させた。ヒト化重鎖グラフト12172 gH11 (配列番号79) 中の残基75を、それぞれグラフトgH26、gH48及びgH49において、リジン (K75) からセリン (S75)、グルタミン (Q75) 又はグルタミン酸 (E75) のいずれかに変異させた。改変された重鎖及び軽鎖遺伝子を、Expi293 (商標) 懸濁細胞において組み合わせで一過性に発現させ、組換えIgG4P抗体を、ヒトTREM1に対するそれらの結合親和性、熱安定性及び自己相互作用

30

40

50

する傾向について評価した（表 1 2）。ヒト化 1 2 1 7 2 電荷変異体は、ヒト T R E M 1 に対する親和性を保持し、A C - S I N S アッセイによって測定された $\Delta \lambda_{max}$ の減少によって示されるように、自己相互作用の傾向の減少を示した。

【 0 4 1 9 】

ヒト化 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 及び 1 2 1 7 2 g L 6 g H 6（h I g G 4 P 及び h I g G 1 L A L A フォーマットの両方）の生物物理学的特徴付けを、例 1 2 ～ 2 0 に記載されるように、発達性を評価するために異なるストレス条件を使用して行った。更に、全ての分子を液体クロマトグラフィ質量分析（L C - M S）によって分析して、予測された配列分子量（M W）が実験データと一致することを確認した。

【 0 4 2 0 】

ヒト化 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 I g G 4 P 抗体は、T H P 1 単球 T R E M 1 / D A P 1 2 N F - κ B ルシフェラーゼレポーター細胞アッセイ（例 2 に記載）において、ウサギ親 1 2 1 7 2 抗体と同様の N F - κ B 阻害を示した（表 1 3 参照）。

【 0 4 2 1 】

表 1 1 . 様々な 1 2 1 7 2 抗体変異体の親和性及び T m。

【表 1 1】

抗体12172 変異体	軽鎖ドナー残基	重鎖ドナー残基	親和性 (KD)pM	Tm (度C)
12172	-	-	519/461	
12172gL1gH1	A1, V2, V3	T23, I48, G49, K71, S73, V78	437	73,5
12172gL2gH1	-	T23, I48, G49, K71, S73, V78	442	74,1
12172gL2gH4	-	T23, I48, G49, S73, V78	693	74,3
12172gL2gH6	-	T23, I48, G49, K71, S73	581	73,9
12172gL2gH8	-	I48, G49, K71, S73, V78	476	74,2
12172gL6gH4	V3	T23, I48, G49, S73, V78	619	74,1
12172gL6gH6	V3	T23, I48, G49, K71, S73	463	74,5
12172gL6gH11	V3	I48, G49, K71	336	74,5
12172gL2gH2	-	G49, K71, S73, V78	989	73,6
12172gL2gH9	-	I48, G49, V78	362	74,6
12172gL2gH10	-	I48, G49, S73	1970	74,1
12172gL2gH11	-	I48, G49, K71	453	74,4
12172gL2gH12	-	I48, G49	718	74,1

【 0 4 2 2 】

表 1 2 . 様々な 1 2 1 7 2 抗体変異体の親和性、T m 及び A C - S I N S（変異体のいくつかについて複製値を提供する）

10

20

30

40

50

【表 1 2】

抗体12172 変異体	軽鎖 ドナー 残基	軽鎖 変異	重鎖 ドナー 残基	重鎖 変異	親和性 (KD) pM	Fab Tm	AC-SINS
12172	-	-	-	-	570		
12172gL2gH11	-	-	I48, G49, K71	-	445	74,4	10,2
12172gL2gH26	-	-	I48, G49, K71	K75S	624/672	74,1	1.98/1.17
12172gL9gH11	-	R18S	I48, G49, K71	-	550	ND	9,38
12172gL11gH11	-	K50S	I48, G49, K71	-	550	73,8	7.02/10.56
12172gL9gH26	-	R18S	I48, G49, K71	K75S	559/616	73,8	1.73/0.68
12172gL10gH26	-	K42Q	I48, G49, K71	K75S	578/659	73,8	2.06/1.33
12172gL11gH26	-	K50S	I48, G49, K71	K75S	532/633	74	2.03/1.36
12172gL9gH48	-	R18S	I48, G49, K71	K75Q	370	73,6	10,46
12172gL9gH49	-	R18S	I48, G49, K71	K75E	394	73,6	6,45

10

20

【0 4 2 3】

表 1 3 . 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 I g G 4 P 及び 1 2 1 7 2 ウサギ I g G 1 の効力、有効性及び勾配値のまとめ

【表 1 3】

抗体	幾何平均IC50 (pM) ±SD	平均Emax (%) ±SD	平均傾き ±SD	N*
12172gL2gH11 IgG4P	64 ± 36	72 ± 4	2.1 ± 0.9	3
12172 Rabbit IgG1	84 ± 40	89 ± 6	2.7 ± 1.2	3

30

*各分子の値を 3 つの独立した実験から計算した。

【0 4 2 4】

例 4 . ウサギ 1 2 1 7 2 F a b の発現及び精製

ExpiFectamine (商標) 293トランスフェクション試薬 (A14525、ThermoFisher Scientific) を使用して、Expi293 (商標) 懸濁細胞への重鎖及び軽鎖ベクターCID102769及びCID102770の同時トランスフェクションを達成し、ウサギ組換え体12172Fabの発現を得た。培地をPALLO. 4 / 0. 2 µmカプセルフィルタに通して濾過し、XK16 / 60カラムに沈降させたProtein G GammaBind Plus樹脂 (7 mL) に適用し、10 CV 1 × PBS pH 7. 4 で洗浄した。結合したFab複合体タンパク質を50 mLの100 mMグリシン (pH 2. 7) で溶出し、直ちに10 % 1 M Tris (pH 8) で中和した。12172Fab複合体を含む画分をプールし、Vivaspin PES 20、10 kDa MWCO濃縮器で濃縮した。次いで、superdex s200 16 / 60カラム (GE Healthcare) を使用して研磨し、1 × PBS pH 7. 4 に緩衝液交換した。例 1 に以前に記載されたように、最終タンパク質濃度及び純度を評価した。

40

50

【0425】

例5. 12172 g L 2 g H 1 1 / g L 6 g H 6 h I g G 4 P 及び h I g G 1 L A L A の発現及び精製

一過性哺乳動物発現、CHOSXE 培養

懸濁CHOSXE細胞を、2mM (100倍) Glutamaxを補充したCDCHO 無血清培地 (Invitrogen) に予め適合させた。

【0426】

細胞を対数増殖期に維持し、振盪インキュベータ (スイス、バースフェルデンのKuhner AG社) 内で190rpmで振盪し、8%CO₂を補充した37℃で培養した。

【0427】

エレクトロポレーション転写

トランスフェクションの前に、Vi-CeLL (商標) XR細胞生存率分析装置 (Beckman Coulter) を使用して細胞数及び生存率を決定し、99%生存率で必要な細胞数 (2.3×10^8 細胞/ml) を遠心コンカルチューブに移し、1500rpmで15分間回転させた。ペレット化した細胞をHyclone (商標) MaxCyte (登録商標) 緩衝液 (Thermo Scientific) で洗浄し、更に15分間遠心分離した。ペレットを新鮮な緩衝液中 2.3×10^8 細胞/ml で再懸濁した。

【0428】

Qiagen Plasmid Plus Giga Kit (登録商標) を使用して精製したプラスミドDNAを400µg/mlで添加した。MaxCyte STx (登録商標) フローエレクトロポレーション機器を用いたエレクトロポレーション後、細胞を、2mM Glutamax、0.75mM酪酸ナトリウム (n-酪酸ナトリウム塩、Sigma B-5887)、抗生物質有糸分裂阻害剤の100倍溶液 (500回に1回) 及び0日目に添加したボラス供給物を含有するProCHO (商標) 5タンパク質非含有CHO培地 (Lonza) に移した。

【0429】

次いで、トランスフェクトした細胞を通気フラスコに直接移し、37℃、8%CO₂ 及び190rpmの振盪に設定したKuhner Shaker Incubatorで培養した。トランスフェクションの24時間後に温度を32℃に下げ、細胞を更に11~13日間培養した。

【0430】

12~14日目に、培養物を遠心管に移し、4000rpmで30分間スピンした後、上清を細胞から分離した。保持された上清を、0.22µmのSartobran (登録商標) P Milliporeカートリッジ、続いて0.22µmのMillipak (登録商標) Gamma Goldフィルタを通して濾過することによって更に清澄化した。最終発現力価を、標準として1mg/mlのA33 hIgG1、0.8mlのPOROS (商標) G20µmカラム及びAgilent 1100 Series HPLCシステムを使用するプロテインG定量HPLCアッセイによって決定した。清澄化された細胞培養収穫物を精製前に4℃で保存した。

【0431】

抗体の精製及び分析

AKTA Pure 25Lクロマトグラフィシステム (Cytiva) を使用して、Hyclone (商標) Phosphate Buffered Saline (PBS) pH7.4に予め平衡化した215mlのMabSelect (商標) SuRe (商標) カラム (Cytiva) に充填する前に、清澄化した細胞培養収穫物を室温に加温した。PBS pH7.4で洗浄した後、結合した物質を、ヒトIgG1アイソタイプについてはpHを3.4 (0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液) に、又はヒトIgG4PアイソタイプについてはpH3.7 (30mM酢酸ナトリウム)、引き続きpH3.6 (0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液) に低下させることによって溶出した。溶出後、カラムを0.1Mクエン酸pH2.0でストリッピングして、強く結合した凝集体を除去した。親和

10

20

30

40

50

性捕捉溶出ピーク画分をプールし、2 MのTris-HCl pH 8.5の添加によってpH 5.5～7.5に中和した。タンパク質濃度を、ナノドロップを使用して280 nmでの吸光度を読み取ることによって決定し、純度を、分析的サイズ排除HPLC（以下の方法）によって決定した。

【0432】

アフィニティープールを、HiLoad Superdex 200 26/60 (Cytiva) 又は50/60 prepグレードカラム (Cytivaによってカスタムパックされている) に負荷するために、遠心濾過デバイス (Centricon (登録商標) Plus-70 又はAmicon (登録商標) Ultra-15) 又は体積に応じて10 KDa 又は30 KDaのMWCO膜を有する加圧攪拌セルチャンバー (Amicon (登録商標)) を使用して濃縮した。HiLoad Superdex 200 26/60 又は50/60カラムを50 mM酢酸ナトリウム、125 mM塩化ナトリウム緩衝液pH 5.0中で平衡化した後、AKTAクロマトグラフィシステム (Cytiva) を使用して試料をローディングした。アイソクラティック溶出を実行し、0.3 CV後に画分を回収した。モノマーを含有する画分を、分析サイズ排除HPLCで分画又は擬似プールを実行することによって同定した。画分をプールして、>98%のモノマー含有量を得た。遠心濾過デバイス (Centricon (登録商標) Plus-70 又はAmicon (登録商標) Ultra-15) 又は体積に応じて10 KDa 又は30 KDaのMWCO膜を備えた加圧攪拌セルチャンバー (Amicon (登録商標)) を使用して、プールを10～15 mg/mlに濃縮し、次いで回収し、Stericup (登録商標) 濾過ユニット 又はMillex GVシリンジフィルタを使用して0.22 µm滅菌濾過した。

10

20

【0433】

最終タンパク質濃度は、ナノドロップを使用して280 nmでの吸光度を読み取ることによって決定した。モノマー含有量は、分析的サイズ排除HPLCによって決定した。Invitrogen Novex (商標) WedgeWell (商標) 4～20% Tris-グリシン及びXCell SureLock (商標) ミニセル電気泳動システム及びクーマシー染色を使用してSDS-PAGEによって正しいバンドパターンを決定した。エンドトキシンのレベルは、Charles River Endosafe (登録商標) LAL Reagent Cartridge Technology及びEndosafe (登録商標) nexgen-PTSリーダーを使用して決定し、1 EU/mg未満のレベルは許容できる品質であった。試料をインタクト質量分析によって分析して、重鎖質量及び軽鎖質量、予想される修飾及び同一性を確認した。

30

【0434】

分析サイズ除外HPLC

TSK gel G3000SWXL HPLCカラム (Tosoh) を、Agilent 1100 又は1200 シリーズHPLCを使用してHycloneリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) pH 7.4に平衡化した。20～50 µgの試料を注入し、1 ml/分で16分間定組成溶出条件 (PBS pH 7.4) で実行した。データをBioRad分子重量マーカー標準と比較した。モノマー並びに高分子量及び低分子量生成物に関連する不純物について、保持時間及びパーセンテージを報告した。

40

【0435】

例6. ヒト及びカニクイザルTREM1に対する12172 g L2 g H11 h IgG 4 Pの結合速度論

ヒト及びカニクイザルTREM1への12172 g L2 g H11 h IgG 4 P結合の動態を、Biacore T200装置及びBiacore 8k装置での表面プラズモン共鳴によって25℃で測定した。

【0436】

ヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的抗体 (F(ab')) 2フラグメント、Jackson ImmunoResearch 109-006-098) を、アミンカップリング化学反応を介してCM5センサチップ上に約5000 RUのレベルまで固定化し

50

た。参照細胞を同様に処理した。アミンカップリングが完了した後、捕捉溶液を除いて、その後の全ての溶液を参照セル及び試料セル上に順番に流し、参照セルの応答を実行全体を通して試料セルから差し引いた。

【0437】

各分析サイクルは、抗Fc表面へのおよそ250RUの12172g L2g H11 h Ig G4 Pの捕捉、180秒間（25℃、流速30μl/分）の分析物の注入、600秒間の分析物の解離、続いて表面再生（50mM HClの60秒間の注入、5mM NaOHの30秒間の注入、及び50mM HClの更なる60秒間の注入による）からなった。ヒトTREM1 ECD分析物（インハウス、Hisがタグ付けされている）を、T200では200nM～2.5nMの濃度で、8kでは500nM～2nMの濃度で、HBS-EP+ランニングバッファ（GE Healthcare）に3倍段階希釈で注入した。Cyno TREM1 ECD分析物（インハウス、Hisがタグ付けされている）を、4100nM～17nMの濃度でHBS-EP+ランニングバッファ（GE Healthcare）に3倍段階希釈で注入し、これはT200のみで実行した。器具のノイズ及びドリフトを差し引くために、緩衝液ブランク注入を含めた。

10

【0438】

速度論的パラメータは、必要に応じてBiacore T200 Evaluationソフトウェア（バージョン3.0）又はBiacore Insight Evaluationソフトウェア（バージョン3.0）を使用して1:1結合モデルを使用して決定した。12172g L2g H11 h Ig G4 Pは、ヒトTREM1に対して0.52nM、カニクイザルTREM1に対して870nMの親和性を有することが示された。速度論的パラメータを表14に要約する。

20

【0439】

表14. ヒト及びカニクイザルTREM1への12172g L2g H11 h Ig G4 P結合の速度論パラメータ

【表14】

種	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	n=
ヒト	1.8E+05	9.2E-05	0.52	2
カニクイザル	1.2E+05	1.0E-01	870	1

30

【0440】

例7. TREM1の異なる種への12172g L2g H11 h Ig G4 Pの結合
種々のTREM1種に対する12172g L2g H11 h Ig G4 P結合の動態を、Biacore T200装置での表面プラズモン共鳴によって25℃で測定した。試験した種は、ヒト、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、ラット、マウス、イヌ及びブタであった。

【0441】

ヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的抗体（F(ab')₂フラグメント、Jackson ImmunoResearch 109-006-098）を、アミンカップリング化学反応を介してCM5センサチップ上に約5000RUのレベルまで固定化した。参照細胞を同様に処理した。アミンカップリングが完了した後、捕捉溶液を除いて、その後の全ての溶液を参照セル及び試料セル上に順番に流し、参照セルの応答を実行全体を通して試料セルから差し引いた。

40

【0442】

各分析サイクルは、抗Fc表面へのおよそ250RUの12172g L2g H11 h Ig G4 Pの捕捉、180秒間（25℃、流速30μl/分）の分析物の注入、600秒間の分析物の解離、続いて表面再生（50mM HClの60秒間の注入、5mM NaOHの30秒間の注入、及び50mM HClの更なる60秒間の注入による）からなった。TREM1 ECD分析物（インハウス、Hisがタグ付けされている）をHBS-EP+

50

ランニングバッファ（GE Healthcare）に3倍段階希釈で注入し、最高濃度を表15に示し、3倍段階希釈を2 nMの最低濃度まで実施した。器具のノイズ及びドリフトを差し引くために、緩衝液ブランク注入を含めた。

【0443】

Biacore Insight Evaluationソフトウェア（バージョン3.0）を使用して1：1結合モデルを使用して速度論的パラメータを決定した。この実験では、12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 Pは、ヒトTREM1に対して0.54 nMの親和性を有することが示された（表15にまとめられた速度論パラメータ）。カニクイザル及びアカゲザルについて最小の結合応答が観察されたが、結合動態を決定するには不十分であった。任意の他の種のTREM1に対する12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 Pの結合は検出されなかった（表16に要約）。

【0444】

表15. ヒトTREM1への12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P結合の速度論的パラメータ

【表15】

種	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	n=
ヒト	1.7E+05	9.1E-05	0.54	1

【0445】

表16. 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 PへのTREM1種の結合を示す報告点データ。BLは、結合遅延を示す：TREM1注射の終了7.5～12.5秒前の平均シグナルを、この注射の開始7.5～12.5秒前の平均シグナルから差し引いたもの。SEは早期の安定性を示す：TREM1注射の終了後7.5～12.5秒の平均信号を、この注射の開始前の平均信号7.5～12.5秒から差し引く。理論的Rmaxは、捕捉された全ての抗体（150 kDa）が2分子のTREM1に完全に結合した場合に生成されるシグナルである。SR__BLはBLを理論Rmaxで割ったものであり、SR__SEはSEを理論Rmaxで割ったものである。

【表16】

種	濃度 (nM)	BL (RU)	SE (RU)	捕捉レベル (RU)	TREM1 MW (kDa)	理論 Rmax (RU)	SR BL	SR SE
ヒト	490	78	78	223	21	62	1.3	1.3
カニクイザル	460	26	16	231	21	65	0.4	0.3
アカゲザル	450	12	5	229	21	64	0.2	0.1
マーモセット	510	0	0	224	22	66	0.0	0.0
マウス	520	0	0	228	21	64	0.0	0.0
ラット	470	0	0	233	21	65	0.0	0.0
ブタ	490	0	0	233	22	68	0.0	0.0
イヌ	460	0	0	226	22	66	0.0	0.0

【0446】

例8. 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 PによるTREM1／PGLYRP1相互作用の遮断

12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 Pは、Biacore T200装置での表面プラズモン共鳴により、25℃でヒトTREM1とヒトPGLYRP1との間の相互作用

を遮断することが実証された。

【0447】

ヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的抗体F(ab')₂フラグメント、Jackson ImmunoResearch 109-006-098)を、アミンカップリング化学反応を介してHC30Mセンサチップ(Xantec Bioanalyticals)の4つ全てのフローセルに約4000RUのレベルまで固定した。フローセル1の応答は、実行全体を通してフローセル2の応答から差し引かれ、同様にフローセル3の応答は、実行全体を通してフローセル4の応答から差し引かれた。

【0448】

各分析サイクルは、フローセル2の表面への約100RUのTREM1-Fc(R&D 1278-TR Lot GZF0220071)の捕捉、フローセル4の表面への約150RU 12172 gL2gH11 hIgG4Pの捕捉からなり、TREM1 ECD分析物(インハウス、Hisがタグ付けされている)をフローセル3及び4の表面上に180秒間流した。PGLYRP1(R&D 2590-PGB、NLC1520031)とPGN(Invivogen tlr-l-kssp gnロットKSS-41-01)の混合物を全ての表面に180秒間流し、結合を監視し、続いて300秒間解離期間を設けた。次いで、表面を再生した(50mMのHClの60秒間の注入、5mMのNaOHの30秒間の注入、及び50mMのHClのさらなる60秒間の注入による)。

【0449】

12172 gL2gH11 hIgG4Pは、PGNの存在下及び非存在下でPGLYRP1とTREM1との相互作用を遮断した(表17参照)。

【0450】

表17. 拘束性後期報告時点での相対応答。これは、PGLYRP1及びPGNの注入中に計算される: 注入終了の7.5~12.5秒前の平均信号は、この注入開始の7.5~12.5秒前の平均信号から差し引かれる。次いで、この値は、リガンドが捕捉されていない等価サイクルにおける値から差し引かれる。これは、TREM1-Fcが単独でPGLYRP1の5RUに結合し、PGLYRP1とPGNとの混合物の12RUに結合するが、PGLYRP1は、12172 gL2gH11 hIgG4Pで被覆された表面に捕捉されたTREM1には結合しないことを示す。

【表17】

全フローセル		フローセル2		フローセル4		
濃度 PGLYRP1 (nM)	濃度 PGN(μg/ml)	リガンド	結合後期 (RU)	リガンド	TREM1の 濃度 (nM)	結合後期 (RU)
0	0	TREM1-Fc	0	12172 gL2gH11 hIgG4P	552	-1.8
30	0	TREM1-Fc	4.5	12172 gL2gH11 hIgG4P	552	-1.8
0	0.55	TREM1-Fc	-0.5	12172 gL2gH11 hIgG4P	552	-1.9
30	0.55	TREM1-Fc	11.8	12172 gL2gH11 hIgG4P	552	-1.7

【0451】

例9: 結晶学によるヒトPGLYRP1とヒトTREM1との結合界面の決定
結晶学

ヒトTREM1 IgVドメインを、15mg/mlのPBS(pH7.0)中の全長ヒトPGLYRP1(モル比1:1)と複合体化し、4℃で1時間インキュベートした。タンパク質を懸滴中で共結晶化させ、0.2μlのタンパク質及び0.2μlのリザーバーMolecular Dimensions ProplexスクリーンD7(15%

(w/V) PEG 6000、100 mM クエン酸三ナトリウム／水酸化ナトリウム pH 5.5) からなる蒸気拡散を行った。20% エチレングリコールを凍結保護に使用した。

【0452】

X線回折、データ収集、構造決定及び精密化

極低温 (100 K) X線回折データを APS 21-ID-F において遠隔で収集した。生データフレームは、XDS を使用してインデックス付け、統合、及びスケールングされた。結晶の空間群は P21 であり、単位格子パラメータは、 $2.55 \text{ \AA}$ の分解能に対して $a = 58.68 \text{ \AA}$ 、 $b = 98.73 \text{ \AA}$ 、 $c = 60.43 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 109.145^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ であった。構造の品質パラメータは良好であり、構造の全体的な R 因子 = 17.9% 及び遊離 R 因子 = 22.9% であった。タンパク質複合体構造を COOT でモデル化し、TLS プロトコルを含む PHENIX を使用して精製した。水分子を添加し、COOT によって確認した。

10

【0453】

ヒト TREM1 IgV ドメイン (21~139 位) (配列番号 9) は、全長 PGLYRP1 (配列番号 10) と複合体化した。結晶錯体の化学量論は 1:2 であり、等モル混合にもかかわらず、二量体化された PGLYRP1 分子に結合した単一の hTREM1 分子を有する。ヒト TREM1 の IgV 様ドメインと hPGLYRP1 との間の $4 \text{ \AA}$ 以下の分子間距離の分析を、CCP4 プログラム一式のプログラム NCONT を用いて行った。エピトープは、以下のように結晶学的に決定されている：残基 E27、D42~E46、A49、Y90~L95 及び F126 (位置は配列番号 1 に対応する)。図 3A は、hTREM1: PDBPDB 1SMO 上の PGLYRP1 リガンド結合部位の構造マッピングを示す。

20

【0454】

例 10: X線結晶学による 12172 ウサギ親 Fab ヒト TREM1 エピトープの決定結晶学

12172 抗体の正確なエピトープを同定するために、X線結晶学を使用した。ヒト TREM1 IgV ドメイン (配列番号 9) を、PBS、pH 7.4 中のウサギ親 Fab (1:1 モル比) と複合体化させ、サイズ排除に適用した。シャペロン Fab 11994 を hTREM1: Fab 複合体と 15 mg/ml で混合し、 4°C で 1 時間インキュベートした。タンパク質を、 $0.2 \text{ \mu l}$ タンパク質及び $0.1 \text{ \mu l}$ リザーバー Molecular Dimensions Proplex スクリーニング A6 (25% (w/V) PEG 1000、200 mM 塩化ナトリウム、100 mM 二塩基性リン酸カリウム／一塩基性リン酸ナトリウム pH 6.5) からなる懸滴蒸気拡散中で共結晶化させた。20% エチレングリコールを凍結保護に使用した。

30

【0455】

X線回折、データ収集、構造決定及び精密化

極低温 (100 K) X線回折データを APS 21-ID-F において遠隔で収集した。生データフレームは、XDS を使用してインデックス付け、統合、及びスケールングされた。結晶の空間群は I222 であり、単位格子パラメータは、 $2.60 \text{ \AA}$ の分解能に対して $a = 91.98 \text{ \AA}$ 、 $b = 139.10 \text{ \AA}$ 、 $c = 224.81 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ であった。構造の品質パラメータは、構造の全体的な R 因子 = 19.3% 及び遊離 R 因子 = 22.6% で良好であった。タンパク質複合体構造を COOT でモデル化し、TLS プロトコルを含む PHENIX を使用して精製した。水分子を添加し、COOT によって確認した。

40

【0456】

ウサギ親 Fab (12172) (配列番号 19 及び 23) と複合体化したヒト TREM1 IgV ドメイン (21~139 位) (配列番号 9) を、シャペロン Fab 分子 (11994) の存在下で得た。水素重水素交換質量分析法 (HDX-MS) を用いて、12172 匹のウサギの親 Fab の結晶学に使用された 11994 Fab シャペロンは、TREM1 への 12172 の結合に影響を及ぼさないことが確認された。結晶複合体の化学量論

50

は1：1：1であり、FabエピトープはhTREM1分子の両側に結合する。ヒトTREM1のIgV様ドメインとFab12172との間の4 Å以下の分子間距離の分析を、CCP4プログラム一式のプログラムNCNTを用いて行った。エピトープを以下のように結晶学的に決定した：残基E26～K32、Q35、T36、D38、K40、D42、R97、D127、T134及びG136（位置は配列番号1に対応する）。図3Bは、hTREM1：PDBPDB 1SMO上のFab 12172エピトープの構造マッピングを示す。このエピトープは、PGLYRP1のエピトープとは異なることが確認された（例9参照）。

【0457】

例11．完全長抗体12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P－哺乳動物細胞株の発達。
12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 Pの安定した発現を実証するために、安定して発現する哺乳動物細胞株を作製した。プラスミドベクター12172__g L 2__c k a p p a__g H 1 1__I g G 4 (p)をCHO細胞株にトランスフェクトした。細胞株をクローニングし、適切な製造プロセスへの適合について評価した。目的のタンパク質の品質及び量を評価し、最適な細胞株が選択されたことを確実にするために、細胞株を製造フィードバックバイオリアクターの小規模モデルで評価した。許容レベルで12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 Pを発現し、95%を超えるモノマーを含有するクローンCHO細胞株を選択した。

【0458】

例12．液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）による抗体分子の特性評価。
生成した12172 g L 2 g H 1 1 (h I g G 4 P及びh I G 1 L A L A)及び12172 g L 6 g H 6 (h I g G 4 P及びh I g G 1 L A L A)抗体分子の分子量（MW）を、Xevo G2 Q-ToF質量分析計を備えたWaters ACQUITY UPLCシステムを使用して、LC-MSによって無傷の分子（非還元）及び別個の重鎖及び軽鎖（還元）の両方で測定した。試料（約5 µg）を、150 mM酢酸アンモニウム中の5 mMトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）を用いて37℃で40分間還元した。非還元（インタクト）測定のために、試料をPBS pH7.4で同じ濃度に希釈し、分析前に上記のようにインキュベートした。LCカラムは、80℃に保持されたWaters BioResolve（商標）RP mAbポリフェニル、450 Å、2.7 µmであり、0.6 mL／分の流速で95%溶媒A（水／0.02%トリフルオロ酢酸（TFA）／0.08%ギ酸）及び5%溶媒B（95%アセトニトリル／5%水／0.02%TFA／0.08%ギ酸）で平衡化した。タンパク質を8.8分間にわたって5%～50%溶媒Bの勾配で溶出し、続いて95%溶媒Bで洗浄し、再平衡化した。UVデータを280 nmで取得した。MS条件は以下の通りであった：イオンモード：ESI正イオン、分解モード、質量範囲：400～5000 m/z及びNaIによる外部較正。

【0459】

Waters MassLynx（商標）及びMaxEnt Softwareを使用してデータを分析した。

【0460】

表18及び19に示すように、12172 g L 2 g H 1 1 (h I g G 4 P及びh I g G 1 L A L A)及び12172 g L 6 g H 6 (h I g G 4 P及びh I g G 1 L A L A)抗体分子の配列からの予測MWは、LC-MSによる無傷の分子並びに重鎖及び軽鎖についての測定MWと一致した。

【0461】

表18．12172 g L 2 g H 1 1及び12172 g L 6 g H 6 (h I g G 4 P及びh I g G 1 L A L A)抗体分子のインタクト（非還元）LC-MSデータ。

10

20

30

40

50

【表 1 8】

グラフト	フォーマット	インタクト抗体MW (Da)		
		期待値	観察	Δm
12172 gL2gH11	hIgG4P	147482.6	147485.0	2.4
	hIgG1 LALA	147624.9	147628.0	3.1
12172 gL6gH6	hIgG4P	147430.6	147433.0	2.4
	hIgG1 LALA	147572.9	147578.5	5.6

10

【 0 4 6 2 】

表 1 9 . 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 及び 1 2 1 7 2 g L 6 g H 6 （ h I g G 4 P 及
び h I g G 1 L A L A ） 抗体分子の L C - M S データの縮小。

【表 1 9】

グラフト	フォーマット	軽鎖MW (Da)			重鎖MW (Da)		
		期待値	観察	Δm	期待値	観察	Δm
12172 gL2gH11	hIgG4P	23651.2	23650.8	-0.4	50094.1	50095.4	1.3
	hIgG1 LALA	23651.2	23650.6	-0.6	50165.3	50166.4	1.1
12172 gL6gH6	hIgG4P	23622.2	23621.6	-0.6	50097.1	50098.2	1.1
	hIgG1 LALA	23622.21	23621.8	-0.4	50168.3	50169.4	1.1

20

【 0 4 6 3 】

例 1 3 . 熱安定性（Tm）測定。

融解温度（Tm）又はアンフォールディングの midpoint での温度を、（i）熱シフトアッセイ又は（ii）示差走査熱量測定（DSC）を使用して決定して、分子の立体配座安定性、したがって製造へのロバスト性及び長期安定性を評価した。

30

【 0 4 6 4 】

熱シフトアッセイ

熱シフトアッセイを早期のグラフトスクリーニング及び選択で行った（例 3 を参照のこと）。

【 0 4 6 5 】

蛍光色素 SYPRO（登録商標）オレンジを使用して、温度が上昇すると露出する疎水性領域に結合することによってタンパク質アンフォールディングプロセスを監視した。反応混合物は、試験緩衝液で 5000 倍濃縮物から希釈した 5 μL の 30×SYPRO（登録商標）Orange Protein Gel Stain（ThermoFisher scientific, S6651）を含有した。一般的な製剤前保存緩衝液（pH 7.4）中 0.2 mg/mL の試料 45 μL を色素に添加し、混合した。この溶液 10 μL を 384 PCR 光学ウェルプレートに四連で分注し、QuantStudio 7 リアルタイム PCR システム（ThermoFisher（商標））で実行した。PCR システム加熱デバイスを 20℃ に設定し、1.1℃/分の速度で 99℃ に上昇させた。電荷結合デバイスはウェルの蛍光変化を監視した。蛍光強度の増加をプロットし、勾配の変曲点を使用して見かけの midpoint 温度（Tm）を生成した。データを表 11 及び 12 に示す（例 3 参照）。

40

【 0 4 6 6 】

示差走査熱量測定（Differential Scanning Calorimetry、DSC）

50

示差走査熱量測定を使用して熱安定性を評価した。全ての試料を、一般的な製剤前保存緩衝液（pH 7.4又はpH 5.0、総体積400μL）で10μMに希釈し、96ウェルプレートに添加し、4,000×gで5分間遠心分離して気泡を除去した。プレートを、10～100℃から自動化されたMicroCal VP DSC（Malvern Panalytical）で、1℃/分の速度で、15分の走査前サーモスタット、8秒のフィルタリング期間及び受動フィードバックモードで運転した。手動ベースライン補正を用いてデータをバッファ減算し、Origin 7.0の非2状態モデルにデータを当てはめた。遷移中点（Tm）及びアンフォールディングの開始を以下の表20及び図4に示す。

【0467】

IgG4Pアイソタイプは3つのトランジションに適合し、IgG1 LALAは2つのトランジションに適合し、Fab及びCH3のアンフォールディングを区別することができなかった。熱安定性は、各アイソタイプについて予想範囲内であった。

【0468】

表20. 共通の製剤前保存緩衝液pH 7.4中の12172 gL2gH11及び12172 gL6gH6（hIgG4P及びhIgG1 LALA）の熱安定性データのまとめ。Tm1 = CH2アンフォールディング、Tm2 = Fabアンフォールディング、Tm3 = CH3アンフォールディング

【表20】

グラフト	フォーマット	熱安定性pH7.4(℃)			
		Tm1	Tm2	Tm3	発症
gL2gH11	hIgG4P	69.94	74.30	76.84	60.93
	hIgG1 LALA	72.86	80.81		65.76
gL6gH6	hIgG4P	69.72	74.08	76.67	61.20
	hIgG1 LALA	73.12	80.65		66.05

【0469】

例14. 実験的等電点（pI）測定。

実験pIは、12172 gL2gH11及び12172 gL6gH6についてhIgG4Pフォーマットと同様であることが分かった。これはhIgG1 LALA分子についても観察された。pIは、製造工程及び製剤緩衝液に良好であると予想される範囲内であった。異なる荷電種の存在は、他の治療分子の観察結果と一致し、リジンのC末端重鎖除去などの一般的な翻訳後修飾に起因していた。

【0470】

例15. 疎水性相互作用クロマトグラフィ（HIC）。

疎水性相互作用クロマトグラフィ（HIC）を使用して、hIgG4Pフォーマットとして12172 gL2gH11及び12172 gL6gH6の疎水性を測定した。HICは、疎水性が高い順に分子を分離する。分子は、高濃度の極性塩の存在下で疎水性固定相に結合し、塩の濃度が低下するにつれて移動相に脱着する。保持時間が長いほど、疎水性が高くなる。

【0471】

全ての分子が低い見かけの疎水性を示した（15分未満の保持時間）。12172 gL2gH11と12172 gL6gH6 hIgG4P分子との間に有意な差はなかった。同様に、hIgG1 LALA試料の疎水性保持時間に有意な差はなかった。hIgG4P分子は、対応するhIgG1 LALA分子と比較してわずかに遅い保持時間を示

した。

【0472】

例16. ポリエチレングリコール (PEG) 凝集アッセイを用いた溶解度測定。

PEG凝集アッセイを高濃度溶解度の模倣物として使用した。PEGは非吸着性の非変性ポリマーであり、その不活性な性質のために、主に排除された体積効果によってタンパク質沈殿を促進するために使用されてきた。試料を漸増濃度のPEG3350に曝露し、溶液中に残存する試料の量を、A280nmでの吸光度をプロットすることによって決定した。試料の半分が沈殿した%PEG濃度の測定は、PEG中点 (PEGmdpnt) スコアを生成した。このスコアにより、試験分子を見かけの天然の状態凝集傾向に基づいてランク付けすることができ、低いPEGmdpntスコア (例えば ≤ 10) は、天然の状態凝集の傾向がより大きいことを示す。

10

【0473】

ストック40%PEG3350 (Merck, 202444) 溶液 (w/v) を、一般的な製剤前保存緩衝液pH7.4及び5.0並びに一般的な製剤前緩衝液pH5.5) 中で調製した。ASSIST PLUS液体処理ロボット (INTEGRA 4505) によって連続滴定を行い、40%~15.4%の範囲のPEG3350を得た。非平衡沈殿を最小限に抑えるために、試料調製は、抗体及びPEG溶液を1:1の体積比で混合することからなった。35 μ LのPEG3350ストック溶液を、96ウェルv底PCRプレート (A1~H1) に液体処理ロボットによって添加した。35 μ Lの2mg/mL試料溶液をPEGストック溶液に添加して、1mg/mL試験濃度及び20%~7.7%の最終PEG3350濃度を得た。この溶液を自動化された低速反復ピペティングによって混合し、37°Cで0.5時間インキュベートして非平衡凝集体を再溶解した。次いで、試料を20°Cで24時間インキュベートした。その後、試料プレートを20°Cで1時間、4000 $\times$ gで遠心分離した。50 μ Lの上清をUV-Star (登録商標)、ハーフエリア、96ウェル、 μ Clear (登録商標)、マイクロプレート (Greiner, 675801) に分注した。タンパク質濃度を、FLUOstar (登録商標) Omegaマルチ検出マイクロプレートリーダー (BMG LABTECH) を使用して、280nmでのUV分光光度法によって決定した。得られた値を、Graphpadプリズム (バージョン7.04) を用いてプロットし、PEG中点 (PEGmdpnt) スコアは、シグモイド用量反応 (可変勾配) フィットの中間点から導出された。

20

30

【0474】

より高いPEG中間点 (%) がより高い溶解度と同等であるデータを表21に示す。

【0475】

試験した分子について緩衝液依存性溶解度が観察された。一般的な製剤前保存緩衝液pH7.4では、12172 g L2 g H11及び12172 g L6 g H6のアイソタイプ (hIgG4P及びhIgG1 LALA) の両方が低いPEG中点スコアを示し、高濃度での低い溶解度を示した。増加したPEG中点スコアは、一般的な製剤前保存緩衝液pH5緩衝液で観察された。特に、共通の製剤前緩衝液pH5.5中で製剤化した場合、全ての試料が実質的に改善されたPEG中点スコアを示した。hIgG1 LALA試料は、この緩衝液中のPEG3350の最高試験濃度で沈殿しなかった。

40

【0476】

表21. 共通の製剤前保存緩衝液pH7.4及び5.5、並びに共通の製剤前緩衝液pH5.5における12172 g L2 g H11及び12172 g L6 g H6 (hIgG4P及びhIgG1 LALA) についてのPEG凝集アッセイデータ。より高いPEG%中点=より高い高濃度溶解度。NB*試料は、最低試験濃度のPEG3350 (7.7%) で凝集の徴候を示したため、正確なPEG中間点を生成することができなかった。

50

【表 2 1】

グラフト	フォーマット	中間点%		
		一般的な 製剤前保存 緩衝液 pH7.4	一般的な製剤前緩衝液 pH5.5	一般的な製剤前保存 緩衝液 pH5
gL2gH11	hIgG4P	*<7.7	13.0	10.0
	hIgG1 LALA	*<7.7	>20	12.2
gL6gH6	hIgG4P	*<7.7	14.4	10.7
	hIgG1 LALA	*<7.7	>20	12.9

10

【0477】

例17. AC-SINS（親和性捕捉自己相互作用ナノ粒子分光法）を用いたタンパク質-タンパク質自己相互作用の評価。

AC-SINSアッセイを使用して、タンパク質-タンパク質自己相互作用傾向を決定することによって、12172 gL2gH11及び12172 gL6gH6（hIgG4P及びhIgG1 LALAとして；例3も参照のこと）を含むヒト化分子の発達性をスクリーニングし、したがって潜在的な凝集安定性を知らせた。これは、一般的な製剤前保存緩衝液pH7.4で行った。

20

【0478】

ヤギ抗ヒトFcγ特異的捕捉抗体（Jackson ImmunoResearch）を20mM酢酸ナトリウム、pH4.3に緩衝液交換し、0.4mg/mLに希釈し、50μLを450μLのクエン酸塩安定化20nm金ナノ粒子（TedPella, USA）に添加し、室温で一晩放置した。結合ナノ粒子を55μLのPEGメチルエーテルチオール（平均Mn=2,000（Sigma #729140））で1時間ブロックし、21,000×gで6分間遠心分離し、上清を除去し、pH4.3の20mM酢酸ナトリウムに再懸濁して最終容量を150μLにした。

30

【0479】

抗体試料を共通の製剤前保存緩衝液pH7.4（180μL）中で22μg/mLに希釈し、222μg/mL（Jackson ImmunoResearch）で20μLの模擬上清及び200μLの非特異的全IgGに添加し、短時間ボルテックスし、72μLを96ウェルプレートに添加した。8μLのナノ粒子を各ウェルに添加した（n=4）。吸光度をBMGプレートリーダーで500～600nmから読み取り、ローレンツカーブ（RShiny）に適合させ、共通の製剤前保存緩衝液のみを試料から差し引いてΔλmaxを得た。

【0480】

データを表22に要約すると、より高いΔλmax（nm）値は、より高いタンパク質-タンパク質自己相互作用傾向に等しい。12172 gL2gH11及び12172 gL6gH6の両方に対するhIgG1 LALA分子は、より低いΔλmax（nm）によって示されるように、対応するhIgG4P分子よりも低い自己相互作用を示すことが見出された。更に、12172 gL6gH6（hIgG4P及びhIgG1 LALA）分子は、12172 gL2gH11（hIgG4P及びhIgG1 LALA）分子よりもわずかに低いΔλmax（nm）値を示した。

40

【0481】

表22. 12172 gL2gH11及び12172 gL6gH6（hIgG4P及びhIgG1）についての自己相互作用測定（AC-SINS）。低い値＝タンパク質-タンパク質の自己相互作用が少ない。

50

【表 2 2】

グラフト	フォーマット	$\Delta\lambda$ max (nm)
gL2gH11	hIgG4P	13.15
	hIgG1 LALA	5.970
gL6gH6	hIgG4P	8.58
	hIgG1 LALA	3.93

10

【0 4 8 2】

例 1 8 . k_D 相互作用パラメータ測定 (コロイド安定性)

k_D 相互作用パラメータを使用してコロイド安定性を評価し、正及び負の値はそれぞれ反発力及び引力分子間力に関連する。

【0 4 8 3】

動的光散乱 (DLS) を DynaPro III プレートリーダー (Wyatt Technology Corp, Santa Barbara, CA, USA) で行った。試料を共通の製剤前保存緩衝液 pH 7. 4 で希釈するか、又は緩衝液を共通の製剤前保存緩衝液 pH 5. 0 に交換し、1 mg / mL ずつ 7 mg / mL から 1 mg / mL に希釈した。緩衝液を含むウェルを溶媒オフセットとして選択し、測定を 25 °C で行い、レーザー出力を 20 % に設定し、自動減衰を有効にした。各測定は、3 回 (5 × 3) の 5、5 秒のスキップの平均であった。拡散係数を測定し (D_m)、相互作用パラメータ (k_D) を以下の式に従って計算した (式中、 D_0 は無限希釈時の拡散係数を表す)。

20

$$D_m = D_0 (1 + K_D C)$$

式 : Y 切片での Debye プロットによって与えられる D_0 。傾き = $k_D * D_0$

【0 4 8 4】

拡散係数は、タンパク質濃度及びコロイド安定性を評価するために使用される k_D の関数として測定され、正の値及び負の値は、それぞれ反発力及び引力分子間力を示唆する。引力 / 自己会合を示す試料の場合、拡散係数はタンパク質濃度の関数として大きくなり、これは負の k_D 値に反映される。データを表 2 3 に示す。

30

【0 4 8 5】

k_D 相互作用パラメータは、共通の製剤前保存緩衝液 pH 5 中の hIgG4P 及び hIgG1 LALA 分子の両方について、共通の製剤前保存緩衝液 pH 7. 4 中で得られたデータと比較して、より陰性でない (よりコロイド的に安定である) ことが示された。hIgG1 LALA 分子は、対応する hIgG4P 分子よりも安定であることが示された。更に、12172 gL6gH6 (hIgG4P 及び hIgG1 LALA) 分子は、12172 gL2gH11 (hIgG4P 及び hIgG1 LALA) よりもわずかに大きいコロイド安定性を示した。このデータは、AC-SINS アッセイから生成されたデータを確認した (例 1 7 参照)。

40

【0 4 8 6】

表 2 3 . 12172 gL2gH11 及び 12172 gH6gL6 に対する k_D 相互作用パラメータデータ (hIgG4P 及び hIgG1 LALA)。より大きな負の値 = より大きな引力 (より高いタンパク質-タンパク質自己相互作用)。

50

【表 2 3】

グラフト	フォーマット	ml/g	
		PBS	Ac pH 5
gL2gH11	hIgG4P	-14.7	-7.6
	hIgG1 LALA	-10.8	-5.1
gL6gH6	hIgG4P	-12.4	-5.5
	hIgG1 LALA	-9.8	-4.1

10

【0 4 8 7】

例 1 9．凝集安定性に対する機械的ストレスの影響（凝集アッセイ）。

タンパク質は、疎水性表面を疎水性環境（空気）に現し、親水性表面を親水性環境（水）に現す空気－液体界面にさらされると、アンフォールドする傾向がある。タンパク質溶液の攪拌は、凝集を促進することができる大きな気液界面を達成する。このアッセイは、製造（例えば、限外濾過）中に分子が受けるストレスを模倣し、異なる抗体分子を区別しようとするためにストリンジェントな条件を提供するのに役立つ。

【0 4 8 8】

E p p e n d o r f T h e r m o m i x e r C o m f o r t（商標）を使用してボルテックスすることによって、一般的な製剤前保存緩衝液 pH 7. 4 又は pH 5 中の試料にストレスを与えた。ボルテックスする前に、適切な吸光係数（h I g G 1 L A L A 及び h I g G 4 P についてそれぞれ 1. 4 2 及び 1. 4 3 A b 2 8 0 n m、1 m g / m L、1 c m の経路長）及び V a r i a n C a r y（登録商標）5 0 - B i o 分光光度計を使用して得られた 5 9 5 n m の吸光度を使用して濃度を 1 m g / m L に調整して、時間 0 の読み取り値を確立した。各試料を 1. 5 m L コニカル E p p e n d o r f（登録商標）型キャップ付きチューブ（3 × 2 5 0 μ L）に細分し、1 4 0 0 r p m、2 5 ° C で 2 4 時間ボルテックスした。V a r i a n C a r y（登録商標）5 0 - B i o 分光光度計を使用して、ボルテックス後 3 時間及び 2 4 時間に試料を 5 9 5 n m で測定することによって、凝集（濁度）を監視した。データを表 2 4 に要約する。

20

【0 4 8 9】

1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 及び 1 2 1 7 2 g L 6 g H 6（h I g G 4 P 及び h I g G 1 L A L A）の両方が、ボルテックス後 3 時間で両方の緩衝液（一般的な製剤前保存緩衝液 pH 7. 4 及び pH 5）において良好な凝集安定性を示し、すなわち、5 9 5 n m で濁度は観察されなかった。2 4 時間で、1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 及び 1 2 1 7 2 g L 6 g H 6（h I g G 1 L A L A）が両方の緩衝液中の対応する h I g G 4 P 分子よりも大きい凝集安定性を示した分子を区別することができた。h I g G 4 P 分子では、p H 5 と比較して、p H 7. 4 の一般的な製剤前保存緩衝液でより大きな凝集安定性が観察された。1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 及び 1 2 1 7 2 g L 6 g H 6（h I g G 4 P 及び h I g G 1 L A L A として）は、製造中の剪断応力条件、例えば限外濾過に対して凝集安定であることが想定されるであろう。

30

40

【0 4 9 0】

表 2 4．共通の製剤前保存緩衝液 pH 7. 4 及び pH 5 中の 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 及び 1 2 1 7 2 g L 6 g H 6（h I g G 4 P 及び h I g G 1）に対する気液界面での応力の影響（5 9 5 n m の濁度）。

50

【表 2 4】

グラフト	フォーマット	OD 595nm			
		pH 7.4		pH 5	
		3時間	24時間	3時間	24時間
gL2gH11	hIgG4P	0.06	0.87	0.21	1.48
	hIgG1 LALA	0.00	0.06	0.00	0.06
gL6gH6	hIgG4P	0.01	0.67	0.20	1.68
	hIgG1 LALA	0.00	0.13	0.01	0.03

10

【0491】

例 20. 12172 gL2gH11 (hIgG4P 及び hIgG1 LALA) についての異なる濃度での粘度評価。

高い抗体濃度での低粘度は、治療用分子の皮下投与に重要であり、したがって、皮下投与に対する適合性を評価するために、一般的な製剤前緩衝液 (pH 5) 中の漸増濃度での粘度を得た。これを 12172 gL2gH11 (hIgG4P 及び hIgG1 LALA) について測定した。

20

【0492】

試験は、以下に詳述するように、(i) 試料の初期濃度及び (ii) 粘度測定によって実施した。

【0493】

12172 gL2gH11 (hIgG4P 及び hIgG1 LALA) の濃度。

一般的な製剤前保存緩衝液 pH 5.0 中の 12 mL の 12172 gL2gH11 hIgG4P (15.2 mg/mL) 及び 11 mL の 12172 gL2gH11 IgG1 LALA (15.5 mg/mL) を、Vivaspin 20 MWCO 30 kDa 遠心フィルタ (Z14637、Sigma-Aldrich) を用いて 4000×g、20℃ で濃縮した。約 750 µL の体積が得られるまで試料を遠心分離した。保持液を回収し、得られた抗体濃度を、280 nm での UV 吸光度測定 (NanoDrop (商標) 1000) を使用して決定した。12172 gL2gH11 hIgG4P については 1.43 mL / (mg · cm) 及び 12172 gL2gH11 IgG1 LALA については 1.42 mL / (mg · cm) の消光係数を使用した。

30

【0494】

次いで、一般的な製剤前保存緩衝液 pH 5.0 を用いて抗体試料を希釈して、粘度試験に適した濃度範囲を得た。希釈した抗体の濃度を、280 nm での UV 吸光度の再測定によって確認した。濃度は、12172 gL2gH11 hIgG4P については 158 mg/mL、94 mg/mL 及び 52 mg/mL、並びに 12172 gL2gH11 hIgG1 LALA については 144 mg/mL、100 mg/mL 及び 45 mg/mL であることが分かった。

40

【0495】

12172 gL2gH11 (hIgG4P 及び hIgG1 LALA) の粘度測定。

各濃度での粘度は、温度制御のためのペルチェプレート及び液体冷却システム、並びに測定のための 20 mm のステンレス鋼平行板形状を備えた Discovery Hybrid Rheometer-1 (DHR-1, TA Instruments) を使用して測定した。試料 (80 µL) をペルチェプレートの中心に置き、2.87918 ~ 287.918 s⁻¹ の様々な剪断速度で 20℃ に設定した定常状態フロースイープ手順で粘度 (mPa · s、又は cP) を測定した。各剪断速度点の値が一定 (SD ± 5%) である場合、測定された粘度を平均した。異なる濃度の 12172 gL2gH11 hI

50

g G 4 P 及び 1 2 1 7 2 h I g G 1 L A L A 分子の両方を、装置を使用して測定して、試料濃度に関する粘度の変化を観察した。結果を表 2 5 にまとめる。

【 0 4 9 6 】

1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P 及び 1 2 1 7 2 h I g G 1 L A L A 分子の両方が、濃度と粘性係数との間で増加傾向を示した。粘度は 1 . 2 ~ 4 . 1 c P に増加し、1 2 1 7 2 h I g G 4 P では 5 2 ~ 1 5 8 m g / m l の濃度であった。同様に、I g G 1 L A L A 分子の粘度は 1 . 4 ~ 5 . 4 c P に増加し、濃度は 4 5 ~ 1 4 4 m g / m l になった。これらの試料は全て、異なる剪断速度で一定の粘度係数（5 % 未満の変動性）を示した。この結果は、1 2 1 7 2 h I g G 4 P 及び 1 2 1 7 2 h I g G 1 L A L A が、より高い濃度で低い粘度レベルを示し、したがって、皮下投与に適している

10

【 0 4 9 7 】

表 2 5 . 一般的な製剤前保存緩衝液 p H 5 中、1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 (h I g G 4 P 及び h I g G 1 L A L A) の異なる濃度での 2 0 ° C での平均粘度（センチポアズ（c P））。

【表 2 5】

gL2gH11 IgG4P		gL2gH11 IgG1 LALA	
濃度(mg/mL)	粘度(cP)	濃度(mg/mL)	粘度(cP)
52	1.2	45	1.4
94	2.1	100	2.4
158	4.1	144	5.4

20

【 0 4 9 8 】

例 2 1 . ヒト T R E M 1 T H P 1 N F - κ B レポーター細胞株を使用した 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の機能活性の評価

この研究の目的は、1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P がヒト T R E M 1 を介した P G L Y R P 1 / P G N 媒介 N F - κ B シグナル伝達活性化を阻害する能力を評価することであった。これを行うために、T H P 1 単球 T R E M 1 / D A P 1 2 N F - κ B ルシフェラーゼレポーター細胞を使用した。これらの細胞は、ヒト T R E M 1 、ヒト D A P 1 2 及び N F - κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定に発現する。大腸菌（E . c o l i）由来の可溶性ペプチドグリカン（P G N）と複合体化した P G L Y R P 1 を T R E M 1 リガンドとして使用し、これは T R E M 1 に結合することによって N F - κ B 活性化を誘導する。T R E M 1 に結合しない P G N は、N F - κ B 活性化も誘導するが、程度は低い。代替シグナル伝達経路を介して誘導する。ルシフェラーゼ活性の阻害は、この系における 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の機能的遮断活性を実証する。

30

【 0 4 9 9 】

T H P 1 単球 T R E M 1 / D A P 1 2 N F - κ B ルシフェラーゼレポーター細胞を、標準的な組織培養技術を使用して、選択抗生物質（R P M I + 1 0 % F B S + 5 0 μ M 2 -メルカプトエタノール + 1 0 μ g / m l プラストサイジン + 1 μ g / m l ピューロマイシン + 2 0 0 μ g / m l ジェネティシン）を含有する完全培地中で培養した。アッセイ設定の 3 日前に、細胞を T 1 7 5 フラスコ内の 5 0 m l 完全培地（2 0 0 , 0 0 0 細胞 / m l）中に 1 0 × 1 0 ⁶ 細胞で播種し、インキュベータ内に平らに置いた。アッセイの日に、細胞をフラスコから取り出し、5 0 m l のファルコンに移し、3 0 0 × g で 5 分間遠心分離した。培地を除去し、細胞を 5 ~ 1 0 m l の完全培地に再懸濁し、計数した。次いで、細胞懸濁液を完全培地に添加することによって細胞を 1 × 1 0 ⁶ 細胞 / m l で再懸濁し、1 0 μ l / ウェルをアッセイプレート（C o r n i n g # 3 5 7 0）に添加した。1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P を、3 8 4 ウェル希釈プレート（G r e i n e r # 7 8 1 2 8 1）において、3 3 . 3 n M ~ 1 . 6 9 p M の最終アッセイ濃度範囲まで完全

40

50

培地で段階希釈した。次いで、12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の段階希釈物をアッセイプレート（10 μ l / ウェル）に移し、アッセイプレートを 37 $^{\circ}$ C / 5 % C O₂ で 1 時間インキュベートした。組換えヒト P G L Y R P 1（R & D S y s t e m s # 2 5 9 0 - P G B）を滅菌 D P B S 中室温で 1 時間 P G N（I n v i v o g e n # t l r l - k s s p g n）と複合体化させた。1 時間後、溶液を完全培地で希釈し、次いでアッセイプレート（10 μ l / ウェル）に移して、2.5 μ g / m l の P G L Y R P 1 及び 10 μ g / m l の P G N の最終アッセイ濃度にした。プレート対照（抗体を添加しない）には、それぞれアッセイ最大値及び最小値として、P G L Y R P 1 / P G N 複合体及び P G N 単独を含めた。次いで、アッセイプレートを 37 $^{\circ}$ C / 5 % C O₂ で 16 $\pm$ 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、ルシフェラーゼ活性を、S t e a d y G l o ルシフェラーゼアッセイシステム（P r o m e g a # E 2 5 2 0）を使用して測定した。S t e a d y - G l o 試薬を製造者の説明書に従って調製し、30 μ l / ウェルをアッセイプレートに添加した。次いで、プレートを 200 $\times$ g で 3 分間遠心分離し、次いで、S t e a d y G l o 試薬との総インキュベーション時間が 5 分になるように室温で更に 2 分間インキュベートした。次いで、S y n e r g y N e o 2 プレートリーダーを使用して発光を測定し、生の発光値を使用して、対照ウェルと比較した相対阻害率を決定した。4 P L カープフィッティング及び I C₅₀ 値の計算は、A c t i v i t y B a s e v 9.4 を使用して行った。

10

【0500】

表 26. 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の効力、有効性及び勾配値の要約
【表 26】

20

幾何平均 IC ₅₀ (pM) $\pm$ SD	平均 Emax (%) $\pm$ SD	平均傾き $\pm$ SD	N*
64 $\pm$ 36	72 $\pm$ 4	2.1 $\pm$ 0.9	3

*3つの独立した実験から値を計算した。

【0501】

例 22. 初代ヒト単球からの T R E M 1 媒介性炎症促進性サイトカイン及びケモカインの放出の遮断における 12172 抗体の有効性及び効力

30

T R E M 1 シグナル伝達を遮断する抗 T R E M 1 12172 変異体抗体の能力を評価するために、活性化された初代ヒト単球からの炎症促進性サイトカイン及びケモカインの放出を 12172 抗体処理後に測定した。単球を、ネガティブ選択（M i l t e n y i , 130-117-337）によって健康なヒトドナーの凍結保存末梢血単核細胞（P B M C）から単離した。単球の生存率及び純度をフローサイトメトリによって評価し、 $\geq$ 90 % を超えた。単球を 96 ウェルプレート（F a l c o n）に 5 $\times$ 10⁴ 細胞 / ウェルの密度で播種し、バチルスサブチリシン（B a c i l l u s s u b t i l i s）由来の予め複合体化されたペプチドグリカン（P G N - B S ; 3 μ g / m l ; I n v i v o g e n , t l r l - p g n b 3）及び組換えヒトペプチドグリカン認識タンパク質 1（P G L Y R P 1 ; 1 μ g / m l ; R & D S y s t e m s , 2 5 9 0 - P G B）で刺激して、T R E M 1 を活性化した。均一時間分解蛍光（登録商標）技術（H T R F（登録商標）；C i s b i o）による炎症促進性サイトカイン放出（T N F - α 、I L - 6、I L - 1 β ）の測定のために、24 時間後に細胞上清を回収した。

40

【0502】

表 27 に示されるように、12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P 変異体は、初代ヒト単球からの T N F - α （幾何平均 I C₅₀ = 15 p M）、I L - 6（幾何平均 I C₅₀ = 27 p M）及び I L - 1 β （幾何平均 I C₅₀ = 5 p M）の T R E M 1 媒介放出の阻害において最も強力であった。図 5 に示すように、初代ヒト単球における 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の効力が、ドナーにわたって観察された。

【0503】

50

TREM1 媒介性炎症促進性サイトカイン及びケモカイン放出の遮断における抗TREM1 12172 変異体抗体の能力を更に評価するために、抗TREM1 抗体 (1 nM) で処理し、プレ複合体化したPGN-BS/PGLYRP1で活性化した初代ヒト単球からの上清を、2つのマルチプレックス免疫アッセイ:MILLIPLEX (登録商標) Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A (Merck Millipore, HCYTA-60K-PX48) 及びカスタムLegendPlexパネル (Biolegend) を使用して定量的に分析した。

【0504】

表28に示すように、異なる12172の抗体変異体によるTREM1の阻害は、活性化初代ヒト単球 (n=4ドナー) からの複数のサイトカイン及びケモカイン (CCL-3、CCL-20、CXCL-9、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12p40、IL-15、IL-18、IL-27、TNF- α 、TNF- β) の放出を強く減少させた。12172 gL2gH11 hIgG4P 変異体は最も有効な12172 変異体であり、パーセント阻害値は57~110%の範囲であった。図6に示されるように、12172 gL2gH11 hIgG4Pは、ドナーにわたる初代単球からのIL-1経路の負の調節因子であるIL-1Rアンタゴニスト (IL-1RA) の放出を有意に増加させた。IL-1RAは、重篤な全身性自己免疫疾患に関連する単遺伝的 (低レベルのIL-1RAを引き起こす変異) である。IL-1RNにおける一塩基多型 (IL-1RAをコードする) がALS患者において特定されている。より高い循環IL-1RAレベルは、ALSのより低いリスクと有意に関連する (Yuan et al. 2020 Eur J Neurol)。IL-1RAレベルもまた、健康対照と比較してAD患者の脳脊髄液において有意に低下している (Tarkowski et al. 2001 Dement Geriatr Cogn Disord)。12172 gL2gH11 hIgG4Pとは対照的に、先行技術の抗TREM1 抗体 (0318-IgG1.3f) は、一次単球からのIL-1RA放出に影響を及ぼさなかった。

【0505】

表27. TNF- α 、IL-6及びIL-1 β 放出に対する異なる12172種の変異体の効力

【表27】

	TNF- α (n=4)	IL-6 (n=4)	IL-1 β (n=2)
概要	Geo IC50 (pM)	Geo IC50 (pM)	Geo IC50 (pM)
12172 gL2gH11 hIgG4P	15	27	5
12172 gL6gH6 hIgG4P	26	36	28
12172 gL2gH11 hIgG1 LALA	43	112	32
12172 gL6gH6 hIgG1 LALA	54	178	25

【0506】

表28. サイトカイン及びケモカインの放出に対する異なる12172 抗体変異体の有効性 (阻害率)

10

20

30

40

50

【表 2 8】

	12172 gL2gH11 hIgG4P	12172 gL6gH6 hIgG4P	12172 gL2gH11 hIgG1 LALA	12172 gL6gH6 hIgG1 LALA
CCL-3	57	38	48	26
CCL-20	69	56	65	66
CXCL-9	77	73	72	68
G-CSF	92	88	89	86
GM-CSF	91	89	91	89
IFN- γ	59	57	60	53
IL-1 α	110	107	112	110
IL-1 β	98	96	96	97
IL-6	64	57	58	55
IL-10	86	83	77	73
IL-12p40	96	96	96	95
IL-15	78	69	86	92
IL-18	87	78	85	81
IL-27	81	57	88	74
TNF- α	94	93	94	94
TNF- β	65	63	62	60

【0507】

例 2 3：非刺激初代ヒト単球からの IL-1RA 放出の増加における 12172 gL2gH11 hIgG4P の有効性及び効力

12172 gL2gH11 hIgG4P が、TREM1 リガンド刺激ヒト単球からの IL-1RA の放出を有意に増加させたことを観察して、非刺激ヒト単球からの IL-1RA 放出に対するその効果も評価した。ヒト単球を単離し、例 22 で前述したように播種し、抗体を 24 時間加えた後、IL-1RA Quantikine ELISA キット (R&D Systems) を用いて IL-1RA 測定のための上清を回収した。

【0508】

表 29 及び図 7 に示すように、12172 gL2gH11 hIgG4P は、刺激されていない初代ヒト単球において IL-1RA の放出を用量依存的に増加させた。12172 gL2gH11 hIgG4P とは対照的に、別の先行技術の抗 TREM1 抗体 (0318-IgG1.3f) は、刺激されていない初代ヒト単球からの IL-1RA 放出に影響を及ぼさなかった。

【0509】

表 29：非刺激初代ヒト単球からの IL-1RA 放出の増加における 12172 gL2gH11 hIgG4P 及び 0318-IgG1.3f の有効性及び効力。

【表 29】

	12172 gL2gH11 hIgG4P		0318-IgG1.3f	
	増加%	IC50 (pM)	増加%	IC50 (pM)
ドナー A	n.d.		n.d.	
ドナー B	50	54	n.d.	
ドナー C	83	624	n.d.	
ドナー D	35	30	n.d.	

*n. d. = 検出不能

【0510】

例 24. アルツハイマー病 (AD) 及び筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の PBMC からの TREM1 媒介炎症促進性サイトカイン及びケモカイン放出の遮断における 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の有効性

AD 及び ALS における神経変性及び神経炎症は、患者の CSF 及び血液における複数の炎症促進性サイトカイン及びケモカインの上昇したレベルに関連する。例えば、TNF- α 、IL-6 及び IL-1 β のレベルは、ALS 患者の血液中で有意に増加し (Hu et al., 2017 Sci Rep)、一方、CCL-3、G-CSF 及び TNF- α は、ALS 患者の CSF 中で上昇し (Chen et al., 2018 Front Immunol)、全ての因子は、ヒト単球において TREM1 阻害によって減少することが観察された。

10

【0511】

患者由来細胞における TREM1 シグナル伝達を遮断する抗 TREM1 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の有効性を評価するために、炎症促進性サイトカイン及びケモカインの放出を、TREM1 活性化後の AD 及び ALS 患者由来の PBMC において測定した。PBMC を、AD 患者及び ALS 患者並びに対応する一致した健康対照の全血からの密度勾配遠心分離によって単離した。PBMC を 96 ウェルプレート (Falcon) に 1×10^5 細胞/ウェルの密度で播種し、12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P (1 nM) で 1 時間前処理し、バチルスサブチリシン (Bacillus subtilis) 由来の予め複合体化されたペプチドグリカン (PGN-BS; 3 μ g/ml; Invivogen, tlr l-pgn b3) 及び組換えヒトペプチドグリカン認識タンパク質 1 (PGLYRP1; 1 μ g/ml; R&D Systems, 2590-PGB) で刺激して、TREM1 を活性化した。均一時間分解蛍光 (登録商標) 技術 (HTRF (登録商標); Cisbio) 及び MILLIPLEX (登録商標) Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A (Merck Millipore, HCYTA-60K-PX48) を用いて、炎症誘発性サイトカイン及びケモカイン放出を測定するために、24 時間後に細胞上清を回収した。

20

【0512】

図 8 及び表 30 に示すように、12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P は、AD 患者の PBMC からの TREM1 媒介 TNF- α 放出 (66% $\pm$ 15 の阻害) 及び IL-6 放出 (70% $\pm$ 17) を阻害するのに有効であった。図 9 及び表 31 に示されるように、12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P はまた、ALS 患者の PBMC からの TREM1 媒介 TNF- α 放出 (72% $\pm$ 7 の阻害) 及び IL-6 放出 (69% $\pm$ 9) を阻害することにおいて有効であった。図 10 に示されるように、12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P による TREM1 の阻害はまた、ALS PBMC (n=4 のドナーの代表) 及び AD PBMC (n=5 のドナーの代表) からの多数のサイトカイン及びケモカイン (CCL-3、CCL-4、CCL-20、CCL-22、CXCL-9、G-CSF、GM-CSF、GRO- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-12 p40、TNF- α) の放出を強く低下させた。

30

【0513】

表 30: 健康対照及び AD PBMC からの TNF- α 及び IL-6 放出に対する 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の有効性

40

【表 30】

	TNF- α		IL-6	
	阻害%	S.D.	阻害%	S.D.
健康対照 (HC) n=8	79	16	85	18
アルツハイマー病 (AD) n=8	66	15	70	17

【0514】

表 31: 健康対照及び ALS PBMC からの TNF- α 及び IL-6 放出に対する 1

50

2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の有効性
【表 3 1】

	TNF- α		IL-6	
	阻害%	S.D.	阻害%	S.D.
健康対照 (HC) n = 4	59	13	56	19
筋萎縮性側索硬化症 (ALS) n = 4	72	7	69	9

【0515】

例 25. TREM1 リガンド複合体又はアポトーシス i P S C 由来ヒト運動ニューロンによる刺激及び 1 2 1 7 2 抗体変異体による処理後のヒト単球のトランスクリプトームプロファイル

抗 TREM1 1 2 1 7 2 抗体変異体の細胞プロファイルを更に特徴付けるために、TREM1 リガンド複合体又はアポトーシス誘導多能性幹細胞 (i P S C) 由来のヒト運動ニューロン (ALS 疾患関連リガンド) で刺激したヒト単球に対してトランスクリプトーム分析を行った。単球を、ネガティブ選択 (Miltenyi, 130-117-337) によって健康なヒトドナー (n = 8) の凍結保存末梢血単核細胞 (PBMC) から単離した。単球の生存率及び純度をフローサイトメトリによって評価し、 $\geq 90\%$ を超えた。単球を 6 ウェルプレート (Falcon) にウェル当たり 2×10^6 細胞の密度で播種し、1 2 1 7 2 抗体変異体 (1 nM) で 1 時間前処理した。次いで、単球を、(i) バチルスサブチリシン (Bacillus subtilis) 由来のプレ複合体化ペプチドグリカン (PGN-BS; $3 \mu\text{g}/\text{ml}$; Invivogen, tlrl-pgnb3) 及び組換えヒトペプチドグリカン認識タンパク質 1 (PGLYRP1; $1 \mu\text{g}/\text{ml}$; R&D Systems, 2590-PGB) で 4 時間刺激して、TREM1 を活性化するか、又は (ii) 紫外光誘導アポトーシス i P S C 由来ヒト運動ニューロンを活性化した。RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を使用して RNA を単離し、Experion (商標) RNA 分析キット (Bio-Rad) を使用して RNA の質を評価した。配列決定ライブラリを、NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を使用して調製し、試料を、Illumina NovaSeq 6000 を使用して配列決定した。

【0516】

図 11 (A 及び B) 及び表 3 2 に示すように、TREM1 リガンド複合体刺激後、1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 及び 1 2 1 7 2 g L 6 g H 6 の h I g G 4 P フォーマットで、最大数の有意な差次的発現遺伝子 (DEG) が観察された。上位 DEG の中で、2 つの 1 2 1 7 2 h I g G 4 P 抗体も同様のトランスクリプトームプロファイルを示した (例えば、HERC5、OAS1、DDX58、TNF- α のダウンレギュレーション)。これらのプロファイルは、先行技術の抗 TREM1 抗体 (0318-IgG1.3f) とは対照的であった (図 11C)。更に、表 3 3 に示すように、0318-IgG1.3f 処理単球と比較した場合、1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P 処理単球では、111 の遺伝子が有意に上方制御され、121 の遺伝子が有意に下方制御された。

【0517】

表 3 2. 1 2 1 7 2 の抗体変異体によるヒト単球の処理及び (リガンド又はアイソタイプコントロールと比較した) TREM1 リガンド複合体による刺激後の、0.05 の偽発見率 (FDR) を考慮した、示差的に発現した遺伝子 (DEG) の数。

10

20

30

40

50

【表 3 2】

		上方制御遺伝子		下方制御遺伝子	
		Ab／リガンド	Ab／アイソタイプ	Ab／リガンド	Ab／アイソタイプ
12172 gL2gH11	hIgG4P	6	19	4	86
	hIgG1 LALA	0	0	0	0
12172 gL6gH6	hIgG4P	20	71	63	255
	hIgG1 LALA	9	10	47	9
0318-IgG1.3f		9	99	38	82

10

【0 5 1 8】

表 3 3 . T R E M 1 リガンド複合体でヒト単球を刺激した後の 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P と 0 3 1 8 - I g G 1 . 3 f との間の 0 . 0 5 の F D R を考慮した D E G の数。

【表 3 3】

12172 gL2gH11 hIgG4P:0318-IgG1.3f	
上方制御遺伝子	下方制御遺伝子
111	121

20

【0 5 1 9】

図 1 2 (A 及び B) 及び表 3 4 に示されるように、アポトーシス i P S C 由来ヒト運動ニューロンによる刺激の後では、T R E M 1 リガンド複合体刺激と比較して、より多くの D E G が存在した。上位 D E G の中で、2 つの 1 2 1 7 2 h I g G 4 P 抗体は、例えば、C C R 2 の下方制御及び I L - 1 R A をコードする遺伝子である I L - 1 R N の上方制御を含むいくつかの重複を示した。対照的に、上位 D E G は先行技術の抗 T R E M 1 抗体 (0 3 1 8 - I g G 1 . 3 f) とは異なり (図 1 2 C) 、この抗体では I L - 1 R N の有意な上方制御は観察されなかった。更に、表 3 5 に示すように、0 3 1 8 - I g G 1 . 3 f 処理単球と比較した場合、1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P 処理単球では、5 9 8 個の遺伝子が有意に上方制御され、8 0 8 個の遺伝子が有意に下方制御された。

30

【0 5 2 0】

表 3 4 . 1 2 1 7 2 抗体変異体によるヒト単球の処理及びアポトーシス i P S C 由来ヒト運動ニューロンによる刺激 (リガンド又はアイソタイプコントロールと比較) の後の、0 . 0 5 の F D R を考慮した D E G の数。

【表 3 4】

		上方制御遺伝子		下方制御遺伝子	
		Ab／リガンド	Ab／アイソタイプ	Ab／リガンド	Ab／アイソタイプ
12172 gL2gH11	hIgG4P	420	221	453	151
	hIgG1 LALA	563	64	728	19
12172 gL6gH6	hIgG4P	484	183	253	69
	hIgG1 LALA	836	280	725	29
0318-IgG1.3f		674	623	545	139

40

【0 5 2 1】

表 3 5 . ヒト単球をアポトーシス i P S C 由来ヒト運動ニューロンで刺激した後の、1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P と 0 3 1 8 - I g G 1 . 3 f との間の 0 . 0 5 の F D R を考慮した D E G の数。

50

【表 3 5】

12172 gL2gH11 hIgG4P:0318-IgG1.3f	
上方制御遺伝子	下方制御遺伝子
598	808

【0522】

例 26．初代ヒト単球及び好中球による TREM1 媒介食作用及び活性酸素種 (ROS) の産生の遮断における 12172 抗体の有効性

抗微生物免疫応答に対する TREM1 シグナル伝達の遮断の影響を評価するために、全血中の活性化初代ヒト単球及び好中球からの食作用及び ROS 産生の両方をフローサイトメトリによって評価した。ROS 産生を調べるために、ジヒドロクロロダミン-123 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を健康なヒトドナーからの血液 (25 μL) に 5 分間添加した後、12172 gL2gH11 hIgG4P 又は 0318-IgG1.3f 抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と更に 30 分間プレインキュベートした。次いで、全血試料を 1×10^6 mCherry 発現細菌と共に 1 時間培養した。試料を洗浄し、CD45 及び CD14 に対する表面抗体で染色して、フローサイトメトリによって好中球及び単球を識別した。

10

【0523】

図 13 に示すように、12172 gL2gH11 hIgG4P 変異体は、好中球又は単球による細菌クリアランスを損なわず、活性酸素種を産生する能力にも影響しなかった。対照的に、0318-IgG1.3f の分析は、好中球及び単球の両方による大腸菌 (E. coli) 誘導 ROS 産生の有意な減少を明らかにした。両方の免疫細胞型の食作用能は、0318-IgG1.3f によって有意に影響されなかった。

20

【0524】

例 27：脾臓チロシンキナーゼ (SYK) の TREM1 媒介活性化の遮断における 12172 抗体の有効性及び効力

TREM1 とそのアダプタータンパク質 DAP-12 との会合は、DAP-12 のリン酸化並びにその後の脾臓チロシンキナーゼ (SYK; Carrasco et al. 2018 Cell Mol Immunol) の動員及びリン酸化をもたらす。SYK は、以前に TREM1 媒介性神経炎症性損傷の駆動に関与しており (Xu et al. 2019 Cell Death Dis)、アミロイド β 沈着及び病理学的タウ種の形成後に活性化されることが知られている (Schweig et al. 2017 Acta Neuropathol Commun)。TREM1 媒介 SYK 活性化を遮断する抗 TREM1 12172 変異体抗体の能力を評価するために、ヒト TREM1 及びヒト DAP-12 を安定に発現する Flp-In (商標) 293 細胞において、リン酸化 SYK (pSYK) レベルを測定した。細胞を 25,000 細胞/ウェルの密度で 384 ウェルプレート (Greiner) に播種し、12172 変異体抗体又はアイソタイプ抗体で 1 時間前処理し、大腸菌 (Escherichia coli) (PGN-EC; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Invivogen, tlr1-pgnb3) 由来の予め複合体化されたペプチドグリカン及び組換えヒトペプチドグリカン認識タンパク質 1 (PGLYRP1; 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; R&D Systems, 2590-PGB) で刺激して、TREM1 を活性化した。AlphaLISA SureFire Ultra p-SYK (Tyr 525/526) Assay Kit (登録商標) (PerkinElmer) を使用して pSYK レベルを測定するために、タンパク質溶解物を 30 分後に収集した。

30

40

【0525】

表 36 及び図 14 に示すように、4 つの 12172 変異体抗体は全て、TREM1 活性化後の SYK 活性化の遮断において効率的 ($E_{\text{max}} = 57 \sim 72\%$) であり、強力 ($357 \sim 1015 \text{ pM}$) であったが、A33 アイソタイプ抗体は活性を示さなかった。

【0526】

表 36．hTREM1/hDAP-12 Flp-In 293 細胞における SYK 活性化の遮断における 12172 変異体抗 TREM1 抗体の有効性及び効力 (ND - 検出不能

50

)

【表 3 6】

	hTREM1/hDAP-12 Flp-In 293:pSYK阻害	
概要	E _{max} (%)	IC ₅₀ (pM)
12172 gL2gH11 hIgG4P	63	1015
12172 gL6gH6 hIgG4P	57	357
12172 gL2gH11 hIgG1 LALA	72	372
12172 gL6gH6 hIgG1 LALA	79	960
A33 hIgG1	ND	ND
A33 hIgG4P	ND	ND

10

例 2 8 : 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P 細胞表面 T R E M 1 親和性測定

生細胞上に発現したヒト又はカニクイザル T R E M 1 への 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P 結合の動態を、L i g a n d T r a c e r を用いて 2 5 ° C で測定した。2 つの H E K 2 9 3 ポリクローナル細胞株を、ヒト又はカニクイザルのいずれかの T R E M 1 を発現するために社内で開発し、親の正常な接着性 H E K 2 9 3 を対照細胞として使用した。3 つ全ての細胞型を、ウシ胎児血清 (I n v i t r o g e n , 1 0 0 8 2) 、 G l u t a M A X (G i b c o , 3 5 0 5 0 0 6 1) を補充した増殖培地 D M E M (G i b c o , 2 1 9 6 9 - 0 3 5) 中で維持し、T R E M 1 ポリクローナル細胞株における選択を維持するために、0 . 5 m g / m l の G e n e t i c i n (G i b c o , 1 0 1 3 1 - 0 2 7) を更に含めた。実験の前日に、製造者の説明書に従ってポリ-D-リジン (G i b c o , A 3 8 9 0 4 - 0 1) で予めコーティングした L i g a n d T r a c e r M u l t i D i s h 2 × 2 (R i d g e v i e w , 1 - 0 4 - 2 0 4 - 5) の各 1 / 4 に 1 . 4 × 1 0 ⁶ 個の細胞を播種し、3 7 ° C / 5 % C O ₂ で一晩インキュベートした。T R E M 1 発現細胞を各ディッシュ区画の 1 / 4 に播種し、陰性発現対照細胞を他方に播種した。翌朝、培地を各皿区画 (半分) で正確に 1 . 8 m l の新鮮な増殖培地 (ジェネティシンなし) と交換し、L i g a n d T r a c e r 装置に入れた。回転を開始して、約 2 0 分間又は安定するまでベースライン読み取り値を記録した。回転を停止させ、A l e x a F l u o r 6 4 7 標識 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P (社内) を、予想される 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P K _D に近い濃度である 0 . 5 n M の濃度で添加した。回転を再開し、平衡度を示す湾曲が観察されるまで (約 2 時間かかる) 、細胞への抗体のリアルタイム結合を表す蛍光測定値を記録した。このようにして、1 . 5 n M 及び 5 n M で、それぞれ最後のものより約 3 倍高い抗体を更に 2 回添加した。最後に、抗体を含有する全ての培地を除去し、新鮮な培地と交換した。回転及び測定は、解離シグナルが少なくとも 1 0 % 低下するまで、又は解離が遅い場合は一晩続けた。親和性測定値は、L i g a n d T r a c e r 「T r a c e D r a w e r」ソフトウェア (バージョン 1 . 9 . 2) 内で分析及び計算した。T R E M 1 発現細胞への 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の結合についての生データ読み取り値を、対照細胞への結合から同等の読み取り値を差し引くことによって最初に正規化した。減算したトレースを、ソフトウェアの 1 : 1 結合モデルを使用して評価した。1 : 1 モデルがデータトレースに適切でない場合、代替モデルを検討した。1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P は、ヒト T R E M 1 に対して 1 6 . 5 p M の親和性及びカニクイザル T R E M 1 に対して約 3 0 0 倍弱いより弱い親和性を有することが示された。動態パラメータを表 3 7 に要約し、3 8 . 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P は、1 : 1 モデルによってよく表される結合を示した。遅い解離速度は、正確な範囲の限界に向かって、L i g a n d T r a c e r 装置が測定することは困難であるが、5 回の反復実験は同様のデータを与えた。カニクイザル T R E M 1 への 1 2 1 7 2 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の結合は、著しくより複雑であり、1 : 1 結合モデルに適合しなかった。1 : 2 モデル、又は 1 : 1 - 2 状態モデルは、データをより良く表し、類似の親和性値を与えたが (全てのデータが示されているわけではない) 、

20

30

40

50

これらの代替的な適合のうちのどれが結合を正しく記述するかを決定するためにさらなる実験が必要とされる。しかしながら、一般に、ヒト TREM1 と比較してカニクイザル TREM1 に対する 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P の親和性は、約 300 倍明らかに低下した。結論として、12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P は、細胞上の結合アビディティのために、可溶性ヒト TREM1 ECD（例 6）と比較して、細胞表面ヒト TREM1 に対してより強い親和性を示し、両方の方法（Biacore 及び Ligand Tracer）は、ヒト TREM1 と比較してカニクイザル TREM1 に対して 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P のかなり弱い親和性を示した。

【0527】

表 37. ヒト TREM1 への 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P 結合の速度論的パラメータ。U 値は、データに対する適合モデルの品質を表す。10%未満の低い U 値は良好な適合と考えられ、20%を超える値は不良と考えられる。

【表 37】

1:1フィットモデル	k_a (1/(M*s))	k_d (1/s)	K_D (pM)	U値: k_d (%)
N=1	3.50E+05	6.80E-06	19.4	3.6
N=2	3.56E+05	8.89E-06	25.0	4.3
N=3	2.44E+05	3.71E-06	15.2	10.4
N=4	2.38E+05	2.97E-06	12.5	3.8
N=5	4.43E+05	5.88E-06	13.3	5.7
平均	3.26E+05	5.65E-06	17.1	
SD	8.61E+04	2.39E-06	5.2	
幾何平均	3.17E+05	5.23E-06	16.5	

【0528】

表 38. カニクイザル TREM1 への 12172 g L 2 g H 1 1 h I g G 4 P 結合の速度論パラメータ。U 値は、データに対する適合モデルの品質を表す。10%未満の低い U 値は良好な適合と考えられ、20%を超える値は不良と考えられる。1:2モデルは、2つの寄与する結合事象を記述する2組の親和性値を生成する。

【表 38】

1:2フィットモデル	$k_a 1$ (1/(M*s))	$k_d 1$ (1/s)	$K_D 1$ (pM)	$k_a 2$ (1/(M*s))	$k_d 2$ (1/s)	$K_D 2$ (pM)	U値: k_d (%)
N=1	8.87E+05	7.58E-03	8550	1.08E+05	8.69E-06	80.8	17.7
N=2	3.12 E+05	1.84 E-03	5910	7.27 E+04	3.08 E-05	423	4
N=3	4.69E+05	1.92E-03	4090	5.97E+04	3.13E-05	524	3.6
N=4	3.00 E+05	1.78 E-03	5940	5.97 E+04	2.36 E-06	39.5	11.8
N=5	7.06 E+05	1.90 E-03	2690	3.27 E+04	4.03 E-06	124	6.5
平均	6.78E+05	4.75E-03	5436	8.39E+04	2.00E-05	238	
SD	2.96E+05	4.00E-03	2210	3.42E+04	1.60E-05	220	
幾何平均	6.45E+05	3.81E-03	5055	8.03E+04	1.65E-05	154	

【0529】

特許、特許出願、論文、教科書等を含む本明細書に引用された全ての参考文献、及びそれらに引用された参考文献は、それらがまだ存在しない限り、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【配列表フリーテキスト】

【0530】

配列表 17 <223>ウサギ Ab 12172 VL 領域

配列表 18 <223>ウサギ Ab 12172 VL 領域

配列表 19 <223>CID102770:ウサギ Ab 12172 軽鎖 (Fab)

配列表 20 <223>ウサギ Ab 12172 軽鎖

配列表 2 1	< 2 2 3 > ウサギ A b 1 2 1 7 2 V H 領域	
配列表 2 2	< 2 2 3 > ウサギ A b 1 2 1 7 2 V H 領域	
配列表 2 3	< 2 2 3 > C I D 1 2 0 7 6 9 : ウサギ A b 1 2 1 7 2 重鎖 (F a b)	
配列表 2 4	< 2 2 3 > ウサギ A b 1 2 1 7 2 重鎖 (F a b)	
配列表 2 5	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 1 V 領域	
配列表 2 6	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 1 V 領域	
配列表 2 7	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 1 軽鎖	
配列表 2 8	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 1 軽鎖	
配列表 2 9 ~ 3 0	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 2 V 領域	
配列表 3 1 ~ 3 2	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 2 軽鎖	10
配列表 3 3 ~ 3 4	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 6 V 領域	
配列表 3 5 ~ 3 6	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 6 軽鎖	
配列表 3 7 ~ 3 8	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 9 V 領域	
配列表 3 9 ~ 4 0	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 9 軽鎖	
配列表 4 1 ~ 4 2	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 1 1 V 領域	
配列表 4 3 ~ 4 4	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g L 1 1 軽鎖	
配列表 4 5 ~ 4 6	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 V 領域	
配列表 4 7 ~ 4 8	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 重鎖 (I g G 4 P)	
配列表 4 9 ~ 5 0	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 2 V 領域	
配列表 5 1 ~ 5 2	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 2 重鎖 (I g G 4 P)	20
配列表 5 3 ~ 5 4	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 4 V 領域	
配列表 5 5 ~ 5 6	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 4 重鎖 (I g G 4 P)	
配列表 5 7 ~ 5 8	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 6 V 領域	
配列表 5 9 ~ 6 0	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 6 重鎖 (I g G 4 P)	
配列表 6 1 ~ 6 2	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 6 重鎖 (I g G 4 P F 2 3 4 A L 2 3 5 A)	
配列表 6 3 ~ 6 4	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 6 重鎖 (I g G 1)	
配列表 6 5 ~ 6 6	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 6 重鎖 (I g G 1 L 2 3 4 A L 2 3 5 A)	
配列表 6 7 ~ 6 8	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 8 V 領域	
配列表 6 9 ~ 7 0	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 8 重鎖 (I g G 4 P)	30
配列表 7 1 ~ 7 2	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 9 V 領域	
配列表 7 3 ~ 7 4	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 9 重鎖 (I g G 4 P)	
配列表 7 5 ~ 7 6	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 0 V 領域	
配列表 7 7 ~ 7 8	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 0 重鎖 (I g G 4 P)	
配列表 7 9 ~ 8 0	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 1 V 領域	
配列表 8 1 ~ 8 2	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 1 重鎖 (I g G 4 P)	
配列表 8 3 ~ 8 4	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 1 重鎖 (I g G 4 P F 2 3 4 A L 2 3 5 A)	
配列表 8 5 ~ 8 6	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 1 重鎖 (I g G 1)	
配列表 8 7 ~ 8 8	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 1 重鎖 (I g G 1 L 2 3 4 A L 2 3 5 A)	40
配列表 8 9 ~ 9 0	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 2 V 領域	
配列表 9 1 ~ 9 2	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 1 2 重鎖 (I g G 4 P)	
配列表 9 3 ~ 9 4	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 2 6 V 領域	
配列表 9 5 ~ 9 6	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 2 6 重鎖 (h I g G 4 P)	
配列表 9 7 ~ 9 8	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 4 8 V 領域	
配列表 9 9 ~ 1 0 0	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 4 8 重鎖 (h I g G 4 P)	
配列表 1 0 1 ~ 1 0 2	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 4 9 V 領域	
配列表 1 0 3 ~ 1 0 4	< 2 2 3 > 1 2 1 7 2 g H 4 9 重鎖 (h I g G 4 P)	
配列表 1 0 5 ~ 1 0 6	< 2 2 3 > ヒト I G K V 1 - 9 I G K J 4 受容体フレームワーク	50

配列表 1 0 7 ~ 1 0 8 < 2 2 3 > ヒ ト I G H V 3 - 6 6 I G H J 4 受 容 体 フ レ ム ワ
ー ク

配列表 1 0 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 W T 0 1 _ W T _ 3 A	
配列表 1 1 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 2 _ 6	
配列表 1 1 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 3 _ 6 _ 7	
配列表 1 1 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 4 _ 6 _ 7 _ 9	
配列表 1 1 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 5 _ 7 _ 8 _ 9	
配列表 1 1 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 6 _ 9 _ 1 0 _ 1 1 1	
配列表 1 1 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 7 _ 9 _ 1 0 _ 1 1	
配列表 1 1 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 8 _ 1 0 _ 1 1 _ 1 2	10
配列表 1 1 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 9 _ 1 1 _ 1 2 _ 1 3	
配列表 1 1 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 0 _ 1 6 _ 1 1 8 _ 1 1 9	
配列表 1 1 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 1 _ 1 9 _ 2 0 _ 8 5	
配列表 1 2 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 2 _ 2 2 _ 2 4 _ 2 6	
配列表 1 2 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 3 _ 2 4 _ 2 6 _ 2 8	
配列表 1 2 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 4 _ 2 6 _ 2 8 _ 2 9	
配列表 1 2 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 5 _ 2 8 _ 2 9 _ 3 0	
配列表 1 2 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 6 _ 2 9 _ 3 0 _ 3 1	
配列表 1 2 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 7 _ 3 1 _ 3 2 _ 3 5	
配列表 1 2 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 8 _ 3 0 _ 3 4	20
配列表 1 2 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 9 _ 3 4 _ 3 5 _ 5 7	
配列表 1 2 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 0 _ 3 5 _ 3 6 _ 5 6	
配列表 1 2 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 1 _ 4 0 _ 4 9 _ 5 0	
配列表 1 3 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 2 _ 4 3 _ 4 4 _ 4 7	
配列表 1 3 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 3 _ 4 3 _ 4 4 _ 4 5	
配列表 1 3 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 4 _ 4 4 _ 4 5 _ 4 6	
配列表 1 3 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 5 _ 4 5 _ 4 6 _ 4 7	
配列表 1 3 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 6 _ 4 3 _ 4 6 _ 4 7	
配列表 1 3 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 7 _ 4 7 _ 4 8 _ 4 9	
配列表 1 3 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 8 _ 4 7 _ 4 9 _ 5 0	30
配列表 1 3 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 9 _ 4 9 _ 5 0 _ 5 3	
配列表 1 3 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 0 _ 5 0 _ 5 3 _ 5 5	
配列表 1 3 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 1 _ 5 5 _ 5 6 _ 5 7	
配列表 1 4 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 2 _ 3 4 _ 5 6 _ 5 7	
配列表 1 4 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 3 _ 5 7 _ 5 9 _ 6 0	
配列表 1 4 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 4 _ 5 9 _ 6 0 _ 6 1	
配列表 1 4 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 5 _ 6 0 _ 6 1 _ 6 2	
配列表 1 4 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 6 _ 6 1 _ 6 2 _ 6 3	
配列表 1 4 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 7 _ 6 2 _ 6 3 _ 6 4	
配列表 1 4 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 8 _ 6 3 _ 6 4 _ 6 5	40
配列表 1 4 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 9 _ 6 4 _ 6 5 _ 6 6	
配列表 1 4 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 0 _ 6 0 _ 7 4 _ 7 6	
配列表 1 4 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 1 _ 6 0 _ 7 5 _ 7 6	
配列表 1 5 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 2 _ 6 0 _ 7 6 _ 7 7	
配列表 1 5 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 3 _ 2 8 _ 7 6 _ 7 7	
配列表 1 5 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 4 _ 2 8 _ 7 7 _ 7 8	
配列表 1 5 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 5 _ 9 6 _ 1 0 9 _ 1 1 1	
配列表 1 5 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 6 _ 9 8 _ 1 0 0 _ 1 0 9	
配列表 1 5 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 7 _ 3 5 _ 1 0 0 _ 1 0 2	
配列表 1 5 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 8 _ 1 0 2 _ 1 0 3 _ 1 0 4	50

配列表 1 5 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 9 _ 1 0 3 _ 1 0 4 _ 1 0 5
 配列表 1 5 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 0 _ 1 0 4 _ 1 0 5 _ 1 0 6
 配列表 1 5 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 1 _ 1 0 5 _ 1 0 6 _ 1 0 7
 配列表 1 6 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 2 _ 1 0 6 _ 1 0 7 _ 1 0 8
 配列表 1 6 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 3 _ 1 0 7 _ 1 0 8 _ 1 0 9
 配列表 1 6 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 4 _ 1 0 9 _ 1 1 0 _ 1 1 1
 配列表 1 6 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 5 _ 1 1 _ 1 1 3 _ 1 1 4
 配列表 1 6 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 6 _ 1 0 _ 1 2 _ 1 1 4
 配列表 1 6 5 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 7 _ 1 1 8 _ 1 1 9 _ 1 2 0
 配列表 1 6 6 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 8 _ 1 6 _ 1 1 9 _ 1 2 0
 配列表 1 6 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 W T 0 1 _ W T _ 2 A
 配列表 1 6 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 2 _ 2 _ 3
 配列表 1 6 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 3 _ 3 _ 4
 配列表 1 7 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 4 _ 4 _ 5
 配列表 1 7 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 5 _ 5 _ 1 0 4
 配列表 1 7 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 6 _ 5 _ 1 0 6
 配列表 1 7 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 7 _ 5 _ 1 0 7
 配列表 1 7 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 8 _ 7 _ 9
 配列表 1 7 5 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 9 _ 7 _ 1 0 7
 配列表 1 7 6 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 0 _ 8 _ 1 0
 配列表 1 7 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 1 _ 1 1 _ 1 2
 配列表 1 7 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 2 _ 1 2 _ 1 3
 配列表 1 7 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 3 _ 1 2 _ 1 5
 配列表 1 8 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 4 _ 1 3 _ 8 5
 配列表 1 8 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 5 _ 1 6 _ 8 1
 配列表 1 8 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 6 _ 2 0 _ 7 5
 配列表 1 8 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 7 _ 2 4 _ 2 5
 配列表 1 8 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 8 _ 2 4 _ 2 6
 配列表 1 8 5 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 9 _ 2 4 _ 2 7
 配列表 1 8 6 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 0 _ 2 5 _ 2 6
 配列表 1 8 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 1 _ 2 6 _ 2 7
 配列表 1 8 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 2 _ 3 0 _ 3 1
 配列表 1 8 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 3 _ 3 0 _ 5 3
 配列表 1 9 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 4 _ 3 7 _ 3 8
 配列表 1 9 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 5 _ 3 7 _ 3 9
 配列表 1 9 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 6 _ 3 7 _ 4 5
 配列表 1 9 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 7 _ 3 7 _ 4 7
 配列表 1 9 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 8 _ 3 8 _ 4 4
 配列表 1 9 5 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 9 _ 3 8 _ 9 0
 配列表 1 9 6 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 0 _ 4 2 _ 4 3
 配列表 1 9 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 1 _ 4 2 _ 4 5
 配列表 1 9 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 2 _ 4 3 _ 4 4
 配列表 1 9 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 3 _ 4 3 _ 1 0 1
 配列表 2 0 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 4 _ 4 4 _ 4 5
 配列表 2 0 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 5 _ 4 5 _ 4 7
 配列表 2 0 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 6 _ 4 7 _ 6 5
 配列表 2 0 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 7 _ 5 1 _ 5 5
 配列表 2 0 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 8 _ 5 6 _ 5 7
 配列表 2 0 5 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 9 _ 5 8 _ 5 9
 配列表 2 0 6 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 0 _ 5 9 _ 6 0

10

20

30

40

50

配列表 2 0 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 1 _ 5 9 _ 6 1	
配列表 2 0 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 2 _ 5 9 _ 6 6	
配列表 2 0 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 3 _ 6 0 _ 6 1	
配列表 2 1 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 4 _ 6 0 _ 6 2	
配列表 2 1 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 5 _ 6 1 _ 6 2	
配列表 2 1 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 6 _ 6 1 _ 6 6	
配列表 2 1 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 7 _ 6 2 _ 6 5	
配列表 2 1 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 8 _ 6 5 _ 6 6	
配列表 2 1 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 9 _ 6 6 _ 8 1	
配列表 2 1 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 0 _ 7 2 _ 7 3	10
配列表 2 1 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 1 _ 7 3 _ 7 5	
配列表 2 1 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 2 _ 8 1 _ 8 2	
配列表 2 1 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 3 _ 8 5 _ 8 6	
配列表 2 2 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 4 _ 9 8 _ 9 9	
配列表 2 2 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 5 _ 9 9 _ 1 0 0	
配列表 2 2 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 6 _ 1 0 0 _ 1 0 1	
配列表 2 2 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 7 _ 1 0 1 _ 1 0 2	
配列表 2 2 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 8 _ 1 0 2 _ 1 0 3	
配列表 2 2 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 9 _ 1 0 3 _ 1 0 4	
配列表 2 2 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 0 _ 1 0 4 _ 1 0 6	20
配列表 2 2 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 1 _ 1 0 6 _ 1 0 7	
配列表 2 2 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 2 _ 8 _ 1 0 _ 1 1 2	
配列表 2 2 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 3 _ 3 7 _ 3 9 _ 4 0	
配列表 2 3 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 4 _ 4 0	
配列表 2 3 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 5 _ 1 1 2	
配列表 2 3 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 W T 0 1 _ W T _ 1 A	
配列表 2 3 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 2 _ 1	
配列表 2 3 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 3 _ 2	
配列表 2 3 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 4 _ 4	
配列表 2 3 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 5 _ 5	30
配列表 2 3 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 6 _ 6	
配列表 2 3 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 7 _ 7	
配列表 2 3 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 8 _ 8	
配列表 2 4 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 0 9 _ 9	
配列表 2 4 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 0 _ 1 1	
配列表 2 4 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 1 _ 1 4	
配列表 2 4 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 2 _ 1 7	
配列表 2 4 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 3 _ 1 9	
配列表 2 4 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 4 _ 2 1	
配列表 2 4 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 5 _ 2 3	40
配列表 2 4 7	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 6 _ 2 4	
配列表 2 4 8	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 7 _ 2 5	
配列表 2 4 9	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 8 _ 2 6	
配列表 2 5 0	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 1 9 _ 2 9	
配列表 2 5 1	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 0 _ 3 0	
配列表 2 5 2	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 1 _ 3 8	
配列表 2 5 3	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 2 _ 3 9	
配列表 2 5 4	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 3 _ 4 1	
配列表 2 5 5	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 4 _ 4 2	
配列表 2 5 6	< 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 5 _ 4 4	50

配列表 2 5 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 6 __ 4 5
 配列表 2 5 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 7 __ 5 0
 配列表 2 5 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 8 __ 5 1
 配列表 2 6 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 2 9 __ 5 2
 配列表 2 6 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 0 __ 5 4
 配列表 2 6 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 1 __ 5 5
 配列表 2 6 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 2 __ 5 6
 配列表 2 6 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 3 __ 5 7
 配列表 2 6 5 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 4 __ 5 8
 配列表 2 6 6 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 5 __ 5 9
 配列表 2 6 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 6 __ 6 0
 配列表 2 6 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 7 __ 6 1
 配列表 2 6 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 8 __ 6 3
 配列表 2 7 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 3 9 __ 6 5
 配列表 2 7 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 0 __ 7 1
 配列表 2 7 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 1 __ 7 2
 配列表 2 7 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 2 __ 7 8
 配列表 2 7 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 3 __ 8 0
 配列表 2 7 5 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 4 __ 8 1
 配列表 2 7 6 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 5 __ 8 3
 配列表 2 7 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 6 __ 8 4
 配列表 2 7 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 7 __ 8 5
 配列表 2 7 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 8 __ 8 7
 配列表 2 8 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 4 9 __ 9 5
 配列表 2 8 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 0 __ 9 7
 配列表 2 8 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 1 __ 9 8
 配列表 2 8 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 2 __ 9 9
 配列表 2 8 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 3 __ 1 0 0
 配列表 2 8 5 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 4 __ 1 0 1
 配列表 2 8 6 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 5 __ 1 0 2
 配列表 2 8 7 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 6 __ 1 0 3
 配列表 2 8 8 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 7 __ 1 0 4
 配列表 2 8 9 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 8 __ 1 0 6
 配列表 2 9 0 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 5 9 __ 1 0 9
 配列表 2 9 1 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 0 __ 1 1 1
 配列表 2 9 2 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 1 __ 1 1 3
 配列表 2 9 3 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 2 __ 1 1 4
 配列表 2 9 4 < 2 2 3 > ヒ ト T R E M 1 変異体 6 3 __ 1 1 5

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

軽鎖グラフト12172

1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71 73 75 77 79 81 83 85 87 89 91 93 95 97 99 101 103 105 107 109 111 113 115 117 119 121 123 125 127 129 131 133 135 137 139 141 143 145 147 149 151 153 155 157 159 161 163 165 167 169 171 173 175 177 179 181 183 185 187 189 191 193 195 197 199 201 203 205 207 209 211 213 215 217 219 221 223 225 227 229 231 233 235 237 239 241 243 245 247 249 251 253 255 257 259 261 263 265 267 269 271 273 275 277 279 281 283 285 287 289 291 293 295 297 299 301 303 305 307 309 311 313 315 317 319 321 323 325 327 329 331 333 335 337 339 341 343 345 347 349 351 353 355 357 359 361 363 365 367 369 371 373 375 377 379 381 383 385 387 389 391 393 395 397 399 401 403 405 407 409 411 413 415 417 419 421 423 425 427 429 431 433 435 437 439 441 443 445 447 449 451 453 455 457 459 461 463 465 467 469 471 473 475 477 479 481 483 485 487 489 491 493 495 497 499 501 503 505 507 509 511 513 515 517 519 521 523 525 527 529 531 533 535 537 539 541 543 545 547 549 551 553 555 557 559 561 563 565 567 569 571 573 575 577 579 581 583 585 587 589 591 593 595 597 599 601 603 605 607 609 611 613 615 617 619 621 623 625 627 629 631 633 635 637 639 641 643 645 647 649 651 653 655 657 659 661 663 665 667 669 671 673 675 677 679 681 683 685 687 689 691 693 695 697 699 701 703 705 707 709 711 713 715 717 719 721 723 725 727 729 731 733 735 737 739 741 743 745 747 749 751 753 755 757 759 761 763 765 767 769 771 773 775 777 779 781 783 785 787 789 791 793 795 797 799 801 803 805 807 809 811 813 815 817 819 821 823 825 827 829 831 833 835 837 839 841 843 845 847 849 851 853 855 857 859 861 863 865 867 869 871 873 875 877 879 881 883 885 887 889 891 893 895 897 899 901 903 905 907 909 911 913 915 917 919 921 923 925 927 929 931 933 935 937 939 941 943 945 947 949 951 953 955 957 959 961 963 965 967 969 971 973 975 977 979 981 983 985 987 989 991 993 995 997 999 1001 1003 1005 1007 1009 1011 1013 1015 1017 1019 1021 1023 1025 1027 1029 1031 1033 1035 1037 1039 1041 1043 1045 1047 1049 1051 1053 1055 1057 1059 1061 1063 1065 1067 1069 1071 1073 1075 1077 1079 1081 1083 1085 1087 1089 1091 1093 1095 1097 1099 1101 1103 1105 1107 1109 1111 1113 1115 1117 1119 1121 1123 1125 1127 1129 1131 1133 1135 1137 1139 1141 1143 1145 1147 1149 1151 1153 1155 1157 1159 1161 1163 1165 1167 1169 1171 1173 1175 1177 1179 1181 1183 1185 1187 1189 1191 1193 1195 1197 1199 1201 1203 1205 1207 1209 1211 1213 1215 1217 1219 1221 1223 1225 1227 1229 1231 1233 1235 1237 1239 1241 1243 1245 1247 1249 1251 1253 1255 1257 1259 1261 1263 1265 1267 1269 1271 1273 1275 1277 1279 1281 1283 1285 1287 1289 1291 1293 1295 1297 1299 1301 1303 1305 1307 1309 1311 1313 1315 1317 1319 1321 1323 1325 1327 1329 1331 1333 1335 1337 1339 1341 1343 1345 1347 1349 1351 1353 1355 1357 1359 1361 1363 1365 1367 1369 1371 1373 1375 1377 1379 1381 1383 1385 1387 1389 1391 1393 1395 1397 1399 1401 1403 1405 1407 1409 1411 1413 1415 1417 1419 1421 1423 1425 1427 1429 1431 1433 1435 1437 1439 1441 1443 1445 1447 1449 1451 1453 1455 1457 1459 1461 1463 1465 1467 1469 1471 1473 1475 1477 1479 1481 1483 1485 1487 1489 1491 1493 1495 1497 1499 1501 1503 1505 1507 1509 1511 1513 1515 1517 1519 1521 1523 1525 1527 1529 1531 1533 1535 1537 1539 1541 1543 1545 1547 1549 1551 1553 1555 1557 1559 1561 1563 1565 1567 1569 1571 1573 1575 1577 1579 1581 1583 1585 1587 1589 1591 1593 1595 1597 1599 1601 1603 1605 1607 1609 1611 1613 1615 1617 1619 1621 1623 1625 1627 1629 1631 1633 1635 1637 1639 1641 1643 1645 1647 1649 1651 1653 1655 1657 1659 1661 1663 1665 1667 1669 1671 1673 1675 1677 1679 1681 1683 1685 1687 1689 1691 1693 1695 1697 1699 1701 1703 1705 1707 1709 1711 1713 1715 1717 1719 1721 1723 1725 1727 1729 1731 1733 1735 1737 1739 1741 1743 1745 1747 1749 1751 1753 1755 1757 1759 1761 1763 1765 1767 1769 1771 1773 1775 1777 1779 1781 1783 1785 1787 1789 1791 1793 1795 1797 1799 1801 1803 1805 1807 1809 1811 1813 1815 1817 1819 1821 1823 1825 1827 1829 1831 1833 1835 1837 1839 1841 1843 1845 1847 1849 1851 1853 1855 1857 1859

凡例

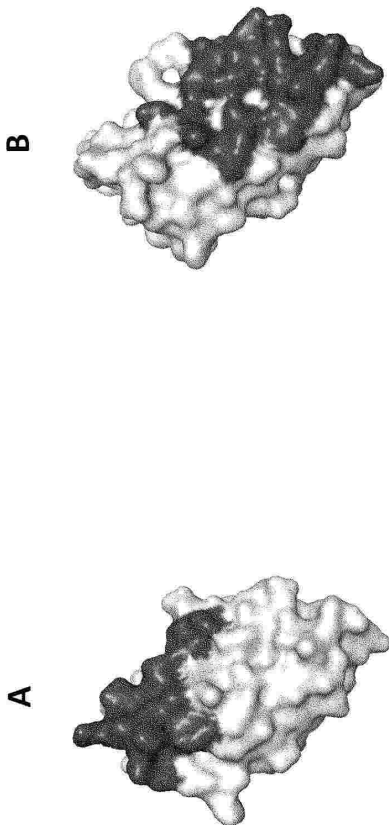
12172=ウサギ可変鎖配列
12172g1、g2、g6、g9及びg11=受容体ファミリーワークとしてのIGKV-9ヒト生殖系を使用する12172可変鎖のヒト化グラフ

CDRは、太字／下線で示される

ドナー残基は、太字／イタリック体で示され、強調される:A1、V2及びV3

正電荷アミノ酸の数が減少する変異(R18S及びK50S)は、太字／下線で示され、強調される。R18S及びK50S

【圖 3】



【圖 2】

重鎖グラフト12172

[illegible]

凡例

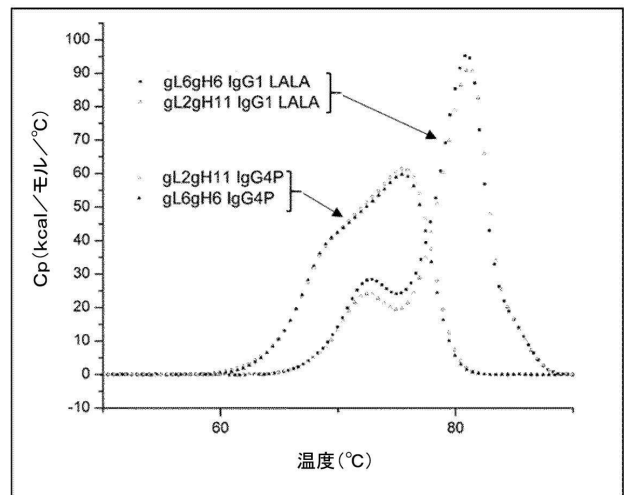
12172ニウサギ可変重鎖配列
12172gH1、gH2、gH4、gH6、gH8、gH9、gH10、gH11、gH12、gH26、gH48及びgH49＝受容体フレームワークとしてのIGHV3-66トシ産系を
使用する12172可変重鎖のトヒグラツト

CDRは、太字／下線で示される

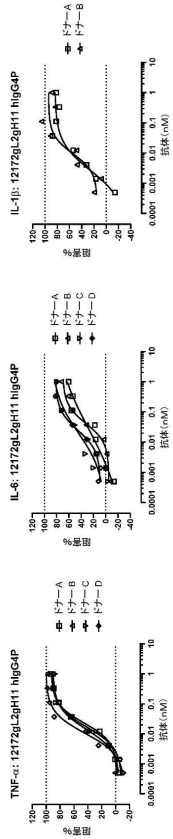
CDRIは、公知ノト縁で示される
ドナー残基は、太字／イタリック体で示され、強調される：T23、I48、G49、K71、S73及びV78

正電荷アミノ酸の数が減少する変異 (K75S、K75Q及ヒK75E)は、太字／下線で示され、強調される。

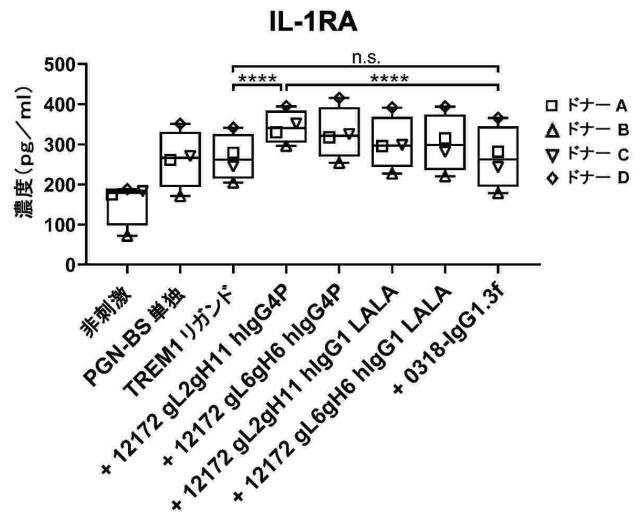
【図 4】



【図 5】



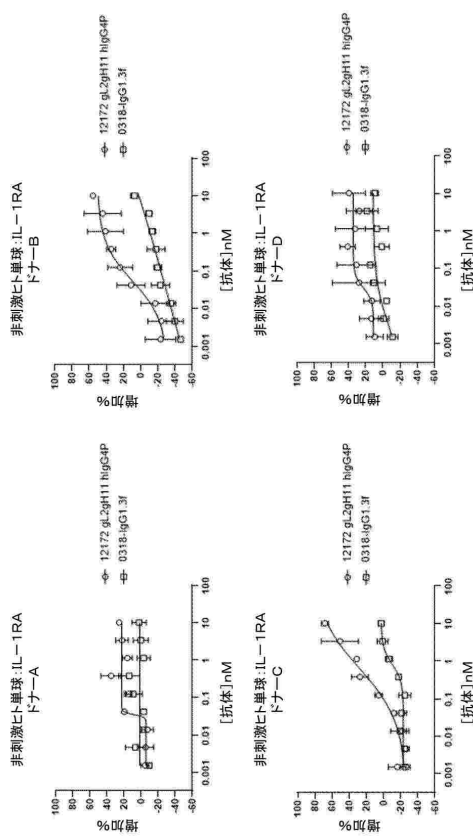
【図 6】



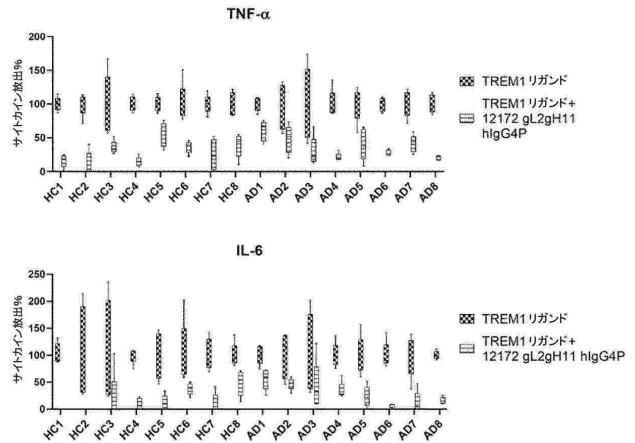
10

20

【図 7】



【図 8】

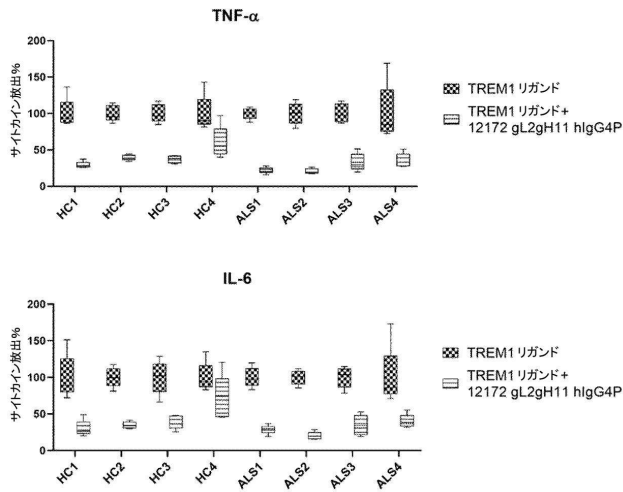


30

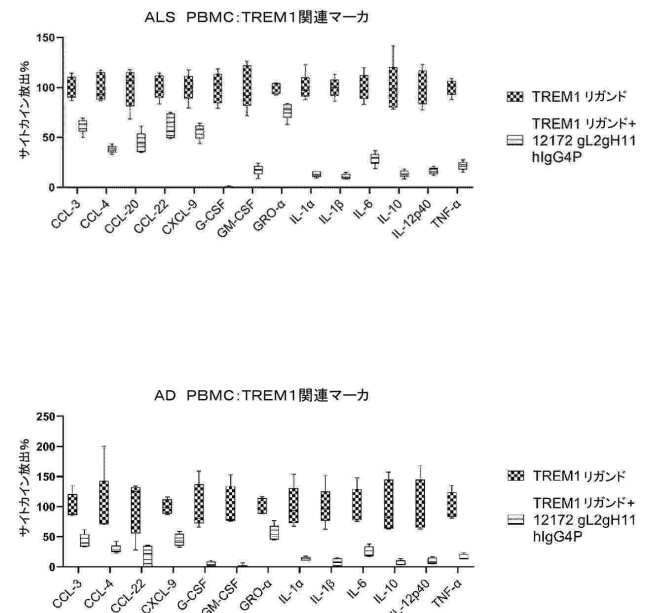
40

50

【図 9】



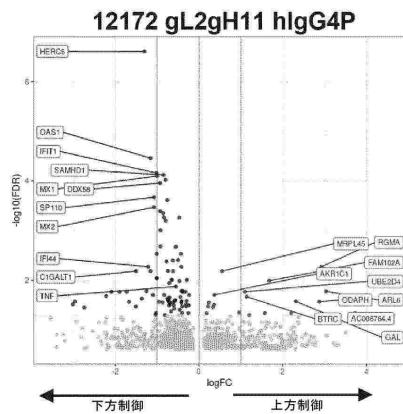
【図 10】



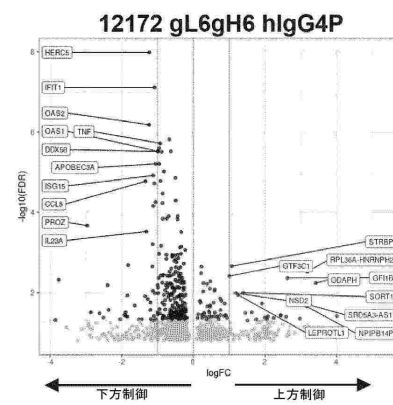
10

20

【図 11 A】

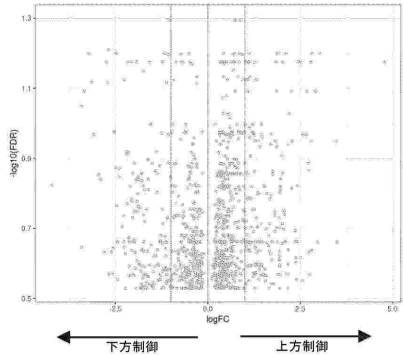


【図 11 B】

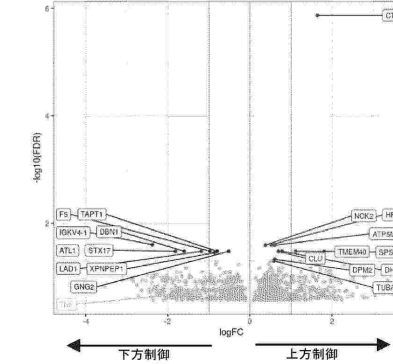


30

12172 gL2gH11 hlgG1 LALA



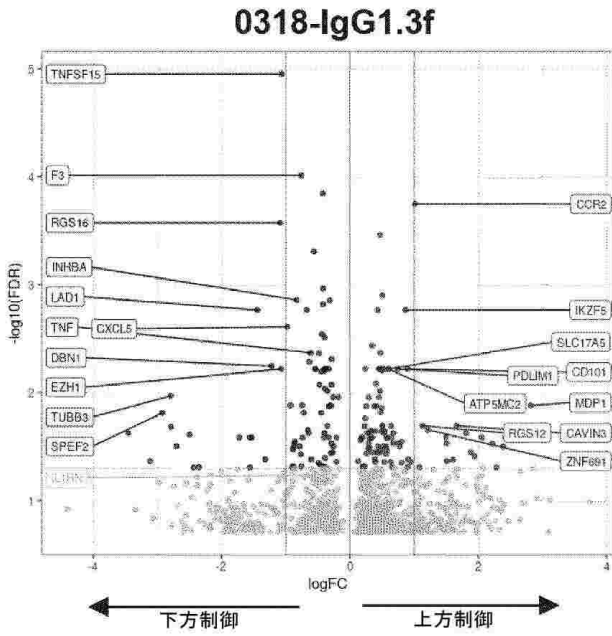
12172 gL6gH6 hlgG1 LALA



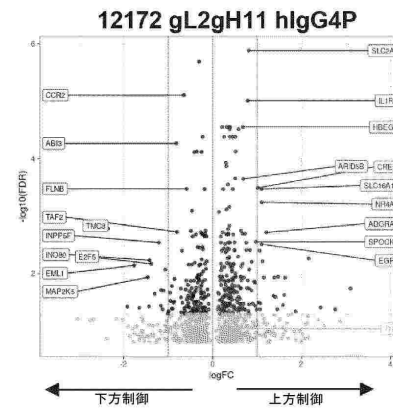
40

50

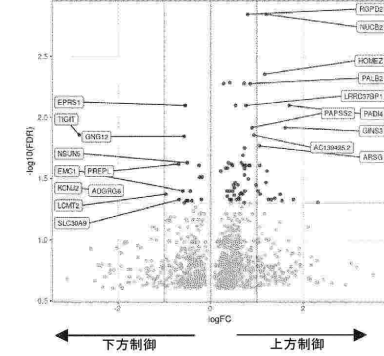
【図 1 1 C】



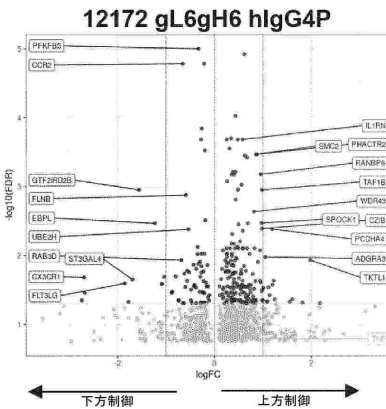
【図 1 2 A】



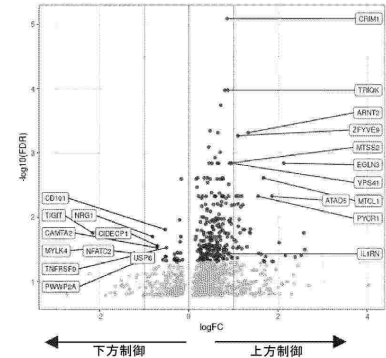
12172 gL2gH11 hlgG1 LALA



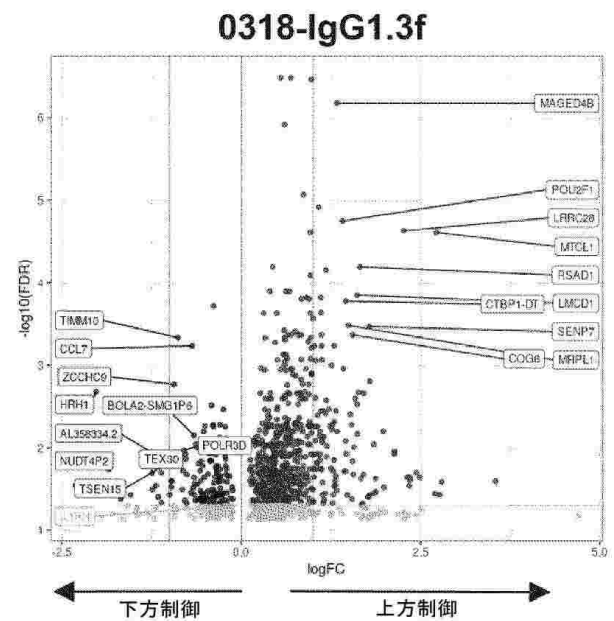
【図 1 2 B】



12172 gL6gH6 hlgG1 LALA



【図 1 2 C】



10

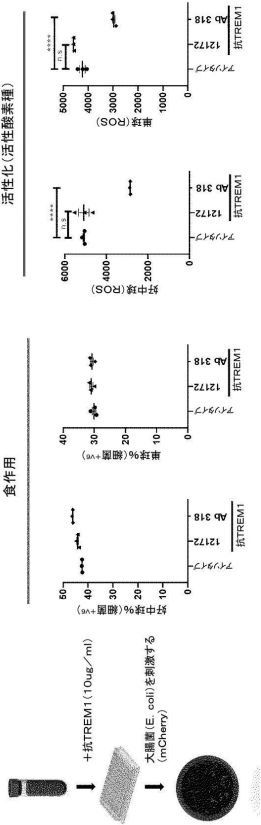
20

30

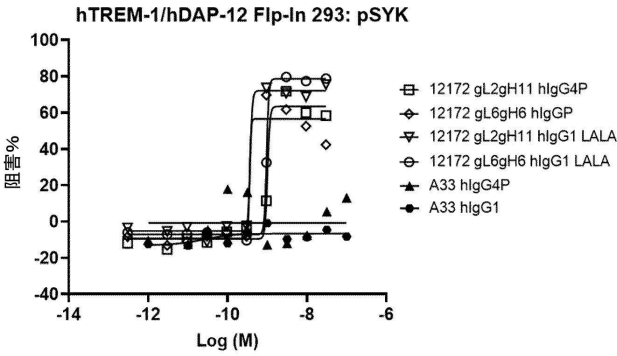
40

50

【図 1 3】



【図 1 4】



10

20

【配列表】

2024516305000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2022/061661
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/061661

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: **20**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims.; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/061661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61P25/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/255529 A1 (CHAN CHRISTOPHER [US] ET AL) 13 August 2020 (2020-08-13) sequence 1 paragraph [0010] - paragraph [0011] examples 1, 5 paragraph [0583] - paragraph [0584] -----	1-19, 21-33
X	WO 2017/152102 A2 (ALECTOR LLC [US]) 8 September 2017 (2017-09-08) cited in the application page 178, paragraph 0479 page 184, paragraph 0500 example 15 claims 85-86 ----- --/--	1-19, 21-33
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 July 2022		Date of mailing of the international search report 09/08/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Malamoussi, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/061661

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/211050 A1 (STENNICKE VIBEKE WESTPHAL [DK] ET AL) 15 August 2013 (2013-08-15) examples 10, 15, 16 paragraph [0196] -----	1-19, 21-33
X	US 2019/300608 A1 (PASHINE ACHAL [US] ET AL) 3 October 2019 (2019-10-03) examples 1,3 sequence 1 paragraph [0007] paragraph [0008] paragraph [0058] -----	1-19, 21-33
A	M. BARDELLI ET AL: "Epitope mapping by solution NMR spectroscopy : EPITOPE MAPPING BY SOLUTION NMR SPECTROSCOPY", JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION., vol. 28, no. 6, 27 February 2015 (2015-02-27), pages 393-400, XP055684054, GB ISSN: 0952-3499, DOI: 10.1002/jmr.2454 page 393, right-hand column - page 394, left-hand column, paragraph 1 figure 6 -----	1-19, 21-33
A	Lilit Yeon Simonyan: "Conformational Epitope Mapping by Cross-link Mass Spectrometry: Analysis of Ipilimumab, Nivolumab and Pembrolizumab", , 15 November 2017 (2017-11-15), XP055593280, DOI: 10.1038/ncomms13354 Retrieved from the Internet: URL:https://covalx.com/pdf/171113-Covalx-X LMS%20Xray%20Comparisons-PEGSEU17.pdf [retrieved on 2019-06-03] the whole document -----	1-19, 21-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/061661

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020255529	A1	13-08-2020	US 2020255529 A1 US 2021101983 A1	13-08-2020 08-04-2021
WO 2017152102	A2	08-09-2017	EP 3423493 A2 JP 7023853 B2 JP 2019514347 A JP 2022070933 A US 2020131264 A1 WO 2017152102 A2	09-01-2019 22-02-2022 06-06-2019 13-05-2022 30-04-2020 08-09-2017
US 2013211050	A1	15-08-2013	CN 104220456 A CN 108103069 A CY 1120068 T1 DK 2814844 T3 EP 2814844 A1 EP 3196214 A1 EP 3611190 A1 ES 2640268 T3 HR P20171585 T1 HU E036955 T2 JP 6411218 B2 JP 6740308 B2 JP 2015508762 A JP 2018203777 A LT 2814844 T NO 2814844 T3 PL 2814844 T3 PT 2814844 T SI 2814844 T1 TW 201335186 A US 2013211050 A1 US 2015274825 A1 WO 2013120553 A1	17-12-2014 01-06-2018 12-12-2018 13-11-2017 24-12-2014 26-07-2017 19-02-2020 02-11-2017 01-12-2017 28-08-2018 24-10-2018 12-08-2020 23-03-2015 27-12-2018 25-10-2017 30-12-2017 29-12-2017 18-09-2017 30-10-2017 01-09-2013 15-08-2013 01-10-2015 22-08-2013
US 2019300608	A1	03-10-2019	AR 117566 A1 AU 2019248547 A1 BR 112020017605 A2 CA 3092387 A1 CL 2020002367 A1 CN 111936520 A CO 2020013466 A2 CR 20200450 A EA 202092302 A1 EC SP20061469 A EP 3774902 A1 IL 277678 A JP 2021519594 A KR 20200139219 A MA 52190 A PE 20201343 A1 PH 12020551619 A1 SG 11202009625W A TW 202003570 A US 2019300608 A1 US 2021403561 A1 US 2022002404 A1 WO 2019195126 A1	18-08-2021 10-09-2020 22-12-2020 10-10-2019 29-01-2021 13-11-2020 10-11-2020 11-02-2021 02-02-2021 31-12-2020 17-02-2021 30-11-2020 12-08-2021 11-12-2020 17-02-2021 25-11-2020 19-07-2021 29-10-2020 16-01-2020 03-10-2019 30-12-2021 06-01-2022 10-10-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/EP2022/061661

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claim 20 aims at providing an antibody that cross-competes with the antibody of claim 1 for binding to a TREM1 epitope comprising residues E26, E27, K28, Y29, E30, L31, K32, and Q35 of human TREM1 (SEQ ID NO: The feature of "cross-competes with the antibody of claim 1" is a functional feature which could never have been disclosed in the prior art, since it relates to competition to an antibody (of claim 1) which is for the first time disclosed in present application. Therefore, it is considered to be an unusual parameter since the applicant's choice of said parameter to define the invention renders a meaningful comparison with the prior art impossible, because the unusual parameter measures a property of the antibody that was not measured before in the field of the invention. For this reason, the parameter chosen by the applicant lacks clarity. The onus of proof that the unusual parameter is a genuine distinctive feature vis-à-vis the prior art lies with the applicant. No benefit of doubt can be accorded in this respect. The lack of clarity and support and disclosure of such antibodies is to such an extent, that a search of claim 20 would be meaningless. Claim 20 was therefore not searched.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 20

Claim 20 aims at providing an antibody that cross-competes with the antibody of claim 1 for binding to a TREM1 epitope comprising residues E26, E27, K28, Y29, E30, L31, K32, and Q35 of human TREM1 (SEQ ID NO: The feature of "cross-competes with the antibody of claim 1" is a functional feature which could never have been disclosed in the prior art, since it relates to competition to an antibody (of claim 1) which is for the first time disclosed in present application. Therefore, it is considered to be an unusual parameter since the applicant's choice of said parameter to define the invention renders a meaningful comparison with the prior art impossible, because the unusual parameter measures a property of the antibody that was not measured before in the field of the invention. For this reason, the parameter chosen by the applicant lacks clarity. The onus of proof that the unusual parameter is a genuine distinctive feature vis-à-vis the prior art lies with the applicant. No benefit of doubt can be accorded in this respect. The lack of clarity and support and disclosure of such antibodies is to such an extent, that a search of claim 20 would be meaningless. Claim 20 was therefore not searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the

International Application No. PCT/EP2022/061661

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 39/39 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/04 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/39
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 21/04
 A 6 1 P 25/28

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,J
 O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
 Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
 TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ル、アイピーディ 気付

(72)発明者

バッタ、パラヴィ

英国 エスエル1 3ダブリューイー バークシャー、スラウ、バス ロード 208、ユーシービー
 、アイピーディ 気付

(72)発明者

スピリオトポウロス、アナスタシオス

英国 エスエル1 3ダブリューイー バークシャー、スラウ、バス ロード 208、ユーシービー
 、アイピーディ 気付

(72)発明者

エリオット、ペーター チャールズ

英国 エスエル1 3ダブリューイー バークシャー、スラウ、バス ロード 208、ユーシービー
 、アイピーディ 気付

(72)発明者

キーニー、ジェイムス マルティン

ベルギー王国 1070 ブリュッセル、アレ ドウ ラ レシエルシェ 60、ユーシービー バイオ
 ファルマ エスアールエル、アイピーディ 気付

(72)発明者

デルカー、シルビア エル。

ベルギー王国 1070 ブリュッセル、アレ ドウ ラ レシエルシェ 60、ユーシービー バイオ
 ファルマ エスアールエル、アイピーディ 気付

(72)発明者

アーベントロート、ジャン

ベルギー王国 1070 ブリュッセル、アレ ドウ ラ レシエルシェ 60、ユーシービー バイオ
 ファルマ エスアールエル、アイピーディ 気付

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
 AB01 AC14 BA02 CA44

4C085 AA13 AA14 AA38 BB11 BB36 BB41 BB42 BB43 CC01 DD62
 DD86 EE01 EE06 FF24

4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 CA40 DA76 EA20 FA74