

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-514458

(P2012-514458A)

(43) 公表日 平成24年6月28日(2012.6.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 128 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-544632 (P2011-544632)	(71) 出願人	592221528
(86) (22) 出願日	平成21年12月31日 (2009.12.31)		バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成23年8月15日 (2011.8.15)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/069967		1 4 2, ケンブリッジ, ケンブリッジ センター 1 4
(87) 国際公開番号	W02010/078526	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成22年7月8日 (2010.7.8)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/142, 182	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成20年12月31日 (2008.12.31)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗リンホトキシン抗体

(57) 【要約】

本発明は、例えば、L Tブロック能の改善に至る抗体の新規クラスの特定に少なくとも部分的に基づく。また、前記対象の結合分子の作製方法および本発明の結合分子をL T Rシグナル伝達に拮抗するために使用する方法も提供する。一局面において、本発明は、リンホトキシン(L T)に結合し、参照抗体B 9(細胞系B 9・C 9・1により産生、寄託番号H B 1 1 9 6 2のもとA T C Cに寄託)が細胞中L T誘発性生体活性を約5 0 %ブロックする条件下において、細胞中L T誘発性生体活性を少なくとも約7 0 %ブロックする単離抗体、またはその抗原結合領域を成す分子を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リンホトキシン (L T) に結合し、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1 により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2 のもと A T C C に寄託) が細胞中 L T 誘発性生体活性を約 5 0 % ブロックする条件下において、細胞中 L T 誘発性生体活性を少なくとも約 7 0 % ブロックする単離抗体、またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 2】

リンホトキシン (L T) に結合し、細胞中 L T 誘発性生体活性を 1 0 0 n M 未満の I C 5 0 でブロックする単離抗体、またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 3】

リンホトキシン (L T) に結合し、L T R - I g の細胞への結合を少なくとも 8 5 % ブロックする単離抗体、またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 4】

前記 L T 誘発性生体活性が I L - 8 放出である、請求項 1 または 2 の単離抗体またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 5】

ヒトアミノ酸配列を含む、請求項 1、2、または 3 の単離抗体またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 6】

前記ヒトアミノ酸配列が抗体定常領域配列またはその断片を含む、請求項 1 または 2 の単離抗体またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 7】

前記ヒト定常領域が、少なくとも 1 つの F c 受容体への結合を低下させるために改変されている I g G 1 定常領域である、請求項 6 に記載の単離抗体またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 8】

前記ヒト定常領域が、少なくとも 1 つの F c 受容体への結合を高めるために改変されている I g G 1 定常領域である、請求項 6 に記載の単離抗体またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 9】

ヒト化である、請求項 1、2、または 3 の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項 10】

前記 L T 誘発性生体活性が少なくとも約 8 0 % ブロックされる、請求項 1 または 2 の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項 11】

前記 L T 誘発性生体活性が少なくとも約 9 0 % ブロックされる、請求項 1、または 2 の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項 12】

L T R - I g 結合が少なくとも約 9 0 % ブロックされる、請求項 3 に記載の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項 13】

細胞中の L T 誘発性生体活性を 3 0 n M 未満の I C 5 0 でブロックする、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 14】

細胞中の L T 誘発性生体活性を 1 0 n M 未満の I C 5 0 でブロックする、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 15】

細胞中 L T 誘発性生体活性を 3 n M 未満の I C 5 0 でブロックする、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合領域を成す分子。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

ＬＴ上でＬＴ　Ｒ結合部位を残さないように２つの部位に結合する、請求項３に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

【請求項１７】

完全長抗体である、請求項１、２または３の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項１８】

ｓｃＦｖ分子である、請求項１、２、または３の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項１９】

ＬＴのエピトープに特異的に結合する単離抗体であり、前記抗体による前記ＬＴエピトープへの結合が１０２抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、単離抗体。

【請求項２０】

ＬＴのアミノ酸１９３位および１９４位が前記抗体の結合にとって重要である、請求項１９に記載の単離抗体。

【請求項２１】

ＬＴのエピトープに特異的に結合する単離抗体であり、前記抗体による前記ＬＴエピトープへの結合が、Ａ０Ｄ９抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、単離抗体。

【請求項２２】

ＬＴのエピトープに特異的に結合する単離抗体であり、前記抗体による前記ＬＴエピトープへの結合が、１０１／１０３抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、単離抗体。

【請求項２３】

ＬＴのエピトープに特異的に結合する単離抗体であり、前記抗体による前記ＬＴエピトープへの結合が、１０５抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、単離抗体。

【請求項２４】

ＬＴのアミノ酸９６位、９７位、９８位、１０６位、１０７位、および１０８位が前記抗体の結合にとって重要である、請求項２３に記載の単離抗体。

【請求項２５】

ＬＴのエピトープに特異的に結合する単離抗体であり、前記抗体による前記ＬＴエピトープへの結合が、９Ｂ４抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、単離抗体。

【請求項２６】

ＬＴのアミノ酸９６位、９７位、および９８位が前記抗体の結合にとって重要である、請求項２５に記載の単離抗体。

【請求項２７】

ＬＴのエピトープに特異的に結合する単離抗体であり、前記抗体による前記ＬＴエピトープへの結合が、Ａ１Ｄ５抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、単離抗体。

【請求項２８】

ＬＴのアミノ酸１７２位が前記抗体の結合にとって重要である、請求項２７に記載の単離抗体。

【請求項２９】

ＬＴのエピトープに特異的に結合する単離抗体であり、前記抗体による前記ＬＴエピトープへの結合が、１０７抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、単離抗体。

【請求項３０】

ＬＴのアミノ酸１５１位および１５３位が前記抗体の結合にとって重要である、請求項２９に記載の単離抗体。

【請求項３１】

ＬＴのエピトープに特異的に結合する単離抗体であり、前記抗体による前記ＬＴエピトープへの結合が、１０８抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、単離抗体。

【請求項３２】

ヒトアミノ酸配列を含む、請求項１９乃至請求項３１のいずれか一項に記載の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項３３】

10

20

30

40

50

前記ヒトアミノ酸配列が抗体定常領域配列である、請求項 3 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項 3 4】

前記抗体がヒト化である、請求項 1 9 乃至請求項 3 1 のいずれか一項に記載の単離抗体またはその抗原結合領域。

【請求項 3 5】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記軽鎖および重鎖 C D R が、A 0 D 9、1 0 8、1 0 7、A 1 D 5、1 0 2、1 0 1 / 1 0 3、9 B 4 および 1 0 5 からなる群から選択される抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

10

【請求項 3 6】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記 C D R が A 0 D 9 抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

【請求項 3 7】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記 C D R が 1 0 8 抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

20

【請求項 3 8】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記 C D R が 1 0 7 抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

【請求項 3 9】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記 C D R が A 1 D 5 抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

30

【請求項 4 0】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記 C D R が 1 0 2 抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

【請求項 4 1】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記 C D R が 1 0 1 / 1 0 3 抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

40

【請求項 4 2】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記 C D R が 1 0 5 抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

【請求項 4 3】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、前記 C D R が 9 B 4 抗体由来である、リンホトキシン結合分子。

50

。

【請求項 4 4】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、ここで C D R H 1 は前記配列 G F S L X₁ X₂ Y / S G X₃ H を含み、X は任意のアミノ酸である、リンホトキシン結合分子。

【請求項 4 5】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、ここで C D R H 2 は前記配列 V I W X₁ G G X₂ T X₃ X₄ N A X₅ F X₆ S を含み、X は任意のアミノ酸である、リンホトキシン結合分子。

10

【請求項 4 6】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、ここで C D R L 1 は前記配列 R A S X₁ S V X₂ X₃ X₄ X₅ または X₁ A S Q D X₂ X₃ X₄ X₅ L X₆ を含み、X は任意のアミノ酸である、リンホトキシン結合分子。

【請求項 4 7】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、C D R L 2 は配列 R A X₁ R L X₂ D を含み、X は任意のアミノ酸である、リンホトキシン結合分子。

20

【請求項 4 8】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、C D R L 2 は配列 X₁ X₂ S X₃ X₄ X₅ S を含み、X は任意のアミノ酸である、リンホトキシン結合分子。

【請求項 4 9】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、C D R L 3 は配列 X₁ Q X₂ X₃ X₄ X₅ P X₆ T を含み、X は任意のアミノ酸である、リンホトキシン結合分子。

30

【請求項 5 0】

重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子であり、C D R L 3 は配列 L X₁ X₂ D X₄ F P X₆ T を含み、X は任意のアミノ酸である、リンホトキシン結合分子。

【請求項 5 1】

1 0 5 抗体変異体の重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む軽鎖可変領域および 1 0 5 変異体の軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子。

40

【請求項 5 2】

1 2 0 m g / m l を超える溶解度を有する、請求項 5 1 に記載の結合分子。

【請求項 5 3】

前記結合分子が前記 1 0 5 変異体の L 1 0 型の軽鎖可変領域を含む、請求項 5 1 に記載のリンホトキシン結合分子。

【請求項 5 4】

前記結合分子が前記 1 0 5 変異体の H 1 型の重鎖可変領域を含む、請求項 5 1 に記載のリンホトキシン結合分子。

【請求項 5 5】

50

前記結合分子が前記 1 0 5 変異体の L 1 0 型の軽鎖可変領域および前記 1 0 5 変異体型である H 1 の重鎖可変領域を含む、請求項 5 1 に記載のリンホトキシン結合分子。

【請求項 5 6】

請求項 1 乃至請求項 3 4 のいずれか一項に記載の単離抗体もしくはその抗原結合領域、および担体を含む組成物。

【請求項 5 7】

請求項 3 5 乃至請求項 5 5 のいずれか一項に記載の結合分子および担体を含む組成物。

【請求項 5 8】

請求項 5 6 または 5 7 のいずれか一項の組成物を、治療が起こるように前記対象に投与することを含む、抗 L T 結合分子による治療から恩恵を受けるであろう対象の治療方法。

10

【請求項 5 9】

前記対象が炎症を特徴とする障害を呈する、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記炎症障害が、関節リウマチ、多発性硬化症、クーロン病、潰瘍性大腸炎、移植、ループス、炎症肝疾患、乾癬、シェーグレン症候群、多発性硬化症（例えば、S P M S）、ウイルス誘発性肝炎、自己免疫性肝炎、1 型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、およびウイルス性ショック症候群からなる群から選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記炎症障害が関節リウマチである、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

20

前記対象が癌を呈する、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記癌が、多発性骨髄腫および無痛性濾胞性リンパ腫からなる群から選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

請求項 1 乃至請求項 3 5 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸分子。

【請求項 6 5】

請求項 3 6 乃至請求項 5 5 のいずれか一項に記載の結合分子をコードする核酸分子。

【請求項 6 6】

ベクター中にある請求項 6 4 または 6 5 の核酸分子。

30

【請求項 6 7】

請求項 6 6 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 6 8】

抗体または結合分子の産生方法であって、（i）前記抗体または結合分子が宿主細胞培養培地中で分泌されるように請求項 6 7 に記載の宿主細胞を培養することと、（ii）前記培地から前記抗体または結合分子を単離すること、を含む、方法。

【請求項 6 9】

薬品の製造における、請求項 5 6 または 5 7 の組成物の使用。

【請求項 7 0】

前記薬品が炎症を伴う障害の治療用である、請求項 6 9 に記載の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2 0 0 8 年 1 2 月 3 1 日に提出された「抗リンホトキシン抗体（A n t i - L y m p h o t o x i n A n t i b o d i e s）」という題名の米国仮出願第 6 1 / 1 4 2 , 1 8 2 号の利益を主張する。先の仮出願の内容はすべて、参照することにより本出願に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

50

リンホトキシン (LT) は、TNFに関連するサイトカインであり、ヒト系において分泌形態と膜結合形態の両方で見られる。LTの分泌形態は単一タンパク質の三量体LTであり、表面形態は2つの関連分子であるLT とLT の結合体である。優勢形態は1 2という組成物を有するヘテロ三量体であるが、2 1ヘテロ三量体も存在する。LT ホモ三量体の唯一知られている細胞表面受容体は、2つのTNF受容体であるp55、p75と、HVEMである。一方、LT 1 2ヘテロ三量体はこれらのTNF受容体には結合せず、LT 受容体 (LT R) に結合する。LTのLT Rへの結合はリンパ脈管新生および炎症において重要な役割を担う。LTのLT Rへの結合を強力かつ特異的にブロックする抗体の出現は、患者におけるLT R介入反応の調節において甚大な利益をもたらすであろう。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

LT 1 2は、他のLTファミリーメンバーに見られるような単鎖のホモ三量体ではなく2本の異なる鎖であるLT とLT のヘテロ三量体であるため、TNFリガンドファミリーの独特な成員である。このファミリーの分子の受容体は、三量体鎖間の裂け目で結合することが見出されており、リガンドがホモ三量体である場合、3つの裂け目はすべて同一であり、裂け目中で結合する単一の抗体が3つの結合部位をすべて同時にブロックすることが予期される。一方、LT 1 2ヘテロ三量体は、(- 、 - 、および - と示すことができる) 3つの異なる裂け目を提示し、本発明の以前は、単一の抗体がヘテロ三量体に結合して受容体結合部位をすべて効果的にブロックし、それによって生体活性を完全にブロックできることは明らかではなかった。本抗体が、LT 3に結合しないこと(またはLT 3に結合するが、TNF 受容体結合をブロックしないこと)、および先行技術の抗LT 1 2抗体と比較して改善された機能を有することは注目に値する。

20

【0004】

例えば、1つの実施形態では、本抗体は、先行技術の抗体よりもLTのLT Rへの結合をより強力にブロックするおよび/またはLT Rを介するLTシグナル伝達の1つ以上の生物学的効果をより強力にブロックする(本明細書で使用する、LTという用語は、別段の指定のない限り、LT 1 2を指す)。例えば、1つの実施形態では、これらの抗体は、LT誘発性サイトカイン産生を70%超ブロックする。別の実施形態では、これらの抗体は、LT誘発性サイトカイン産生を80%超ブロックする。1つの実施形態では、これらの抗体は、LT誘発性サイトカイン産生を90%超ブロックする。1つの実施形態では、これらの抗体は、LT誘発性サイトカイン産生を95%超ブロックする。別の実施形態では、かかる抗体のLT結合および/またはLT誘発性サイトカイン産生の阻害IC50は約0.05 μg/ml未満である。1つの実施形態では、かかる抗体のLT結合および/またはLT誘発性サイトカイン産生の阻害IC50は約100 nM未満である。1つの実施形態では、かかる抗体のLT結合および/またはLT誘発性サイトカイン産生の阻害IC50は約30 nM未満である。1つの実施形態では、かかる抗体のLT結合および/またはLT誘発性サイトカイン産生の阻害IC50は約10 nM未満である。1つの実施形態では、かかる抗体のLT結合および/またはLT誘発性サイトカイン産生の阻害IC50は約3 nM未満である。かかる抗体のパネルが開発されており、これらの抗体のいくつかが結合するエピトープがマッピングされている。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、非ヒト霊長類、例えば、カニクイザルのLTエピトープにも結合する。これらの抗体の可変領域構造も解明されている。抗体のこのパネル由来のCDR(例えば、コチアまたはカバットCDR)を用いて、LTに結合し、LT誘発性シグナル伝達をブロックする結合分子(例えば、ヒト化抗体、修飾抗体、単鎖結合分子)を生成することができる。したがって、本発明は、LTに特異的な1つ以上の結合部位(例えば、可変重および可変軽領域)を含み、LTのLT Rへの結合をブロックし、先行技術の抗体と比較して改善され機能的特性を有する結合分子を対象とする。

30

40

50

【 0 0 0 5 】

1つの態様では、本発明は、リンホトキシン（L T）に結合し、参照抗体B 9（細胞系B 9 . C 9 . 1により産生、寄託番号H B 1 1 9 6 2のもとA T C Cに寄託）が細胞中L T誘発性生体活性を約5 0 %ブロックする条件下において、細胞中L T誘発性生体活性を少なくとも約7 0 %ブロックする単離結合分子、またはその抗原結合領域を成す分子に関する。

【 0 0 0 6 】

別の態様では、本発明は、リンホトキシン（L T）に結合し、細胞中L T誘発性生体活性を1 0 0 n M未満のI C 5 0でブロックする単離結合分子、またはその抗原結合領域を成す分子に関する。

10

【 0 0 0 7 】

別の態様では、本発明は、リンホトキシン（L T）に結合し、L T R - I gの細胞への結合を少なくとも8 5 %ブロックする単離結合分子、またはその抗原結合領域を成す分子に関する。

【 0 0 0 8 】

別の態様では、本発明は、単離結合分子またはその抗原結合領域を成す分子に関し、ここでL T誘発性生体活性はI L - 8放出である。

【 0 0 0 9 】

1つの実施形態では、結合分子は、ヒトアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 0 】

1つの実施形態では、結合分子（その抗原結合領域を含む）は、抗体定常領域配列またはその断片を含むヒトアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 1 1 】

1つの実施形態では、本発明は、ヒト定常領域が少なくとも1つのF c受容体への結合を低下させるように改変されているI g G 1定常領域である結合分子に関する。

【 0 0 1 2 】

1つの実施形態では、本発明は、ヒト定常領域が少なくとも1つのF c受容体への結合を高めるように改変されているI g G 1定常領域である結合分子に関する。

【 0 0 1 3 】

1つの実施形態では、本発明は、ヒト化である結合分子に関する。

30

【 0 0 1 4 】

1つの実施形態では、L T誘発性生体活性は、少なくとも約8 0 %ブロックされる。1つの実施形態では、L T誘発性生体活性は、少なくとも約9 0 %ブロックされる。1つの実施形態では、L T R - I g結合は、少なくとも約9 0 %ブロックされる。

【 0 0 1 5 】

1つの実施形態では、結合分子は、細胞中のL T誘発性生体活性を3 0 n M未満のI C 5 0でブロックする、またはその抗原結合領域を成す分子である。

【 0 0 1 6 】

1つの実施形態では、結合分子は、細胞中のL T誘発性生体活性を1 0 n M未満のI C 5 0でブロックする、またはその抗原結合領域を成す分子である。

40

【 0 0 1 7 】

別の実施形態では、本発明の結合分子は、細胞中のL T誘発性生体活性を3 n M未満のI C 5 0でブロックする、またはその抗原結合領域を成す分子である。

【 0 0 1 8 】

1つの実施形態では、結合分子は、L T R結合部位を残さないようにL T上の2つの部位に結合する。

【 0 0 1 9 】

1つの実施形態では、結合分子は、完全長抗体である。1つの実施形態では、結合分子は、s c F v分子である。

【 0 0 2 0 】

50

別の実施形態では、本発明は、L T エピトープに特異的に結合する結合分子に関し、その抗体によるL T エピトープへの結合は1 0 2 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる。

【0 0 2 1】

1つの実施形態では、L T のアミノ酸1 9 3 位および1 9 4 位が抗体の結合にとって重要である。

【0 0 2 2】

別の実施形態では、本発明は、L T エピトープに特異的に結合する結合分子に関し、その抗体によるL T エピトープへの結合がA 0 D 9 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる。

【0 0 2 3】

別の実施形態では、本発明は、L T エピトープに特異的に結合する結合分子に関し、その抗体によるL T エピトープへの結合が1 0 1 / 1 0 3 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる。

【0 0 2 4】

別の実施形態では、本発明は、L T エピトープに特異的に結合する結合分子に関し、その抗体によるL T エピトープへの結合が1 0 5 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる。

【0 0 2 5】

1つの実施形態では、L T のアミノ酸9 6 位、9 7 位、9 8 位、1 0 6 位、1 0 7 位、および1 0 8 位が抗体の結合にとって重要である。

【0 0 2 6】

別の実施形態では、本発明は、L T エピトープに特異的に結合する結合分子に関し、その抗体によるL T エピトープへの結合が9 B 4 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる。

【0 0 2 7】

1つの実施形態では、L T のアミノ酸9 6 位、9 7 位、および9 8 位が抗体の結合にとって重要である。

【0 0 2 8】

別の実施形態では、本発明は、L T エピトープに特異的に結合する結合分子に関し、その抗体によるL T エピトープへの結合がA 1 D 5 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる。

【0 0 2 9】

1つの実施形態では、L T のアミノ酸1 7 2 位が抗体の結合にとって重要である。

【0 0 3 0】

別の実施形態では、本発明は、L T エピトープに特異的に結合する結合分子に関し、抗体によるL T エピトープへの結合が1 0 7 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる、。

【0 0 3 1】

1つの実施形態では、本発明は、L T のアミノ酸1 5 1 位および1 5 3 位が抗体の結合にとって重要である。

【0 0 3 2】

1つの実施形態では、本発明は、L T エピトープに特異的に結合する単離抗体に関し、その抗体によるL T エピトープへの結合が1 0 8 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる。

【0 0 3 3】

1つの実施形態では、結合分子はヒトアミノ酸配列を含む。

【0 0 3 4】

1つの実施形態では、ヒトアミノ酸配列は抗体定常領域配列である。

【0 0 3 5】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、抗体はヒト化である。

【0036】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、軽鎖および重鎖CDRがA0D9、108、107、A1D5、102、101/103、9B4および105からなる群から選択される抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0037】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRがA0D9抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

10

【0038】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRが108抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0039】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRが107抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

20

【0040】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRがA1D5抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0041】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRが102抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0042】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRが101/103抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

30

【0043】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRが105抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0044】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRが9B4抗体由来であるリンホトキシン結合分子に関する。

40

【0045】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRH1が配列GFSLX₁X₂Y/SGX₃Hを含み、Xは任意のアミノ酸であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0046】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む

50

軽鎖可変領域を含み、CDRH2が配列V I W X₁ G G X₂ T X₃ X₄ N A X₅ F X₆ Sを含み、Xは任意のアミノ酸であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0047】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRL1が配列R A S X₁ S V X₂ X₃ X₄ X₅またはX₁ A S Q D X₂ X₃ X₄ X₅ L X₆を含み、Xは任意のアミノ酸であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0048】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRL2は配列R A X₁ R L X₂ Dを含み、Xは任意のアミノ酸であるリンホトキシン結合分子に関する。

10

【0049】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRL2は配列X₁ X₂ S X₃ X₄ X₅ Sを含み、Xは任意のアミノ酸であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0050】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRL3は配列X₁ Q X₂ X₃ X₄ X₅ P X₆ Tを含み、Xは任意のアミノ酸であるリンホトキシン結合分子に関する。

20

【0051】

別の態様では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含み、CDRL3は配列L X₁ X₂ D X₄ F P X₆ Tを含み、Xは任意のアミノ酸であるリンホトキシン結合分子に関する。

【0052】

別の態様では、本発明は、105抗体変異体の重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに105変異体の軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン結合分子に関する。

30

【0053】

1つの実施形態では、本発明は、溶解度が100または120mg/ml超である結合分子に関する。

【0054】

1つの実施形態では、結合分子は、105変異体のL10型の軽鎖可変領域を含む。

【0055】

1つの実施形態では、結合分子は、105変異体のH1型の重鎖可変領域を含む。

40

【0056】

1つの実施形態では、結合分子は、105変異体のH1型の重鎖可変領域もしくはそのCDRならびに105変異体のL10型の軽鎖可変領域もしくはそのCDRを含む。

【0057】

1つの実施形態では、本発明は、本発明の結合分子および担体を含む組成物に関する。

【0058】

1つの実施形態では、本発明は、抗LT結合分子による治療から恩恵を受けるであろう対象の治療方法に関し、本方法は、対象が治療されるように対象に分子を投与することを含む。

【0059】

50

1つの実施形態では、対象は炎症を特徴とする障害を呈する。

【0060】

1つの実施形態では、炎症障害は、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植、ループス、炎症肝疾患、乾癬、シェーグレン症候群、多発性硬化症（例えば、SPMS）、ウイルス誘発性肝炎、自己免疫性肝炎、1型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、およびウイルス性ショック症候群からなる群から選択される。

【0061】

1つの実施形態では、炎症障害は関節リウマチである。

【0062】

1つの実施形態では、対象は癌を呈する。1つの実施形態では、癌は、多発性骨髄腫および無痛性濾胞性リンパ腫からなる群から選択される。

10

【0063】

本発明の1つの態様では、本発明の結合分子をコードする核酸分子に関する。1つの実施形態では、核酸分子はベクター中にある。

【0064】

1つの実施形態では、本発明は、ベクターを含む宿主細胞に関する。

【0065】

1つの実施形態では、本発明は、(i)請求項66の宿主細胞を培養して、宿主細胞培養培地中に抗体または結合分子が分泌されるようにすること、(ii)抗体または結合分子を培地から単離すること、を含む抗体または結合分子の産生方法に関する。

20

【0066】

別の態様では、本発明は、薬品の製造における本発明の結合分子を含む組成物の使用に関する。

【0067】

別の実施形態では、薬品は、炎症を伴う障害の治療用である。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1A】図1Aは、IL-8放出アッセイを用いた抗LT抗体の阻害曲線を示す。パネルAにおいて、白菱形は102抗体を表し、白四角は105抗体を表し、黒三角はA0D9抗体を表し、白三角はB9抗体を表し、黒丸はC37抗体を表し、および白丸はB27抗体を表す。パネルBにおいて、黒丸は105抗体を表し、白三角は107抗体を表す。パネルCは、9B4抗体の阻害曲線を表す。

30

【図1B】図1Bは、IL-8放出アッセイを用いた抗LT抗体の阻害曲線を示す。パネルAにおいて、白菱形は102抗体を表し、白四角は105抗体を表し、黒三角はA0D9抗体を表し、白三角はB9抗体を表し、黒丸はC37抗体を表し、および白丸はB27抗体を表す。パネルBにおいて、黒丸は105抗体を表し、白三角は107抗体を表す。パネルCは、9B4抗体の阻害曲線を表す。

【図1C】図1Cは、IL-8放出アッセイを用いた抗LT抗体の阻害曲線を示す。パネルAにおいて、白菱形は102抗体を表し、白四角は105抗体を表し、黒三角はA0D9抗体を表し、白三角はB9抗体を表し、黒丸はC37抗体を表し、および白丸はB27抗体を表す。パネルBにおいて、黒丸は105抗体を表し、白三角は107抗体を表す。パネルCは、9B4抗体の阻害曲線を表す。

40

【図2】図2A～2Gは、MOPC-21（アイソタイプ対照として用いたマウスIgG1抗体）：図2B）、mLT R-mIgG1（図2C）、抗体BBF6（mIgG1）（図2D）；抗体B9（mIgG1）（図2E）；抗体LT102（図2F）、抗体LT105（図2G）を注射したキメラ化(huSCID)マウス由来のMOMA-1+マクロファージの状態を示す組織学的結果を提示する。野生型C57BL/6切片も図2Aに示す。

【図3】図3A～3Gは、ヒトLT 1 2のブロックによるHEVの低減を示す組織学的結果を提示する。MOPC-21（アイソタイプ対照として用いたマウスIgG1抗体

50

）：図3B）、mLT R - mIgG1（図3C）、抗体BBF6（mIgG1）（図3D）；抗体B9（mIgG1）（図3E）；抗体LT102（図3F）、抗体LT105（図3G）。野生型C57BL/6切片も図3Aに示す。

【図4A】図4、パネルAは、LT発現細胞へのLT RIg（またはFc）のブロックを測定するブロックアッセイにおいて抗体LT102およびLT105が優れた効能を示すことを示すグラフを提示する。パネルAにおいて、黒四角はLT R - Igを表し、白丸は102抗体を表し、白四角は105抗体を表し、白三角はB9抗体を表し、白菱形はC37抗体を表し、黒丸はB27抗体を表す。パネルBは、抗体9B4によるLT RIg（またはFc）をブロックすることにおいて類似の優れた効能を示す。

【図4B】図4、パネルAは、LT発現細胞へのLT RIg（またはFc）のブロックを測定するブロックアッセイにおいて抗体LT102およびLT105が優れた効能を示すことを示すグラフを提示する。パネルAにおいて、黒四角はLT R - Igを表し、白丸は102抗体を表し、白四角は105抗体を表し、白三角はB9抗体を表し、白菱形はC37抗体を表し、黒丸はB27抗体を表す。パネルBは、抗体9B4によるLT RIg（またはFc）をブロックすることにおいて類似の優れた効能を示す。

【図5】図5は、抗体102（白三角）、105（黒丸）、A1D5（白菱形）、107（黒三角）、A0D9b（白丸）、および103（黒ダイヤ）がすべてB9（白多角形）、B27（白逆三角）、およびC37（白四角）よりも効果的にブロックすることを示すLT RIgブロックアッセイ（図4）のデータを提示する。LT Rは黒四角で示す。

【図6】図6は、3つの異なる裂け目（ 、 、および ）を含む、2つのBサブユニットおよび単一のAサブユニットを含むLT 1 2ヘテロ三量体の図式を示す。

【発明を実施するための形態】

【0069】

I. 定義

「a」または「an」実体という用語は、1つ以上の実体を指すことに留意されたい；例えば、「LT結合分子（an LT binding molecule）」とは、1つ以上のLT結合分子を表すことが理解される。（本明細書で使用する、LTという用語は、別段の指定のない限り、LT 1 2を指す）。したがって、「a」（または「an」）、「1つ以上」、および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書において同義的に使用できる。

【0070】

本明細書で使用する「ポリペプチド」という用語は、単数形の「ポリペプチド」ならびに複数形の「ポリペプチド」を包含することを意図し、アミド結合（ペプチド結合としても知られている）により線形的に結合した単量体（アミノ酸）からなる分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖（1つまたは複数）を指し、特定の長さの生産物を指さない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2つ以上のアミノ酸の鎖（1つまたは複数）を指すために使用する他の用語はいずれも「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれの代わりにもまたはこれらの用語のいずれとも同義的に用いてよい。「ポリペプチド」という用語は、ポリペプチドの発現後修飾の生産物（グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、または非天然アミノ酸による修飾が挙げられるが、これらに限定されない）を指すことも意図する。ポリペプチドは、天然の生物源から単離または精製してもよいし、組換え技術により産生してもよいが、指定の核酸配列から翻訳される必要はない。ポリペプチドは、当技術分野で知られている方法（化学合成を含む）を用いて生成することができる。

【0071】

本発明のポリペプチドは、本明細書に詳述のとおりLTに特異的な結合部位を少なくとも1つ含む。したがって、主題のポリペプチドは、本明細書において「結合分子」とも呼ばれる。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、抗LT抗体または修飾抗体である。

【 0 0 7 2 】

1つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、単離されている。「単離された」ポリペプチドまたはその断片、変異体、もしくは誘導体とは、その自然環境にないポリペプチドを指す。1つの実施形態では、特定レベルの精製を要さない。例えば、単離ポリペプチドはその天然または自然環境から除くことができる。宿主細胞中で発現する組換え産生ポリペプチドおよびタンパク質は、任意の適切な技術により分離、分画、または部分的にもしくは実質的に精製されている天然もしくは組換えポリペプチドと同様に、本発明の目的のために単離されているとみなされる。

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用する、指定のタンパク質「由来の」という用語は、ポリペプチドの起源を指す。1つの実施形態では、特定の開始ポリペプチド由来のポリペプチドまたはアミノ酸配列は、可変領域配列（例えばVHおよび/またはVL）またはそれに関連する配列（例えばCDRまたはそこに由来するフレームワーク領域）である。1つの実施形態では、特定の開始ポリペプチド由来のアミノ酸配列は、連続的ではない。例えば、1つの実施形態では、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDR（例えば、コチアまたはカバットCDR）が本発明の結合分子の使用のための開始抗LT抗体に由来する。1つの実施形態では、特定の開始ポリペプチドまたはアミノ酸配列由来のポリペプチドまたはアミノ酸配列は、開始配列またはその一部と本質的に同一であり、部分が少なくとも3～5個のアミノ酸、5～10個のアミノ酸、少なくとも10～20個のアミノ酸、少なくとも20～30個のアミノ酸、または少なくとも30～50個のアミノ酸、あるいはその開始配列にその起点を有すると、当業者が識別可能なものからなるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 7 4 】

また、本発明のポリペプチドは、上述のポリペプチドの断片、誘導体、アナログ、もしくは変異体、ならびにそれらの組み合わせも含む。「断片」、「変異体」、「誘導体」および「アナログ」という用語は、本発明の結合分子を指す場合、対応する分子の結合特性の少なくとも一部を保持するポリペプチドを含む。本発明のポリペプチド断片としては、本明細書の他の個所で論じた特異的な抗体断片に加えてタンパク質分解断片、ならびに欠失断片が挙げられる。本発明の結合分子の変異体は、上記のような断片を含み、アミノ酸置換、欠失、または挿入により改変されたアミノ酸配列のポリペプチドも含む。変異体は天然でもよいし、非天然でもよい。非天然変異体は当技術分野で知られている変異誘発技術を用いて産生してよい。変異体ポリペプチドは、保守的もしくは非保守的アミノ酸置換、欠失または添加を含んでよい。したがって、ポリペプチド中のアミノ酸残基は同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換してよい。別の実施形態では、アミノ酸のストリングは、側鎖ファミリーメンバーの順序および/または組成物が異なる構造的に類似したストリングで置換することができる。あるいは、別の実施形態では、すべてまたは一部のポリペプチドに沿って無作為に変異を誘発してよい。

【 0 0 7 5 】

1つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、6つのCDR（すなわち、LTに結合する抗体由来である3つの軽鎖CDRおよびLTに結合する同じまたは異なる抗体由来である3つの重鎖CDR）を含む抗LT抗体結合部位を少なくとも1つ含む抗体分子または修飾抗体分子である。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、LTに結合する抗体由来である軽鎖可変領域およびLTに結合する抗体由来である重鎖可変領域を含む1つの結合部位を含む。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、少なくとも2つの結合部位を含む。1つの実施形態では、結合分子は、2つの結合部位を含む。1つの実施形態では、結合分子は、2つより多い結合部位を含む。1つの実施形態では、本発明は、これらの単離LT結合分子またはこれらをコードする核酸分子に関する。

【 0 0 7 6 】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は単量体である。別の実施形態では、本発明の結合分子は多量体である。例えば、1つの実施形態では、本発明の結合分子は二量体である。1つの実施形態では、本発明の二量体はホモ二量体であり、2つの同一の単量体サブ

ユニットを含む。別の実施形態では、本発明の二量体はヘテロ二量体であり、2つの同一ではない単量体サブユニットを含む。二量体サブユニットは、1本以上のポリペプチド鎖を含んでよい。例えば、1つの実施形態では、二量体は、少なくとも2本のポリペプチド鎖を含む。1つの実施形態では、二量体は2本のポリペプチド鎖を含む。別の実施形態では、二量体は4本のポリペプチド鎖を含む（例えば、抗体分子の場合）。

【0077】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は一価である、すなわち、1つのLT標的結合部位を含む（例えば、scFv分子の場合）。1つの実施形態では、本発明の結合分子は多価である、すなわち、標的結合部位を1つより多く含む。別の実施形態では、結合分子は少なくとも2つの結合部位を含む。1つの実施形態では、結合分子は2つの結合部位を含む（例えば、抗体の場合）。1つの実施形態では、結合分子は3つの結合部位を含む。別の実施形態では、結合分子は4つの結合部位を含む。別の実施形態では、結合分子は結合部位を4つより多く含む。

10

【0078】

本明細書で使用する「結合価」という用語は、結合分子における潜在的な結合部位数を指す。結合分子は、「一価」で単一の結合部位を有してもよいし、「多価」（例えば、二価、三価、四価、または五価以上）であり得る。各結合部位は、1つの標的分子または標的分子上の特定部位（例えば、エピトープ）に特異的に結合する。結合分子が標的結合部位を1つより多く含む場合（例えば多価結合分子）、各標的結合部位は同じ分子に特異的に結合してもよいし、異なる分子に特異的に結合してもよい（例えば、異なるLT分子に結合してもよいし、同一分子上の異なるエピトープに結合してもよい）。

20

【0079】

本明細書で使用する「結合部分」、「結合部位」、または「結合ドメイン」という用語は、LTに特異的に結合する抗体の可変領域部分を指す。1つの実施形態では、結合部位は、LTに結合する抗体由来である3つの軽鎖CDRおよびLTに結合する抗体由来である3つの重鎖CDRを含む。

【0080】

「結合特異性」または「特異性」という用語は、所与の標的分子またはエピトープと特異的に結合する（例えば、免疫反応する）結合分子の能力を指す。ある実施形態では、本発明の結合分子は、2つ以上の結合特異性を含む（すなわち、それらは1つ以上の異なる抗原上に存在する2つ以上の異なるエピトープと同時に結合する）。結合分子は「単一特異的」で単一の結合特異性を有してもよいし、「多特異的」（例えば、二重特異性または三重特異性または四重以上の多特異性）で2つ以上の結合特異性を有してもよい。例示的な実施形態では、本発明の結合分子は、「二重特異性」であり、2つの結合特異性を含む。したがって、LT結合分子が「単一特異的」であるか「多特異的」、例えば、「二重特異性」であるかということは、結合分子が反応する異なるエピトープ数を指す。例示的な実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、1つ以上のLT分子上の異なるエピトープに特異的であり得る。所与の本発明の結合分子は、特定の結合特異性に対して一価であってもよいし、多価であってもよい。

30

【0081】

本明細書に開示される結合分子は、それらが認識するかまたはそれらが特異的に結合する抗原（例えば、LT標的ポリペプチド）のエピトープ（1つまたは複数）またはその部分（1つまたは複数）に関して記載し得るかまたは指定し得る。結合部位と特異的に相互作用する標的ポリペプチド部分または結合分子部分が、「エピトープ」、または「抗原決定因子」である。標的ポリペプチドは、単一のエピトープを含んでよいが、典型的には、少なくとも2個のエピトープを含み、サイズ、立体構造、および抗原種類に応じていくつかのエピトープを含むことができる。さらに、標的ポリペプチド上の「エピトープ」は、非ポリペプチド因子であってもよいしそれを含んでもよい、例えば、「エピトープ」は炭水化物側鎖を含んでよいことに留意されたい。抗体のためのペプチドまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは、約4～5個のアミノ酸と考えられる。ペプチドまたはポリペ

40

50

プチドエピトープは好ましくは少なくとも7個、より好ましくは少なくとも9個、最も好ましくは少なくとも約15～約30個のアミノ酸を含む。CDRは3級の形態での抗原ペプチドまたはポリペプチドを認識できるため、エピトープを含むアミノ酸は連続的である必要がなく、場合によっては、同一ペプチド鎖上になくてもよい。本発明では、本発明の抗LT抗体により認識されるプチドまたはポリペプチドエピトープは、LTの少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、より好ましくは少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、または約15～約30個の連続的または非連続的アミノ酸配列を含む。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、二価的にLTヘテロ三量体に結合する。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、ヘテロ三量体によるLT Rリガンドの結合がブロックされるように、例えば、LT Rリガンドの結合部位が残らないようにLTヘテロ三量体に結合する。

10

【0082】

「特異的に結合する」とは、結合分子が、その結合部位（例えば、抗原結合ドメイン）を介してエピトープに結合し、結合が結合部位とエピトープ間でいくらかの相補性を要することを一般に意味する。この定義によると、結合分子は、エピトープに結合時、関連しないエピトープに結合するよりも容易に、結合部位を介してエピトープに結合する時、「特異的に結合する」と呼ぶ。結合分子が多特異的である場合、結合分子は、結合分子の別の結合部位（例えば、抗原結合ドメイン）を介して第二（すなわち、第一エピトープと関連しない）エピトープに特異的に結合し得る。

20

【0083】

「選択的に結合する」とは、結合分子が、関連する、類似の、相同の、または相似のエピトープに結合するよりも容易に結合部位を介してエピトープに特異的に結合することを意味する。したがって、所与のエピトープに「選択的に結合する」抗体は、かかる結合分子は関連エピトープと交差反応し得るが、関連エピトープに結合するよりもエピトープに結合する可能性が高い。

【0084】

本明細書で使用する「交差反応」という用語は、1つの抗原または抗体に特異的である結合分子が第二抗原と反応する能力を指し、2つの異なる抗原物質間の関連性の測定値である。したがって、抗体は、その形態を誘発したもの以外のエピトープに結合する場合、交差反応する。交差反応エピトープは一般には、誘発するエピトープと同じ相補的構造的

30

【0085】

例えば、ある結合分子は、関連するが同一ではないエピトープ、例えば、（当技術分野で知られている方法および本明細書に記載の方法を用いて計算して）参照エピトープと少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、および少なくとも50%同一性のエピトープと結合する点で、ある程度の交差反応を有する。抗体は、（当技術分野で知られている方法および本明細書に記載の方法を用いて計算して）参照エピトープと95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、および50%未満の同一性のエピトープに結合しない場合、交差反応がないかほとんどないと呼び得る。抗体が、ある抗原またはエピトープの他のいかなるアナログ、オルソログ、もしくはホモログにも結合しない場合、その抗原またはエピトープに対して「高度に特異的」とであるとみなしてよい。

40

【0086】

本明細書で使用する「親和性」という用語は、結合分子の結合部位と個々のエピトープとの結合の強さの測定を指す。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988) at pages 27-28を参照されたい。好ましい結合親和性は、解離定数またはKdが 5×10^{-2} M未満のものを含む。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、 5×1

50

10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、または 10^{-15} M 未満の親和性で L T に特異的に結合する。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、L T ヘテロ三量体上の高親和性部位に 100×10^{-9} 未満の親和性で結合する。

【0087】

本明細書で使用する「結合活性」という用語は、結合分子（例えば抗体）集団と抗原間の結合体の全体的な安定性、すなわち、抗原と混合した結合分子の機能的結合の強さを指す。例えば、Harlow at pages 29-34 を参照されたい。結合活性は、集団における個々の結合分子の特異的なエピトープとの親和性、および結合分子と抗原の結合価の両方に関連する。例えば、二価モノクローナル抗体と高度に反復するエピトープ構造の抗原（ポリマーなど）間の相互作用は1つの高い結合活性である。

10

【0088】

本明細書で使用する「効能」という用語は、特定のアッセイにおいて、あるレベルの有効性を与えることが見出される結合分子濃度を指す。例えば、1つの実施形態では、主題の結合分子は L T R の生体活性を少なくとも約 70 %、少なくとも 80 %、もしくは少なくとも 90 % ブロックする；L T R 結合を少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % ブロックする、ならびに / または細胞中 L T 誘発性生体活性を 500 nM 未満、100 nM 未満、30 nM 未満、10 nM 未満、3 nM 未満の IC50 でブロックする。

20

【0089】

本発明の結合分子の結合部位は、抗体分子の抗原結合部位を含む。抗原結合部位は、ポリペプチドごとに異なる可変領域により形成される。1つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、少なくとも2つの抗原結合部位を含む。本明細書で使用する「抗原結合部位」という用語は、抗原（例えば、抗原の細胞表面または可溶型）と特異的に結合する（免疫反応する）部位を含む。抗原結合部位は、免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域を含み、これらの可変領域により形成される結合部位が抗体の特異性を決定する。1つの実施形態では、本発明の抗原結合部位は、抗 L T 抗体分子の重鎖または軽鎖 C D R を少なくとも1つ含む。別の実施形態では、本発明の抗原結合部位は、1つ以上の抗 L T 抗体分子由来の C D R を少なくとも2つ含む。別の実施形態では、本発明の抗原結合部位は、1つ以上の抗 L T 抗体分子由来の C D R を少なくとも3つ含む。別の実施形態では、本発明の抗原結合部位は、1つ以上の抗 L T 抗体分子由来の C D R を少なくとも4つ含む。別の実施形態では、本発明の抗原結合部位は、1つ以上の抗 L T 抗体分子由来の C D R を少なくとも5つ含む。別の実施形態では、本発明の抗原結合部位は、L T に結合する1つ以上の抗体分子由来の少なくとも6つの C D R（3つの重および3つの軽）を含む。

30

【0090】

本発明の好ましい結合分子は、ヒトアミノ酸配列由来のフレームワークおよび / または定常領域アミノ酸配列を含む。しかしながら、結合ポリペプチドは、別の哺乳類種由来のフレームワークおよび / または定常領域配列を含んでよい。例えば、マウス配列を含む結合分子が、ある用途のために適している場合がある。1つの実施形態では、霊長類フレームワーク領域（例えば、非ヒト霊長類）、重鎖部分、および / またはヒンジ部分を主題の結合分子に含んでよい。1つの実施形態では、1つ以上の非ヒト（例えば、マウス）アミノ酸が結合ポリペプチドのフレームワーク領域に存在し得る、例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類フレームワークアミノ酸配列は、対応するマウスアミノ酸残基が存在するおよび / または開始マウス抗体に見られない異なるアミノ酸残基の1つ以上の変異（例えば、結合または生物物理学的特性を至適化する他の変異）を含み得る1つ以上のアミノ酸復帰変異を含んでよい。本発明の好ましい結合分子は、同じ C D R を含むマウス抗体よりヒトにお

40

50

ける免疫原性が小さい。

【0091】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書において同義的に使用される。抗体または免疫グロブリンは少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常は、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む。脊椎動物系における基礎的免疫グロブリン構造は、比較的よく理解されている。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988)を参照されたい。

【0092】

以下に詳細に論じるように、「免疫グロブリン」という用語は、生化学的に識別できる様々な広いクラスのポリペプチドを含む。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)に、それらの間の一部のサブクラス(例えば、1 ~ 4)に分類されることを、当業者は理解するであろう。この鎖の性質により、抗体「クラス」がそれぞれIgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEとして決定される。免疫グロブリンサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1など)の特性は十分に決定されており、機能的分化を付与することが知られている。これらのクラスおよびアイソタイプのそれぞれの修飾型は、当業者にとって本開示を考慮して容易に識別可能であり、したがって、本発明の範囲内である。

【0093】

軽鎖は、カッパまたはラムダ(κ 、 λ)のいずれかに分類される。各重鎖クラスは、カッパ軽鎖またはラムダ軽鎖のいずれかと結合し得る。

【0094】

軽鎖と重鎖は両方とも、構造的および機能的相同領域に分けられる。「定常」および「可変」という用語は機能的に使用する。この観点から、軽(VL)鎖部分と重(VH)鎖部分の両可変ドメインにより抗原認識および特異性が決定されることが理解されるであろう。逆に、軽鎖(CL)および重鎖(CH1、CH2またはCH3)の定常ドメインは、重要な生物学的特性(分泌、経胎盤性、Fc受容体結合、補体結合など)を付与する。慣例的に、定常領域ドメイン番号は、それらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより離れると増大する。N末端部分は可変領域であり、C末端部分は定常領域である。CH3ドメインおよびCLドメインは実際、それぞれ重鎖のカルボキシル末端および軽鎖のカルボキシル末端を含む。

【0095】

上に示すように、可変領域は、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識して特異的に結合することを可能とする。すなわち、抗体のVLドメインおよびVHドメイン、または相補性決定領域(CDR)の部分集合(例えば、ある場合には、CH3ドメイン)は、合わさって、3次元抗原結合部位を定義する可変領域を形成する。この四価抗体構造は、Y字型の各腕の末端に存在する抗原結合部位を形成する。1つの実施形態では、抗原結合部位は、VH鎖とVL鎖それぞれの3つのCDRにより定義される。ある場合には、例えば、ラクダ科種由来であるかまたはラクダ科免疫グロブリンに基づき遺伝子操作されたある免疫グロブリン分子、完全な免疫グロブリン分子は、軽鎖を欠いた重鎖のみからなり得る。例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993)を参照されたい。

【0096】

本明細書で使用する「可変領域CDRアミノ酸残基」という用語は、配列または構造に基づいた方法を用いて特定したCDRすなわち相補性決定領域におけるアミノ酸を含む。本明細書で使用する「CDR」または「相補性決定領域」という用語は、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両可変領域内に見られる非連続的抗原結合部位を指す。これらの特定の領域は、Kabatt et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977)およびKabatt et al., Sequen

10

20

30

40

50

ces of protein of immunological interest . (1991) により、ならびに Chothia et al. , J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) により、ならびに MacCallum et al. , J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) によって記載されており、これらの定義は互いに比較時にアミノ酸残基の重複もしくは部分集合を含み、当業者はこれらの任意の定義を用いて本明細書に記載の抗 L T 抗体の CDR を容易に同定できる。上に引用したそれぞれの参考文献により定義される CDR を包含するアミノ酸残基を比較のために以下に説明する。好ましくは、「CDR」という用語は、配列比較に基づくカバットにより定義される CDR である。

【表 1】

CDR 定義

	CDR 定義		
	カバット ¹	コチア ²	マッカラム ³
V _H CDR 1	31~35	26~32	30~35
V _H CDR 2	50~65	53~55	47~58
V _H CDR 3	95~102	96~101	93~101
V _L CDR 1	24~34	26~32	30~36
V _L CDR 2	50~56	50~52	46~55
V _L CDR 3	89~97	91~96	89~96

¹ 上記 Kabat et al. の命名法に従う番号付け

² 上記 Chothia et al. の命名法に従う番号付け

³ 上記 MacCallum et al. の命名法に従う番号付け

【0097】

本明細書で使用する「可変領域フレームワーク (FR) アミノ酸残基」という用語は、Ig 鎖のフレームワーク領域内のアミノ酸またはその一部を指す。本明細書で使用する「フレームワーク領域」または「FR 領域」という用語は、可変領域の一部であるが、(例えば、CDR のカバット定義を用いて) CDR の一部ではないアミノ酸残基を含む。したがって、可変領域フレームワークは、約 100 ~ 120 個のアミノ酸の長さであるが、CDR の外のアミノ酸のみを含む。重鎖可変領域の具体例において、および Kabat et al. により定義される CDR において、フレームワーク領域 1 はアミノ酸 1 ~ 30 位を含む可変領域ドメインに対応し；フレームワーク領域 2 はアミノ酸 36 ~ 49 位を含む可変領域ドメインに対応し；フレームワーク領域 3 はアミノ酸 66 ~ 94 位を含む可変領域ドメインに対応し、およびフレームワーク領域 4 は可変領域のアミノ酸 103 位から末端までの可変領域ドメインに対応する。同様に軽鎖のフレームワーク領域は各軽鎖可変領域 CDR により分離される。同様に、Chothia et al. または MacCallum et al. による CDR の定義を用いて、フレームワーク領域の境界は、上記のようにそれぞれの CDR 末端により分離される。好ましい実施形態では、CDR は、カバットにより定義される。別の実施形態では、CDR は、コチアにより定義される。

【0098】

Kabat et al. はまた、任意の抗体に適用可能な可変ドメイン配列の番号付け体系も定義した。当業者は、この「カバット番号付け」体系を、配列自体以外のいかなる実験データにもよらずに任意の可変ドメイン配列に明白に適用できる。本明細書で使用する「カバット番号付け」とは、Kabat et al. , U. S. Dept. of Health and Human Services , "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983) により説明されている番号付け体系を指す。他に指定のない限り、本発明の L T R 抗体またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の可変領域の番号付けへの言及は、カバット番号付け体系に従う。

【0099】

本明細書で使用する「Fc領域」という用語は、パライン切断部位の直上のヒンジ領域（すなわち、重鎖定常領域の第一残基を114位と考慮した場合のIgG中の残基216位）に開始し、抗体のC末端で終わる免疫グロブリン重鎖部分を指す。したがって、完全なFc領域は、少なくともヒンジドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含む。抗体分子のFc領域は、二量体である。本発明の結合分子は、完全なFc領域または1つ以上のFc部分を含んでよい。1つの実施形態では、結合分子のFc領域はキメラでよい。例えば、ポリペプチドのFcドメインは、IgG1分子由来のCH1ドメインおよびIgG3分子由来のヒンジ領域を含んでよい。別の例では、Fc領域は、部分的にIgG1分子由来および部分的にIgG3分子由来のヒンジ領域を含むことができる。別の例では、Fc領域は、部分的にIgG1分子由来、部分的にIgG4分子由来のキメラヒンジを含むことができる。1つの実施形態では、本発明の二量体Fc領域は、1本のポリペプチド鎖を含んでよい。別の実施形態では、本発明の二量体Fc領域は、例えば、抗体分子の場合、2本のポリペプチド鎖を含んでよい。

10

20

30

40

50

【0100】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、定常領域、例えば、重鎖定常領域および/または軽鎖定常領域を少なくとも1つ含む。1つの実施形態では、かかる定常領域は、野生型定常領域と比較して修飾されている。すなわち、本明細書に開示された本発明のポリペプチドは、1つ以上の3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2またはCH3）および/または軽鎖定常領域ドメイン（CL）に改変または修飾を含んでよい。例示的な修飾は、1つ以上のドメインにおける1つ以上のアミノ酸の付加、欠失または置換を含む。かかる変化はエフェクター機能、半減期などを至適化するために含んでよい。

【0101】

重鎖定常領域におけるアミノ酸位置（CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3ドメイン中のアミノ酸位置を含む）は、本明細書においてEUIンデックス番号付け体系（Kabata et al., in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991を参照されたい）に従い番号付けされる。一方、軽鎖定常領域におけるアミノ酸位置（例えばCLドメイン）は、本明細書においてカバットインデックス番号付け体系（Kabata et al., 同書を参照されたい）に従い番号付けされる。

【0102】

例示的な結合分子は、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、多特異的、ヒト、ヒト化、霊長類化、またはキメラ抗体、単鎖抗体、エпитープ結合断片、例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、Fv、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合したFv(sdFv)、VLドメインかVHドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブラリーにより産生した断片を含むかまたは含んでよい。scFv分子は、当技術分野で知られており、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。Ig重鎖を含む本発明の結合分子は、免疫グロブリン分子の任意の種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、任意のクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）または任意のサブクラスであり得る。

【0103】

結合分子は、単独または、完全もしくは部分的なヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメインと組み合わせた可変領域（1つまたは複数）を含んでよい。また、本発明は、ヒンジ領域、CH1、CH2、およびCH3ドメインを有する可変領域（1つまたは複数）の組み合わせを含む抗原結合断片も含む。

【0104】

「断片」という用語は、無傷または完全なポリペプチドより少ないアミノ酸残基を含むポリペプチドの一部またはポリペプチド部分（例えば、抗体または抗体鎖）を指す。「抗原結合断片」という用語は、抗原と結合するかまたは無傷の抗体と（すなわち、それらが

由来する無傷の抗体と)抗原結合(すなわち、特異的な結合)について競合する免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチド断片を指す。本明細書で使用する、抗体分子の「抗原結合断片」という用語は、抗体の抗原結合断片、例えば、抗体軽鎖(V_L)、抗体重鎖(V_H)、単鎖抗体(s c F v)、F(a b')₂断片、F a b断片、F d断片、F v断片、および単ドメイン抗体断片(D A b)を含む。断片は、例えば、無傷の抗体もしくは完全抗体または抗体鎖の化学的もしくは酵素的処置を介して、または組換え手段により得ることができる。

【0105】

先に示したように、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および3次元立体配置が周知である。本明細書で使用する「V_Hドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、「C_H1ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖の第一(最もアミノ末端側)定常領域ドメインを含む。C_H1ドメインはV_Hドメインに隣接しており、アミノ末端は免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域に隣接している。

10

【0106】

本明細書で使用する「C_H1ドメイン」という用語は、例えば、約E U 1 1 8 ~ 2 1 5位に伸びる免疫グロブリン重鎖の第一(最もアミノ末端側)定常領域ドメインを含む。免疫グロブリン重鎖分子のC_H1ドメインは、V_Hドメインに隣接し、アミノ末端はヒンジ領域に隣接しており、免疫グロブリン重鎖のF c領域部分は形成していない。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、免疫グロブリン重鎖分子(例えば、ヒトI g G 1またはI g G 4分子)由来のC_H1ドメインを含む。

20

【0107】

本明細書で使用する「C_H2ドメイン」という用語は、例えば、約E U 2 3 1 ~ 3 4 0位に伸びる重鎖免疫グロブリン分子部分を含む。C_H2ドメインは、別のドメインと密接に対合していない点で独特である。代わりに、2つのN結合型分岐炭水化物鎖がインタクトな天然I g G分子の2つのC_H2ドメイン間に割り込んでいる。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、I g G 1分子(例えばヒトI g G 1分子)由来のC_H2ドメインを含む。別の実施形態では、改変された本発明のポリペプチドは、I g G 4分子(例えば、ヒトI g G 4分子)由来のC_H2ドメインを含む。例示的な実施形態では、本発明のポリペプチドは、C_H2ドメイン(E U 2 3 1 ~ 3 4 0位)、またはその一部を含む。

30

【0108】

本明細書で使用する「C_H3ドメイン」という用語は、C_H2ドメインのN末端から、から残基約1 1 0個分、例えば、約3 4 1 ~ 4 4 6 b位(E U番号付け体系)に伸びる重鎖免疫グロブリン分子部分を含む。C_H3ドメインは、典型的には、抗体のC末端部分を形成する。しかしながら、一部の免疫グロブリンでは、C_H3ドメインからさらなるドメインが伸びて分子のC末端部分(例えばI g Mのμ鎖およびI g Eの鎖におけるC_H4ドメイン)を形成し得る。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、I g G 1分子(例えば、ヒトI g G 1分子)由来のC_H3ドメインを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、I g G 4分子(例えば、ヒトI g G 4分子)由来のC_H3ドメインを含む。

40

【0109】

本明細書で使用する「ヒンジ領域」という用語は、C_H1ドメインをC_H2ドメインに連結する重鎖分子部分を含む。このヒンジ領域は約2 5個の残基を含み可動性であるため、2つのN末端抗原結合領域が独立して移動することを可能にする。ヒンジ領域は、3つの異なるドメイン、すなわち上部、中央部、および下部のヒンジドメインに細分化できる(Roux et al., J. Immunol. 161: 4083 (1998))。

【0110】

本明細書で使用する「キメラ抗体」という用語は、結合部位または部分(例えば、可変領域)が第一の種から得られるか第一の種に由来し、定常領域(無傷でも、一部分でも、または本発明により修飾されていてもよい)が第二の種から得られる抗体を指す。好まし

50

い実施形態では、標的結合領域または部位が非ヒト（例えばマウスまたは霊長類）由来であり、定常領域はヒトである。

【0111】

本明細書で使用する「s c F v分子」という用語は、1つの軽鎖可変ドメイン（V L）もしくはその一部、ならびに1つの重鎖可変ドメイン（V H）もしくはその一部から本質的になり、各可変ドメイン（またはその一部）は同じまたは異なる抗体由来である結合分子を含む。s c F v分子は、好ましくは、V HドメインとV Lドメイン間に割り込んだs c F vリンカーを含む。s c F v分子は、当技術分野で知られており、例えば、米国特許第5,892,019号、H o e t a l . 1989, G e n e 77:51; B i r d e t a l . 1988 S c i e n c e 242:423; P a n t o l i a n o e t a l . 1991, B i o c h e m i s t r y 30:10117; M i l e n i c e t a l . 1991, C a n c e r R e s e a r c h 51:6363; T a k k i n e n e t a l . 1991, P r o t e i n E n g i n e e r i n g 4:837に記載されている。s c F v分子のV LドメインおよびV Hドメインは、1つ以上の抗体分子由来である。本発明のs c F v分子の可変領域は、アミノ酸配列が、それらが由来する抗体分子から変わるように修飾してよいことも当業者に理解されるであろう。例えば、1つの実施形態では、アミノ酸残基（例えば、C D Rおよび/またはフレームワーク残基）に保守的置換または変化を起こすヌクレオチドまたはアミノ酸置換を行ってよい。あるいは、または加えて、当技術分野で認識されている技術を用いて抗原結合を至適化するためにC D Rアミノ酸残基を変異させてよい。本発明の結合分子は、L T抗原に結合する能力を維持している。

【0112】

本明細書で使用する「s c F vリンカー」とは、s c F vのV LドメインとV Hドメイン間に割り込んだ部分を指す。s c F vリンカーは好ましくは抗原結合立体構造のs c F v分子を維持している。1つの実施形態では、s c F vリンカーは、s c F vリンカーペプチドを含むか、またはそれからなる。ある実施形態では、s c F vリンカーペプチドは、g l y - s e r Cペプチドを含むか、またはそれからなる。他の実施形態では、s c F vリンカーは、ジスルフィド結合を含む。

【0113】

本明細書で使用する「g l y - s e r Cペプチド」という用語は、グリシンおよびセリン残基からなるペプチドを指す。例示的なg l y - s e r Cペプチドは、アミノ酸配列（G l y₄S e r）_nを含む。1つの実施形態では、nは1である。1つの実施形態では、nは2である。別の実施形態では、nは3である。1つの好ましい実施形態では、nは4、すなわち、（G l y₄S e r）₄である。別の実施形態では、nは5である。さらに別の実施形態では、nは6である。別の例示的なg l y - s e r Cペプチドは、アミノ酸配列S e r（G l y₄S e r）_nを含む。1つの実施形態では、nは1である。1つの実施形態では、nは2である。1つの好ましい実施形態では、nは3である。別の実施形態では、nは4である。別の実施形態では、nは5である。さらに別の実施形態では、nは6である。

【0114】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、遺伝子操作された抗体分子である。本明細書で使用する「遺伝子操作された抗体」または「修飾抗体」という用語は、抗L T抗体の結合部位を含むが、従来の二価4本鎖抗体分子ではない結合分子を指す。

【0115】

1つの実施形態では、かかる分子は、重鎖と軽鎖のいずれかまたは両方の可変ドメインが、特異性が知られている抗体の1つ以上のC D R（例えば、カバットまたはコチアC D R）の少なくとも部分的な置換により、必要な場合、部分的なフレームワーク領域置換および配列変化により改変されている可変領域を含む。1つの実施形態では、C D Rは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスの抗体、または同じサブクラスの抗体にさえも由来し得る。1つの実施形態では、C D Rは、異なるクラスの抗体から、好ましくは

異なる種の抗体由来である。特異性が知られている非ヒト抗体由来の１つ以上の「ドナー」ＣＤＲがヒト重鎖または軽鎖フレームワーク領域にグラフト化されている遺伝子操作された抗体は、本明細書において「ヒト化抗体」と呼ばれる。ある可変ドメインの抗原結合能力を別の可変ドメインに移すためには、すべてのＣＤＲをドナー可変領域由来の完全なＣＤＲと置換する必要はない場合がある。そうではなく、標的結合部位の活性を維持する必要がある残基を移すことのみが必要であり得る。１つの実施形態では、かかる「ヒト化」抗体は、さらなる変化、例えば、フレームワーク領域アミノ酸配列の変異（ドナーアミノ酸の復帰変異、生殖系列アミノ酸の変異、または他の置換など）を含んでよい。本明細書に記載した説明および当技術分野で知られている説明（例えば、米国特許第５，５８５，０８９号、同第５，６９３，７６１号、同第５，６９３，７６２号、および同第６，１８０，３７０号）を考慮すると、通例の実験を実施するか試行錯誤試験するかのいずれかにより機能的に遺伝子操作された抗体かまたはヒト化抗体を得ることは、十分に当業者の力量内であろう。

【０１１６】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単離核酸分子または構築物、例えば、伝令ＲＮＡ（ｍＲＮＡ）またはプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）を含む。ポリヌクレオチドは、従来のリン酸ジエステル結合または従来にない結合（例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）に見られるアミド結合など）を含んでよい。「核酸分子」という用語は、ポリヌクレオチドに存在する１つ以上の核酸セグメント、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ断片を含む。「単離された」核酸またはポリヌクレオチドとは、その自然環境から除かれている核酸分子、ＤＮＡまたはＲＮＡを意図する。例えば、ベクター中に含まれるＬＴ結合分子をコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の目的のために単離されるとみなされる。さらに単離ポリヌクレオチドの例としては、異種の宿主細胞中に維持された組換えポリヌクレオチドや、溶液中の（部分的にまたは実質的に）精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離ＲＮＡ分子は、本発明のポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロＲＮＡ転写物を含む。本発明による単離ポリヌクレオチドまたは核酸は、合成的に産生したかかる分子をさらに含む。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写終結部位などの制御要素であってもよいし、それらを含んでもよい。

【０１１７】

本明細書で使用する「コーディング領域」とは、アミノ酸中に翻訳されたコドンからなる核酸分子部分である。「終止コドン」（ＴＡＧ、ＴＧＡ、またはＴＡＡ）はアミノ酸中に翻訳されないが、コーディング領域の一部であるとみなしてよい。ただし、隣接配列（例えばプロモーター、リボソーム結合部位、転写終結部位、イントロンなど）はいずれもコーディング領域部分ではない。２つ以上の本発明のコーディング領域が単一のポリヌクレオチド構築物、例えば、単一ベクター上、または別々のポリヌクレオチド構築物、例えば、別々の（異なる）ベクター上に存在できる。さらに、ベクターはいずれも単一のコーディング領域を含んでもよいし、２つ以上のコーディング領域を含んでもよく、例えば、単一ベクターは、免疫グロブリン重鎖可変領域と免疫グロブリン軽鎖可変領域を別々にコードし得る。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、ＬＴ結合分子またはその断片、変異体、もしくは誘導体をコードする核酸と融合しているかまたは融合していない異種のコーディング領域をコードし得る。異種のコーディング領域としては、特殊因子またはモチーフ（分泌シグナルペプチドまたは異種の機能的ドメインなど）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１１８】

本明細書で使用する「遺伝子操作された」という用語は、核酸またはポリペプチド分子に関して、合成手段により（例えば組換え技術、インビトロペプチド合成により、ペプチドの酵素もしくは化学カップリング、またはこれらの技術の一部の組み合わせにより）操作されたかかる分子を指す。

【０１１９】

本明細書で使用する「結合した」、「融合した」または「融合」という用語は同義的に

使用される。これらの用語は、化学接合や組換え手段などの任意の手段による2つ以上の因子または成分の結合を指す。「インフレーム融合」とは、2つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム（ORF）の結合して、元のORFの正確な翻訳リーディングフレームを維持する形で連続したより長いORFを形成するためことを指す。したがって、組換え融合タンパク質とは、（セグメントが天然で通常はそのように結合していない）オリジナルORFによりコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のセグメントを含む単一タンパク質である。したがって、リーディングフレームは融合セグメント全体で連続しているが、セグメントは（例えば、インフレームリンカー配列により）物理的または空間的に分離されている場合がある。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドはインフレーム融合し得るが、「融合した」CDRが連続ポリペプチドの一部として同時翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域またはさらなるCDR領域をコードするポリヌクレオチドにより分離される。

10

【0120】

ポリペプチドの文脈において、「線形配列」または「配列」とは、配列中の互いに隣接する残基がポリペプチドの一次構造において連続しているポリペプチドのアミノ末端からカルボキシル末端へ方向のアミノ酸順である。

【0121】

本明細書で使用する「治療する」または「治療」という用語は、治療処置および予防的（prophylactic）もしくは予防的（preventative）測定の両方を指し、その目的は、望ましくない生理的变化または障害（炎症の発現または拡散など）を予防するかまたは緩慢化する（軽減する）ことである。利益または所望の臨床結果としては、検出可能か検出不能かを問わず、症状の軽減、疾患範囲の縮小、病態の安定化（すなわち、悪化させない）、疾患進行の遅延化または緩慢化、病態の改良もしくは緩和、および寛解（部分寛解か完全寛解かを問わず）が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」は、未治療の場合の予想生存と比較した延命も意味し得る。治療を必要としているものとしては、状態もしくは障害を既に呈しているもの、ならびに状態もしくは障害を呈する傾向があるもの、または状態もしくは障害を予防すべきものが挙げられる。

20

【0122】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳類」とは、診断、予後判断、または療法が望ましい任意の対象、特に哺乳類対象を意味する。哺乳類対象としては、ヒト、家畜、農場動物、および動物園の動物、スポーツ動物、または飼育動物（イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、雌牛など）が挙げられる。

30

【0123】

本明細書で使用する「結合分子の投与から恩恵を受けるであろう対象」および「治療を必要とする動物」などの語句は、例えば、結合分子により認識された抗原の検出のために（例えば、診断手段のために）使用した結合分子の投与および/またはLTに特異的に結合する結合分子による治療、すなわち、疾患（炎症疾患または癌など）の一時的緩和または予防から恩恵を受けるであろう対象（哺乳類対象など）を含む。本明細書に詳述のとおり、結合分子は非複合形態で使用することもでき、（例えば、薬剤、プロドラッグ、または同位体との）結合体であることもできる。

40

【0124】

本明細書で使用する「炎症を特徴とする障害」という用語は、対象において炎症反応を引き起こすまたは炎症反応を特徴とする障害を指す。炎症障害は急性であることも慢性であることもできる。例示的な炎症障害としては、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、潰瘍性大腸炎、移植、ループス、炎症肝疾患、乾癬、シェーグレン症候群、多発性硬化症（例えば、SPMS）、ウイルス誘発性肝炎、自己免疫性肝炎、1型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、およびウイルス性ショック症候群、ならびに移植を施行予定もしくは移植を施行済みの個体が挙げられる。

【0125】

50

II. 抗LT結合分子

新規の抗LT結合分子のパネルが開発された。本発明の抗LT結合分子は、先行技術の抗体と比較して改善された機能的特性を示す。別の実施形態では、本発明の抗LT結合分子は、先行技術の抗LT抗体と比較して独特な構造的特性を有する。

【0126】

1つの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の抗体A0D9、108、107、105、9B4、A1D5、102、もしくは101/103抗体（本明細書において、LT抗体（例えば、LT105）とも呼ばれる）；これらの抗体のCDR；これらの抗体の可変領域配列；これらの抗体の変異体型のCDR配列；これらの抗体の変異体型の可変領域配列；ならびにこれらのCDRおよび/もしくは可変領域を含む結合分子に関する。これらの結合分子をコードする核酸分子も提供する。ある実施形態では、本発明は、シグナル配列を欠く成熟形態の分子に関する。本発明の機能的および構造的特徴または主題の抗体および他の態様を以下に詳細に説明する。

10

【0127】

A. LT誘発性シグナル伝達の増大した阻害

LT誘発性シグナル伝達（LT Rへの結合時）は炎症反応を誘発し、正常なリンパ系組織の発現にも関与する。本発明の結合分子は、LT Rのリンホトキシンへの結合と競合し、それによってLT介入シグナル伝達を阻害し、細胞中のLT介入生体反応を低下させる。本発明の結合分子のブロック効果を示すために様々なアッセイを用いてよい。

20

【0128】

例えば、1つの実施形態では、本発明の結合分子の、LT（例えば、LTヘテロ三量体）のLT Rへの結合阻害能を測定できる。1つの実施形態では、生理的、単量体LT受容体（LT R）を使用できる。1つの好ましい実施形態では、二量体形態のLT受容体、例えば、LT R - Ig融合タンパク質（当技術分野に記載されているようなFc融合タンパク質）を、当技術分野で知られているかまたは本明細書に記載されている方法を用いて、ブロック試験に使用できる。例えば、ビオチン標識したLT Rは、表面上でLT 1 2を発現するホルボールエステル（PMA）で処理したII - 23細胞上でリンホトキシニンに結合する。ホルボールエステルで処理した細胞を、ビオチン標識したLT R - Igと競合する結合分子とインキュベーションし、細胞を洗浄して結合していないLT R - Igを除き、結合したLT R - Igをストレプトアビジン - PEで検出する。したがって、ビオチンタグ化LT R - Ig融合タンパク質の表面LTへの結合をブロックする結合分子の能力（適切な対照、例えば、結合分子の欠損と比較して）を、例えば、FACS分析を用いて測定できる。

30

【0129】

別の実施形態では、LT R発現細胞（例えば、A375細胞）によるサイトカイン（例えば、IL - 8）産生を阻害する結合分子の能力を測定する。このアッセイでは、LT R発現細胞をLT 1 2と接触させ、結合分子および結合分子のIL - 8放出を細胞により阻害する能力（適切な対照、例えば、結合分子の欠損と比較して）を、例えば、ELISAアッセイを用いて測定する。

40

【0130】

1つの実施形態では、本発明の結合分子によるLT R - Ig結合の阻害および/または1つ以上のLT生体活性、例えば、サイトカイン（IL - 8など）産生の70%超の阻害を達成する。1つの実施形態では、本発明の結合分子によるLT R - Ig結合の阻害および/または1つ以上のLT生体活性の阻害は80%超に達する。1つの実施形態では、本発明の結合分子によるLT R - Ig結合の阻害および/または1つ以上のLT生体活性の阻害は90%超に達する。1つの実施形態では、本発明の結合分子によるLT R - Ig結合の阻害および/または1つ以上のLT生体活性の阻害は95%超に達する。1つの実施形態では、本発明の結合分子によるLT R - Ig結合の阻害および/または1つ以上のLT生体活性の阻害は完全（すなわち、100%）である。

50

【0131】

1つの実施形態では、本発明は、リンホトキシン 1 2 に結合し、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1 により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2 のもと A T C C に寄託またはその抗原結合領域を含む分子)が細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を約 5 0 % 阻害する条件において)細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を少なくとも約 7 0 % 阻害する単離結合分子に関する。別の実施形態では、本発明の単離結合分子は、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1 により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2 のもと A T C C に寄託またはその抗原結合領域を含む分子)が細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を約 5 0 % 阻害する条件において)細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を少なくとも約 8 0 % ブロックする。別の実施形態では、本発明の単離結合分子は、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1 により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2 のもと A T C C に寄託またはその抗原結合領域を含む分子)が細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を約 5 0 % 阻害する条件において)細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を少なくとも約 9 0 % ブロックする。別の実施形態では、本発明の単離結合分子は、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1 により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2 のもと A T C C に寄託またはその抗原結合領域を含む分子)が細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を約 5 0 % 阻害する条件において)細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を少なくとも約 9 5 % ブロックする。別の実施形態では、本発明の単離結合分子は、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1 により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2 のもと A T C C に寄託またはその抗原結合領域を含む分子)が細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を約 5 0 % 阻害する条件において)細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を少なくとも約 9 8 % ブロックする。別の実施形態では、本発明の単離結合分子は、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1 により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2 のもと A T C C に寄託またはその抗原結合領域を含む分子)が細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を約 5 0 % 阻害する条件において)細胞中 L T 1 2 誘発性生体活性を少なくとも約 1 0 0 % ブロックする。1つの実施形態では、生体活性は I L - 8 放出である。

【0132】

1つの実施形態では、本発明は、リンホトキシン に結合して細胞への L T R 結合 (または、上に説明するように、二量体 L T R - I g 結合)を少なくとも約 7 0 % 阻害する単離結合分子に関する。別の実施形態では、本発明は、リンホトキシン に結合して細胞への L T R (または L T R - I g) 結合を少なくとも約 8 0 % 阻害する単離結合分子に関する。別の実施形態では、本発明は、リンホトキシン に結合して細胞への L T R (または L T R - I g) 結合を少なくとも約 9 0 % 阻害する単離結合分子に関する。別の実施形態では、本発明は、リンホトキシン に結合して細胞への L T R (または L T R - I g) 結合を少なくとも約 9 5 % 阻害する単離結合分子に関する。別の実施形態では、本発明は、リンホトキシン に結合して細胞への L T R (または L T R - I g) 結合を少なくとも約 9 8 % 阻害する単離結合分子に関する。別の実施形態では、本発明の単離結合分子は、リンホトキシン に結合して細胞への L T R (または L T R - I g) 結合を少なくとも約 1 0 0 % 阻害する単離結合分子に関する。

【0133】

B . 増大した効能および / または親和性

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、先行技術の抗体より低い濃度で L T の L T R への結合および / または L T 誘発性生体活性を阻害する。これは、本発明の L T 結合部位を含む抗体の L T 誘発性生体活性 (例えば、I L - 8 放出)を 5 0 % 阻害する濃度 (I C 5 0)を先行技術の L T 結合部位を含む抗体と比較時に容易に確かめることができる。先行技術の抗体が L T の L T R への結合の 5 0 % 阻害に達するには3桁多い量の抗体が必要であり (図 1、4 および 5 参照)、一部は 5 0 % 阻害に全く達しない。これらの抗体の「理論上の I C 5 0 」を比較のために用いてよい。I C 5 0 値の計算では、(細胞と

緩衝液の添加後の最終抗体濃度ではなく) 抗原 (L T) との前インキュベーション工程中に存在する抗体濃度を使用した。

【 0 1 3 4 】

1つの実施形態では、本発明の結合分子の L T Rもしくは L T R - I g 結合の阻害 I C 5 0または1つ以上の L T 生体活性の阻害 I C 5 0は約 5 0 0 n M未満である。別の実施形態では、本発明の結合分子の L T Rもしくは L T R - I g 結合の阻害 I C 5 0または1つ以上の L T 生体活性の阻害 I C 5 0は約 1 0 0 n M未満である。別の実施形態では、本発明の結合分子の L T Rもしくは L T R - I g 結合の阻害 I C 5 0または1つ以上の L T 生体活性の阻害 I C 5 0は約 3 0 n M未満である。別の実施形態では、本発明の結合分子の L T Rもしくは L T R - I g 結合の阻害 I C 5 0または1つ以上の L T 生体活性の阻害 I C 5 0は約 1 0 n M未満である。別の実施形態では、本発明の結合分子の L T Rもしくは L T R - I g 結合の阻害 I C 5 0または1つ以上の L T 生体活性の阻害 I C 5 0は約 3 n M未満である

10

【 0 1 3 5 】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、これらの改善された特性を1つより多く有する、すなわち、 L T Rもしくは L T R - I g 結合の阻害または1つ以上の L T 生体活性の 7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、もしくは 9 8 %超の阻害を達成し、阻害 I C 5 0は約 5 0 0 n M、1 0 0 n M、3 0 n M、1 0 n M、もしくは 3 n M未満である。

【 0 1 3 6 】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、 L T 1 2に約 0 . 3 n M未満の E C 5 0で結合する。別の実施形態では、本発明の結合分子は、 L T 1 2に約 0 . 1 n M未満の E C 5 0で結合する。別の実施形態では、本発明の結合分子は、 L T 1 2に約 0 . 0 3 n M未満の E C 5 0で結合する。

20

【 0 1 3 7 】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の L T 生体活性 (例えば、 I L - 8 放出) を少なくとも 9 0 %、1 0 0 n M以下の I C 5 0で阻害する。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の L T 生体活性 (例えば、 I L - 8 放出) を少なくとも 9 0 %、3 0 n M以下の I C 5 0で阻害する。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の L T 生体活性 (例えば、 I L - 8 放出) を少なくとも 9 0 %、1 0 n M以下の I C 5 0で阻害する。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の L T 生体活性 (例えば、 I L - 8 放出) を少なくとも 9 0 %、3 n M以下の I C 5 0で阻害する。1つの実施形態では、主題の本発明の結合分子はまた、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2のもと A T C Cに寄託またはその抗原結合領域を含む分子) が細胞中 L T 1 2誘発性生体活性を約 5 0 %阻害する条件において) L T Rまたは L T R - I g 結合を少なくとも 7 0 %阻害する。1つの実施形態では、主題の本発明の結合分子はまた、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2のもと A T C Cに寄託またはその抗原結合領域を含む分子) が細胞中 L T 1 2誘発性生体活性を約 5 0 %阻害する条件において) L T Rまたは L T R - I g 結合を少なくとも 8 0 %阻害する。1つの実施形態では、主題の本発明の結合分子はまた、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2のもと A T C Cに寄託またはその抗原結合領域を含む分子) が細胞中 L T 1 2誘発性生体活性を約 5 0 %阻害する条件において) L T Rまたは L T R - I g 結合を少なくとも 9 0 %阻害する。1つの実施形態では、主題の本発明の結合分子はまた、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2のもと A T C Cに寄託またはその抗原結合領域を含む分子) が細胞中 L T 1 2誘発性生体活性を約 5 0 %阻害する条件において) L T Rまたは L T R - I g 結合を少なくとも 9 5 %阻害する。1つの実施形態では、主題の本発明の結合分子はまた、(例えば、参照抗体 B 9 (細胞系 B 9 . C 9 . 1により産生、寄託番号 H B 1 1 9 6 2のもと A T C Cに寄託またはその抗原結合領域を含む分子) が細胞中 L T 1 2誘発性生体活性を約 5 0 %阻害する条件において) L T Rまたは L T R - I g 結合を少な

30

40

50

くとも 100% 阻害する。

【0138】

C. LT の新規領域への結合

本発明の結合分子は LT 3 に結合せず（または、103 の場合）、LT 3 に結合する場合は LT 3 の TNFR への結合をブロックするようには結合しない。加えて、本発明の結合分子はすべて LT の LT R または LT R - Ig への結合をブロックする。1 つの実施形態では、本発明の抗 LT 結合分子は、LT の本発明の抗 LT 抗体への結合について競合する。したがって、ある実施形態では、本発明の組成物に使用される結合部分は、競合アッセイにおける参照抗体（例えば、本明細書に記載の A0D9、108、107、105、9B4、A1D5、102、または 101 / 103 抗体）と同じエピトープに結合し得る。例えば、結合部分は、本発明の抗 LT 抗体と交差ブロックする（すなわち、結合について競合する）あるいは抗体結合に干渉する抗体に由来し得る。

10

【0139】

結合分子が、リガンド（例えば LT）の LT R または LT R - Ig への結合をリガンド濃度に依存する形で阻害するかまたはブロックする（例えば立体的にブロックする）程度、エピトープに特異的または選択的に結合する場合、リガンドの結合を「競合的に阻害する」または「競合的にブロックする」と呼ぶ。例えば、生化学的に測定時、リガンドの結合が結合分子の標的分子（例えば、LT R）への結合に勝る場合、リガンド濃度を増大することにより所与の結合分子濃度における競合的阻害を克服できる。いずれの特定の理論にも縛られず、結合分子が結合するエピトープがリガンドの結合部位またはその近くに位置して、リガンドの結合を防止する場合、競合が生じると考えられる。競合的阻害は、当技術分野において周知の方法および / または実施例に記載の方法、例えば、競合 ELISA アッセイなどにより決定し得る。1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、A0D9、108、107、105、9B4、A1D5、102、または 101 / 103 からなる群から選択される抗 LT 抗体の LT への結合を少なくとも 90%、少なくとも 80%、または少なくとも 70% 競合的に阻害する（または LT の LT R への結合を低下させるかもしくは LT 介入シグナル伝達を下方制御する抗体の能力の 1 つと競合する）。

20

【0140】

1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、A0D9 抗体の LT への結合を競合的に阻害する。1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、108 抗体の LT への結合を競合的に阻害する。1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、107 抗体の LT への結合を競合的に阻害する。

30

【0141】

1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、105 または 9B4 抗体の LT への結合を競合的に阻害する。1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、A1D5 抗体の LT への結合を競合的に阻害する。1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、102 抗体の LT への結合を競合的に阻害する。1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、101 / 103 抗体の LT への結合を競合的に阻害する。

【0142】

競合的 LT エピトープに結合する他の抗体は、当技術分野で認識されている方法および特性を決定したそれらの可変領域を用いて特定し得る。かかる抗体を結合分子として用いてもよいし、それらの可変領域を結合部位として用いて本発明の結合分子に組み込んでもよい。例えば、かかる抗体の CDR を本発明の結合分子に組み込んでよい。例えば、シグナル配列のない完全長 LT に対する抗体またはシグナル配列のない完全長 LT の様々な断片に対する抗体がいったん産生されたら、LT のどのアミノ酸もしくはエピトープがどの抗体もしくは抗原結合断片に結合するかについては、当技術分野で知られているエピトープマッピングプロトコール（例えば "Chapter 11 - Immunology, " Current Protocols in Molecular Biology, Ed. Ausubel et al., v. 2, John Wiley & Sons, Inc. (1996) に記載の二抗体サンドイッチ ELISA）により

40

50

決定できる。さらなるエピトープマッピングプロトコールについては、Morris, G. Epitope Mapping Protocols, New Jersey: Humana Press (1996) (両方ともそれらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる)に見出し得る。エピトープマッピングは市販の手段(すなわちProtoprobe, Inc. (Milwaukee, Wisconsin))によっても実施できる。

【0143】

さらに別の実施形態では、本発明の結合分子は、その結合にとって重要であり得るLTのあるアミノ酸残基またはLTのあるアミノ酸に結合する結合部位を含んでよい。以下に開示するLT中のアミノ酸位置は、成熟形態のタンパク質中のアミノ酸位置を指す。成熟LTタンパク質の配列については、Genbank entries GI:292277 and 4505035 and Browning J. et al., Cell 72:847-856 (1993) (これらのすべてがそれらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

【0144】

1つの実施形態では、本発明は、LTエピトープに特異的に結合する単離結合分子であり、結合分子によるLTエピトープへの結合が102抗体により用量依存的、競合的にブロックされる単離結合分子に関する。別の実施形態では、LTのアミノ酸193位(R)および194位(R) (以下の配列番号:に説明される)が結合分子の結合にとって重要である。LTの配列を以下に示す。

```

1  M G A L G L E G R G   G R L Q G R G S L L   L A V A G A T S L V   T L
L L A V P I T V   L A V L A L V P Q D
5 1  Q G G L V T E T A D   P G A Q A Q Q G L G   F Q K L P E E E P E   T D
L S P G L P A A   H L I G A P L K G Q
1 0 1  G L G W E T T K E Q   A F L T S G T Q F S   D A E G L A L P Q D   G L
Y Y L Y C L V G   Y R G R A P P G G G
1 5 1  D P Q G R S V T L R   S S L Y R A G G A Y   G P G T P E L L L E   G A
E T V T P V L D   P A R R Q G Y G P L
2 0 1  W Y T S V G F G G L   V Q L R R G E R V Y   V N I S H P D M V D   F A
R G K T F F G A   V M V G

```

【0145】

1つの実施形態では、本発明は、LTエピトープに特異的に結合する単離結合分子でありかつ結合分子によるLTエピトープへの結合がA0D9抗体により用量依存的、競合的にブロックされる単離結合分子に関する。別の実施形態では、LTのアミノ酸151位(D)および153位(Q) (配列番号:に説明される)が結合分子の結合にとって重要である。

【0146】

1つの実施形態では、本発明は、LTエピトープに特異的に結合する単離結合分子でありかつ結合分子によるLTエピトープへの結合が101/103抗体により用量依存的、競合的にブロックされる単離結合分子に関する。

【0147】

1つの実施形態では、本発明は、LTエピトープに特異的に結合する単離結合分子でありかつ結合分子によるLTエピトープへの結合が105または9B4抗体により用量依存的、競合的にブロックされる単離結合分子に関する。1つの実施形態では、LTのアミノ酸96位(P)、97位(L)、98位(K)が結合分子の結合にとって重要である。

【0148】

1つの実施形態では、本発明は、LTエピトープに特異的に結合する単離結合分子でありかつ結合分子によるLTエピトープへの結合が105抗体により用量依存的、競合的にブロックされる単離結合分子に関する。1つの実施形態では、LTのアミノ酸96位(P)、97位(L)、98位(K)、106位(T)、107位(T)、および108位

(K) (配列番号 : に説明される) が結合分子の結合にとって重要である。

【 0 1 4 9 】

1 つの実施形態では、本発明は、 L T エピトープに特異的に結合する単離結合分子でありかつ結合分子による L T エピトープへの結合が A 1 D 5 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる単離結合分子に関する。 1 つの実施形態では、 L T のアミノ酸 1 7 2 位 (P) (配列番号 : に示される) が結合分子の結合にとって重要である。

【 0 1 5 0 】

1 つの実施形態では、本発明は、 L T エピトープに特異的に結合する単離結合分子でありかつ結合分子による L T エピトープへの結合が 1 0 7 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる単離結合分子に関する。 1 つの実施形態では、 L T のアミノ酸 1 5 1 位 (D) および 1 5 3 位 (Q) (配列番号 : に示される) が結合分子の結合にとって重要である。

10

【 0 1 5 1 】

1 つの実施形態では、本発明は、 L T エピトープに特異的に結合する単離結合分子でありかつ結合分子による L T エピトープへの結合が 1 0 8 抗体により用量依存的、競合的にブロックされる単離結合分子に関する。

【 0 1 5 2 】

D . 新規構造

さらに別の実施形態では、本発明の抗 L T 結合分子は、ある構造的特徴を共有する抗 L T 結合部位、例えば、本明細書に記載の抗 L T 結合部位と同じアミノ酸配列を含む。

20

【 0 1 5 3 】

特許請求の範囲の機能的活性を有する抗体パネルの C D R 配列を下表 1 および 2 に示す。

【 0 1 5 4 】

1 つの実施形態では、本発明は、重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含むリンホトキシン (L T) 結合分子に関し、ここで軽鎖および重鎖 C D R は、A 0 D 9、1 0 8、1 0 7、A 1 D 5、1 0 2、1 0 1 / 1 0 3、9 B 4、および 1 0 5 からなる群から選択される抗体由来である。

【 0 1 5 5 】

30

1 つの実施形態では、本発明は、重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含む L T 結合分子に関し、ここで C D R は A 0 D 9 抗体由来である。

【 0 1 5 6 】

1 つの実施形態では、本発明は、重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含む L T 結合分子に関し、ここで C D R は 1 0 8 抗体由来である。

【 0 1 5 7 】

1 つの実施形態では、本発明は、重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含む L T 結合分子に関し、ここで C D R は 1 0 7 抗体由来である。

40

【 0 1 5 8 】

1 つの実施形態では、本発明は、重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3 を含む軽鎖可変領域を含む L T 結合分子に関し、ここで C D R は A 1 D 5 抗体由来である。

【 0 1 5 9 】

1 つの実施形態では、本発明は、重鎖 C D R の C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖 C D R の C D R L 1、C D R L 2、および C D R L 3

50

を含む軽鎖可変領域を含むL T結合分子に関し、ここでCDRは102抗体由来である。

【0160】

1つの実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むL T結合分子に関し、ここでCDRは101/103抗体由来である。

【0161】

1つの実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むL T結合分子に関し、ここでCDRは105抗体由来である。

10

【0162】

1つの実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むL T結合分子に関し、ここでCDRは9B4抗体由来である。

【0163】

本実施例によって単離した抗体のCDRクラスの分析により、コンセンサスCDRアミノ酸配列の発現が促進された。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、本明細書に記載の1つ以上のコンセンサスCDR配列を含む(例えば、表1および2を参照されたい)。例えば、実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むL T結合分子に関し、ここでCDRH1は配列GFSLX₁X₂Y/SGX₃H/GX₄X₅を含み、Xは任意のアミノ酸である。別の実施形態では、X₁はSもしくはTからなる群から選択され；X₂はT、D、もしくはNからなる群から選択される。別の実施形態では、X₃はV、MもしくはIからなる群から選択され、X₄は欠損しているかもしくはVであり、ならびにX₅は欠損しているかもしくはSである。1つの実施形態では、CDRH1のアミノ酸配列の7/10または7/12はコンセンサス配列におけるものと同一である。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、A0D9抗体、108抗体、9B4抗体、もしくは107抗体、またはそれらの組み合わせ由来である。

20

【0164】

別の実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むL T結合分子に関し、ここでCDRH1は配列GX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀を含み、ここでX₁はYもしくはFからなる群から選択され；X₂はS、T、もしくはVからなる群から選択され；X₃はFもしくはIからなる群から選択され；X₄はTもしくはSからなる群から選択され；X₅はG、D、もしくはSからなる群から選択され；X₆はY、S、もしくはGからなる群から選択され；X₇はF、Y、もしくはWからなる群から選択され；X₈はMもしくはYからなる群から選択され；X₉はN、YもしくはWからなる群から選択され；ならびにX₁₀は欠損もしくはNからなる群から選択される。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、A1D5、A105、102または101/103抗体由来である。

30

40

【0165】

別の実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むL T結合分子に関し、ここでCDRH2は配列VIWX₁GGX₂TX₃X₄NAX₅FX₆Sを含む。1つの実施形態では、Xは任意のアミノ酸である。別の実施形態では、X₁はRもしくはSからなる群から選択され；X₂はNもしくはSからなる群から選択され；X₃はNもしくはDからなる群から選択され；X₄はYもしくはHからなる群から選択され；X₅はAもしくはVからなる群から選択され；ならびにX₆はM、T、もしくはIからなる群から選択される。1つの実施形態では、結合分子の残

50

りの5つのCDRは、A0D9抗体、108抗体、もしくは107抗体由来である。

【0166】

別の実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むLT結合分子に関し、ここでCDRH2は配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} Y X_{11} X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16}$ を含み、ここで X_1 はR、T、G、もしくは欠損からなる群から選択され； X_2 はI、H、もしくはYからなる群から選択され； X_3 はN、G、Y、もしくはIからなる群から選択され； X_4 は、P、D、Y、もしくはSからなる群から選択され； X_5 はY、W、もしくはGからなる群から選択され； X_6 はN、T、もしくはDからなる群から選択され； X_7 はG、DもしくはSからなる群から選択され； X_8 はD、Y、もしくはSからなる群から選択され； X_9 はS、T、K、もしくはNからなる群から選択され； X_{10} はF、H、D、R、もしくはNからなる群から選択され； X_{11} はN、P、もしくはTからなる群から選択され； X_{12} はQ、D、G、もしくはPからなる群から選択され； X_{13} はKもしくはSからなる群から選択され； X_{14} はF、V、もしくはLからなる群から選択され； X_{15} はKもしくはQからなる群から選択され；ならびに X_{16} はD、G、もしくはNからなる群から選択される。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、A1D5、102、9B4、105もしくは101/103抗体またはそれらの組み合わせ由来である。

10

【0167】

1つの実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む重鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むLT結合分子に関し、ここでCDRH3は配列G/AYYG/Aを含む。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、A0D9、107、108、9B4抗体またはそれらの組み合わせ由来である。

20

【0168】

1つの実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むLT結合分子に関し、ここでCDRL1は、 $X_1 A S Q D X_2 X_3 X_4 X_5 L X_6$ 配列を含み、Xは任意のアミノ酸である。1つの実施形態では、 X_1 はKもしくはRからなる群から選択され； X_2 はIもしくはMからなる群から選択され； X_3 はNもしくはSからなる群から選択され； X_4 はTもしくはNからなる群から選択され； X_5 はYもしくはFからなる群から選択され； X_6 はN、T、もしくはRからなる群から選択される。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、A0D9抗体、108抗体、107抗体、A1D5抗体、または101/103抗体由来である。

30

【0169】

1つの実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むLT結合分子に関し、ここでCDRL1は、 $R A S X_1 S V X_2 X_3 X_4 X_5$ 配列を含み、Xは任意のアミノ酸である。1つの実施形態では、 X_1 はEまたはSからなる群から選択され； X_2 はDまたはSからなる群から選択され； X_3 はNまたはYからなる群から選択され； X_4 はYまたはMからなる群から選択され； X_5 はGまたはIからなる群から選択される。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、105抗体もしくは9B4抗体またはそれらの組み合わせ由来である。

40

【0170】

1つの実施形態では、本発明は、重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むLT結合分子に関し、ここでCDRL2は配列 $R A X_1 R L X_2 D$ を含み、Xは任意のアミノ酸である。1つの実施形態では、 X_1 はNまたはDからなる群から選択され； X_2 はVまたはLからなる群から選択される。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、A0D9抗体、108抗体、107抗体、もしくは101/10

50

3 抗体、またはそれらの組み合わせ由来である。

【0171】

別の実施形態では、CDRL2は配列 $X_1 X_2 S X_3 X_4 X_5 S$ を含み、ここで X_1 はY、R、A、またはKからなる群から選択され； X_2 はT、A、またはVからなる群から選択され； X_3 はK、S、またはNからなる群から選択され； X_4 はLまたはRからなる群から選択され； X_5 はH、E、A、またはFからなる群から選択される。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、A1D5抗体、102抗体、105抗体、105A抗体、105B抗体、105C抗体、または9B4抗体由来である。

【0172】

別の実施形態では、本発明は重鎖CDRのCDRH1、CDRH2およびCDRH3を含む軽鎖可変領域ならびに軽鎖CDRのCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖可変領域を含むLT結合分子を対象とし、ここでCDRL3は配列 $X_1 Q X_2 X_3 X_4 X_5 P X_6 T$ を含み、ここで X_1 はQもしくはFからなる群から選択され； X_2 はY、V、G、W、もしくはSからなる群から選択され； X_3 はD、S、もしくはNからなる群から選択され； X_4 はD、H、Y、もしくはKであり； X_5 はF、N、もしくはDからなる群から選択され；ならびに X_6 はW、L、もしくはYである。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、108、107、A1D5、102、9B4、もしくは105抗体またはそれらの組み合わせ由来である。

【0173】

別の実施形態では、CDRL3は配列 $L X_1 X_2 D X_3 F P X_4 T$ を含み、ここで X_1 はHまたはQからなる群から選択され； X_2 はHまたはYからなる群から選択され； X_3 はAまたはKからなる群から選択され； X_4 はWまたはPからなる群から選択される。1つの実施形態では、残りの5つのCDRは、A0D9もしくは101/103抗体またはそれらの組み合わせ由来である。

【0174】

別の実施形態では、本発明は、任意の1つのVH-CDRにおける1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸置換を除き、VH-CDR1、VH-CDR2およびVH-CDR3領域は、本明細書に記載の抗体のVH-CDR1、VH-CDR2およびVH-CDR3配列と同じポリペプチド配列を有する免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる単離ポリペプチドを提供する(例えば、カバットCDRまたはコチアCDR(例示的な置換部位を表1に示す))。より大きなCDR(例えば、VH-CDR-3)では、VH-CDRを含むVHがLTに特異的にまたは選択的に結合する限り、CDRをさらに置換してよい。ある実施形態では、アミノ酸置換は保守的である。

【0175】

別の実施形態では、本発明は、任意の1つのVL-CDRにおける1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸置換を除き、VL-CDR1、VL-CDR2およびVL-CDR3領域が本明細書に記載の抗体のVL-CDR1、VL-CDR2およびVL-CDR3配列と同じポリペプチド配列を有する免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる単離ポリペプチドを提供する(例えば、カバットCDRまたはコチアCDR(例示的な置換部位を表2に示す))。ある実施形態では、アミノ酸置換は保守的である。

【0176】

1つの実施形態では、特性(例えば結合特性または物理化学特性、例えば、可溶性)が改善された結合分子を得るように結合分子のCDRを変化させることができる。例えば、1つの実施形態では、自己結合に影響を与えて分子の溶解度を改善するように重鎖または軽鎖の1つ以上のCDRを変化させてよい。1つの実施形態では、かかる変化は表1および2に説明するモチーフにより提供された置換アミノ酸とアミノ酸の置換に至る。1つの実施形態では、少なくとも1つの変異を、(例えば、105抗体中)CDRL2に対して行う。別の実施形態では、2つの変異を、(例えば、105抗体中)CDRL2に対して

10

20

30

40

50

行う。

【0177】

例えば、1つの実施形態では、CDRL2のカバット54位のRがKに変異した105抗体の軽鎖の1つの型(A型)、CDRL2のカバット57位のNがSに変異した第2の型(B型)、ならびにCDRL2に両変異を有する第3の型(カバット54位のKおよびカバット57位のSを含む;C型)を作製し得る。本実施例に示すように、CDRL2のこれらの修飾型を含む抗体は、改善された溶解度を示した。

【0178】

本発明の結合分子のLT結合分子は、抗原認識部位、完全可変領域、または本発明の1つ以上の開始もしくは親抗LT抗体由来である1つ以上のCDRを含んでよい。

10

【0179】

1つの実施形態では、A0D9、108、9B4、および107重鎖CDR間の相同性を考慮すると、様々な組み合わせを行うことができる。例えば、1つの実施形態では、A0D9重鎖CDRH1は、108、9B4、または107のCDRH1と置換して、これらの任意の抗体可変領域由来のCDRH2およびCDRH3と組み合わせる。

【0180】

別の実施形態では、A0D9、108、9B4、101/103、および107軽鎖CDR間の相同性を考慮すると、様々な組み合わせを行うことができる。例えば、1つの実施形態では、A0D9軽鎖CDRL11は、108、9B4、101/103、または107のCDRL1と置換して、これらの任意の抗体可変領域由来のCDRL2およびCDRL3と組み合わせる。

20

【0181】

別の実施形態では、本発明の第一抗LT抗体の重鎖は本発明の第二抗LT抗体の軽鎖と組み合わせることができる。例えば、A0D9、108、および107重鎖CDR間の相同性を考慮すると、A0D9重鎖を108または107軽鎖と組み合わせる抗LT結合部位を生成してよい。別の実施形態では、108重鎖は、A0D9または107軽鎖と組み合わせる抗LT結合部位を生成してよい。さらに別の実施形態では、108重鎖は、A0D9または107軽鎖と組み合わせる抗LT結合部位を生成してよい。

【0182】

さらに別の実施形態では、様々な型の抗LT抗体軽鎖と重鎖を組み合わせることができる。例えば、1つの実施形態では、本明細書に記載の様々な型の105抗体の軽鎖と重鎖を組み合わせることができる。本明細書において示すように、これらの型の多くが開始105抗体と比較して改善された溶解度を示す。105軽鎖と重鎖の例示的な組み合わせとしては、H1/L0(重鎖第1型および軽鎖第0型);H1/L A型;H1/L B型;H1/L10;H1/L12;H1/L13;H11/L10;H11/L12;H11/L13;H14/L10;およびH14/L12が挙げられる。

30

【0183】

本発明は、主題の結合分子をコードするポリヌクレオチド配列にも関する。

【0184】

ある実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸分子は、DNAまたはRNA分子である。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、1つ以上のコーディング領域に作動可能に連結しているプロモーターならびに/または他の転写もしくは翻訳制御要素を含み得る。作動可能な連結において、遺伝子生産物(例えば、ポリペプチド)のコーディング領域は、調節配列(1つまたは複数)の影響または制御下にて遺伝子生産物の発現を置くような方法で1つ以上の調節配列と結合している。

40

【0185】

抗LT結合部位をコードする核酸分子は、1つ以上の定常領域部分をコードするヌクレオチド配列、または抗体由来の場合もあり抗体由来ではない場合もある他の所望のヌクレオチド配列に作動可能に連結し得る。DNA断片(ポリペプチドコーディング領域およびそこに結合したプロモーターなど)は、プロモーター機能の導入が所望の遺伝子生産物を

50

コードする mRNA の転写に至る場合、ならびに 2 つの DNA 断片間の結合の性質が発現調節配列の遺伝子生産物発現に対する能力に干渉しないかもしくは DNA 鋳型を転写する能力と干渉しない場合、「作動可能に連結」している。したがって、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写をもたらすことができる場合、ポリペプチドをコードする核酸と作動可能に連結していることとなる。プロモーターは、事前に決定した細胞内のみ DNA の実質的な転写に対する細胞特異的なプロモーターであり得る。プロモーターを除く他の転写制御要素（例えばエンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終止シグナル）はポリヌクレオチドに作動可能に連結でき、細胞特異的な転写を指示する。適切なプロモーターおよび他の転写制御領域を本明細書に開示する。

【0186】

様々な転写制御領域が当業者に知られている。これらには、サイトメガロウイルス（イントロン A とあわせた最初期プロモーター）、シミアンウイルス 40（初期プロモーター）、およびレトロウイルス（ラウス肉腫ウイルスなど）由来のプロモーターおよびエンハンサーセグメントなどが挙げられるが、これらに限定されない脊椎動物細胞中で機能する転写制御領域が挙げられるが、これらに限定されない。他の転写制御領域としては、脊椎動物遺伝子由来のもの（アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ増殖ホルモンおよびウサギ グロビンなど）、ならびに真核細胞中の遺伝子発現を制御できる他の配列が挙げられる。さらなる適切な転写制御領域としては、組織特異的なプロモーターおよびエンハンサーならびにリンフォカイン誘発性プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンにより誘発可能なプロモーター）が挙げられる。

【0187】

同様に、様々な翻訳制御要素が当業者に知られている。これらには、リボソーム結合部位、翻訳開始および終止コドン、ならびにピコルナウイルス由来の因子（特に配列内リボソーム進入部位、つまり I R E S。C I T E 配列とも呼ばれる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0188】

他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、RNA 分子、例えば、伝令 RNA（mRNA）形態である。

【0189】

本発明のポリヌクレオチドおよび核酸コーディング領域は、分泌、またはシグナルペプチドをコードするさらなるコーディング領域を伴い得、これは本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの分泌を指示する。シグナル仮説によると、哺乳類細胞により分泌されたタンパク質は、粗面小胞体にわたる増殖タンパク鎖の輸送がいったん開始後、成熟タンパク質から切断されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。脊椎動物細胞により分泌されたポリペプチドは、一般に、ポリペプチドの N 末端に融合したシグナルペプチドを有すること、完全または「完全長」ポリペプチドから切断されて分泌または「成熟」形態のポリペプチドを産生することを、当業者は認識している。ある実施形態では、天然シグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖または軽鎖シグナルペプチド、またはそこに作動可能に連結しているポリペプチドの分泌に対する能力を保持するその配列の機能的誘導体を用いる。あるいは、異種の哺乳類シグナルペプチド、またはその機能的誘導体を用いてよい。例えば、野生型リーダー配列はヒト組織プラスミノーゲン活性化因子（TPA）またはマウス グルクロニダーゼのリーダー配列で置換し得る。1 つの実施形態では、本発明の結合分子は、シグナルペプチドを欠く成熟形態の分子である。

【0190】

また、本明細書の他の個所に詳述のとおり、本発明は、上記ポリヌクレオチドを 1 つ以上含む組成物も含む。

【0191】

I I I . 結合分子の例示的な形態

A . 抗 L T 抗体

10

20

30

40

50

ある実施形態では、本発明のLT結合分子は抗体である。本出願に開示のデータを考慮すると、既に生成されている抗体に勝るLT結合抗体を作製できることが明らかである。1つの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されたものに機能的に関連する抗体に関する。1つの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されたものに構造的に関連する抗体に関する。別の実施形態では、本発明は、本明細書に開示されたものに構造的かつ機能的に関連する抗体に関する。本発明の抗体は、当技術分野で知られている抗体の合成方法により、特に、化学合成により、または好ましくは、本明細書に記載の組換え発現技術により産生できる。例えば、抗体産生細胞系は、当業者に周知の技術を用いて選択および培養してよい。かかる技術は、様々な実験室マニュアルおよび主要刊行物に記載されている。この点に関して、下記の本発明における使用に適した技術は、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) (補足を含み、これらは、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる)に記載されている。

10

20

30

40

50

【0192】

本発明のさらに他の実施形態では、例えば、内因性免疫グロブリン産生ができないトランスジェニック動物(例えば、マウス)におけるヒトまたは実質的にヒト抗体の生成を含む(例えば、米国特許第6,075,181号、同第5,939,598号、同第5,591,669号および同第5,589,369号(それぞれは、参照することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい)。例えば、キメラおよび生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖結合領域の同種接合体欠失により、内因性抗体産生が完全に阻害されることが記載されている。かかる生殖系列変異マウスにヒト免疫グロブリン遺伝子配置を移すことにより、抗原投与時にヒト抗体が産生される。SCIDマウスを用いた別の好ましいヒト抗体生成手段については、米国特許第5,811,524号(参照することにより本明細書に組み込まれる)に開示されている。これらのヒト抗体と結合した遺伝子物質も本明細書に記載のように単離かつ操作し得ることが理解されるであろう。

【0193】

別の実施形態では、顕微操作および単離した可変遺伝子によりリンパ球を選択できる。例えば、末梢血液単核細胞を、免疫化哺乳類から単離して約7日間インビトロ培養することができる。培養物は、スクリーニング基準を満たす特異的なIgGについてスクリーニングできる。陽性ウェルの細胞を単離できる。個々のIg産生細胞をFACSにより、または補体媒介性溶血プラークアッセイにおいてそれらを特定することにより単離できる。Ig産生細胞は、管中に顕微操作でき、VHおよびVL遺伝子は、例えば、RT-PCRを用いて増幅できる。VHおよびVL遺伝子は抗体発現ベクターにクローン化して、発現のため細胞(例えば、真核生物または原核生物細胞)中にトランスフェクトすることができる。

【0194】

ある実施形態では、LT抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体の可変領域と定常領域は両方とも完全にヒトである。完全ヒト抗体は、当技術分野で知られており本明細書に記載している技術を用いて作製できる。例えば、特異的な抗原に対する完全ヒト抗体は、抗原投与への反応においてかかる抗体を産生するように修飾されているが、内因性遺伝子座は無効化されているトランスジェニック動物に抗原を投与することにより調製できる。かかる抗体を作製するために使用できる例示的な技術は、米国特許第6,150,584号;同第6,458,592号;同第6,420,140号に記載されている。他の技術は、当技術分野で知られている。完全ヒト抗体は、様々なディスプレイ技術、例えば、本明細書の他の個所に詳述のとおり、ファージディスプレイ系または他のウイルスディスプレイ系により同様に産生できる。

【0195】

目的のエピトープに対するポリクローナル抗体は、当技術分野において周知の様々な手

段を用いて産生できる。例えば、目的のエピトープを含む抗原を様々な宿主動物（ウサギ、マウス、ラット、鶏、ハムスター、ヤギ、ロバなどが挙げられるが、これらに限定されない）に投与して抗原に特異的なポリクローナル抗体を含む血清産生を誘発することができる。免疫反応を増大するために、宿主種に応じて、様々なアジュバント（フロイント（完全フロイントおよび不完全フロイント）、鉍物ゲル（水酸化アルミニウムなど）、表面活性物質（リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルション、スカシガイヘモシアニン、ジニトロフェノールなど）、および潜在的に有用なヒトアジュバント（BCG（ウシ型弱毒結核菌ワクチン）など）およびコリネバクテリウムパルヴムが挙げられるが、これらに限定されない）を用いてよい。かかるアジュバントはまた、当技術分野において周知でもある。

10

【0196】

モノクローナルLT抗体は、当技術分野で知られている多種多様の技術を用いて（ハイブリドーマ、組換え体、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む）調製できる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で知られているもので、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981)（前記参考文献は、それらの全体を参照することにより組み込まれる）に教示されているものを含むハイブリドーマ技術を用いて産生できる。本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を介して産生された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、単クローン由来の抗体（任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む）を指し、産生されたものによる方法ではない。したがって、「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を介して産生された抗体に限定されない。モノクローナル抗体はLTノックアウトマウスを用いて、エピトープ認識領域を拡大するために調製できる。モノクローナル抗体は当技術分野で知られている多種多様の技術を用いて（本明細書の他の個所に記載のハイブリドーマおよび組換えおよびファージディスプレイ技術の使用を含む）調製できる。

20

【0197】

当技術分野で認識されているプロトコールを使用した1例では、抗体は哺乳類において、関連抗原（例えば、精製されたLT₁ 2またはLT₁ 2発現細胞またはLT₁ 2を含む細胞抽出物）およびアジュバントの複数回の皮下または腹腔内注射により産生される。この免疫化により、典型的には、活性化脾細胞またはリンパ球からの抗原反応抗体の産生を含む免疫反応が誘発される。生成抗体を動物の血清から回収してポリクローナル調製物を得ることができるが、脾臓由来の個々のリンパ球、リンパ節または末梢血液を単離してモノクローナル抗体（MAb）の同種調製物を得ることが望まれることが多い。好ましくは、リンパ球は脾臓由来である。この周知のプロセス（Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975)）では、抗原と注射されている、哺乳類由来の比較的短命または致死のリンパ球を不死の腫瘍細胞系（例えば骨髓腫細胞系）と融合し、それによって、不死で細胞の遺伝的にコードされた抗体を産生できるハイブリッド細胞すなわち「ハイブリドーマ」を産生する。生成ハイブリッドは、単一抗体形成のための特異的な遺伝子を含むそれぞれの個々の菌株の選択、希釈、および再増殖により単一の遺伝性質に分離する。それらは所望の抗原に対して同種の抗体を産生し、それらの純粋な遺伝子的家系に関して「モノクローナル」と呼ぶ。

30

40

【0198】

そのように調製したハイブリドーマ細胞を、好ましくは非融合、親骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適切な培養培地中で播種し増殖する。ハイブリドーマの形成、選択および増殖用の試薬、細胞系および培地は、いくつかの供給源から市販されており、標準プロトコールが十分に確立されていることを、当業者は理解するであ

50

ろう。一般に、ハイブリドーマ細胞が増殖する培養培地は、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の産生のためにアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生したモノクローナル抗体の結合特異性を、インビトロアッセイ（免疫沈殿、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）など）により決定する。所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を特定後、クローンを限界希釈手段によりサブクローン化し標準的な方法により増殖し得る（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp 59-103 (1986)）。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、従来の精製手段（例えば、タンパク質A、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーなど）により、培養培地、腹水または血清から分離し得ることがさらに理解されるであろう。

【0199】

抗体または抗体断片（例えば、抗原結合部位）をコードするDNAは抗体ライブラリー（ファージディスプレイライブラリーなど）由来であってもよいことを当業者は理解するであろう。特に、かかるファージは、レポトリまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現する抗原結合ドメインをディスプレイするために使用できる。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原により（例えば、標識抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕獲させた抗原を用いて）選択することもすることもできる。これらの方法に用いるファージは、典型的には、Fab、Fv、OE、DAB（軽鎖または重鎖由来の個々のFv領域）、つまりファージ遺伝子IIIタンパク質か遺伝子VIIタンパク質のいずれかに組換え融合させたジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを持つファージから発現させたfdおよびM13結合ドメインを含む、線維状ファージである。例示的な方法については、例えば、欧州特許第368 684 B1号；米国特許第5,969,108号、Hoogenboom, H.R. and Chames, Immunol. Today 21:371 (2000)；Nagy et al. Nat. Med. 8:801 (2002)；Huie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2682 (2001)；Lui et al., J. Mol. Biol. 315:1063 (2002)（それぞれは、参照することにより本明細書に組み込まれる）に説明されている。いくつかの刊行物（例えば、Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)）に、鎖混合による高親和性ヒト抗体の産生、ならびに大量ファージライブラリーを構築するための戦略としてコンビナトリアル感染およびインビボ組換えについて記載されている。別の実施形態では、リボソームディスプレイを用いて、ディスプレイプラットフォームとしてバクテリオファージを置換できる（例えば、Hanes et al., Nat. Biotechnol. 18:1287 (2000)；Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750 (2001)；またはIrving et al., J. Immunol. Methods 248:31 (2001)を参照されたい）。さらに別の実施形態では、細胞表面ライブラリーにおいて抗体をスクリーニングできる（Boder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10701 (2000)；Daugherty et al., J. Immunol. Methods 243:211 (2000)）。さらに別の例示的な実施形態では、高親和性ヒトFabライブラリーを、選択された相補性決定領域（CDRH1およびCDRH2など）に合成多様性を有するヒトドナー由来の免疫グロブリン配列を結合させることにより設計する（例えば、Ho et al., Nature Biotechnol., 23:344-348 (2005)（参照することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。かかる手段は、モノクローナル抗体の単離およびその後のクローニングのための従来のハイブリドーマ技術の代替物を提供する。

10

20

30

40

50

【0200】

ファージディスプレイ方法では、機能的抗体ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子表面上に機能的抗体ドメインをディスプレイする。例えば、VH領域およびVL領域をコードするDNA配列を増幅するか、あるいは動物cDNAライブラリー（例えば、リンパ系組織のヒトまたはマウスcDNAライブラリー）または合成cDNAライブラリーから単離する。ある実施形態では、VH領域およびVL領域をコードするDNAをPCRによりscFvリンカーで互いに結合させ、ファージミドベクターにクローン化する（例えば、pCANTAB6またはpComb3HSS）。ベクターを大腸菌（E.coli）中に電気穿孔し、この大腸菌（E.coli）をヘルパーファージに感染させる。これらの方法に使用されるファージは、典型的には、線維状ファージ（fdおよびM13を含む）であり、VH領域またはVL領域は、通常、ファージ遺伝子IIIか遺伝子VIIのいずれかに組換え融合している。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージ（すなわち、LTポリペプチドまたはその断片）を、抗原で（例えば、標識抗原または固体表面もしくはビーズに結合したもしくは捕獲された抗原を用いて）選択することも特定することもできる。

10

【0201】

抗体作製に使用できるファージディスプレイ方法のさらなる例としては、Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187:9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT特許/英国特許第91/01134号; PCT公開WO90/02809号; WO91/10737号; WO92/01047号; WO92/18619号; WO93/11236号; WO95/15982号; WO95/20401号; および米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; 同第5,733,743号および同第5,969,108号（それぞれ、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる）に開示のものが挙げられる。

20

30

【0202】

上記参考文献に記載のとおり、ファージの選択後、ファージ由来の抗体コーディング領域を単離して、完全抗体（ヒト抗体を含む）または任意の他の所望の抗原結合断片を生成するために使用し、任意の所望の宿主（哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母菌、および細菌を含む）内で発現させることができる。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂断片の組換え産生技術は、PCT公開WO92/22324号; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); および Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); および Better et al., Science 240:1041-1043 (1988)（前記参考文献は、それらの全体を参照することにより組み込まれる）に開示のものなどの当技術分野で知られている方法を用いて使用することもできる。

40

【0203】

単鎖Fvおよび抗体を産生するために使用できる技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); および Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)に記載のものが挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボ使用およびインビトロ検出

50

アッセイを含む一部の使用において、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を使用することが好ましい場合がある。

【0204】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置のために特に望まれる。ヒト抗体は、当技術分野で知られている様々な方法（ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを用いた上記ファージディスプレイ方法を含む）により作製できる。米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号；ならびにPCT公開WO98/46645号、同WO98/50433号、同WO98/24893号、同WO98/16654号、同WO96/34096号、同WO96/33735号、および同WO91/10741号（それぞれ、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる）も参照されたい。

10

【0205】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンを発現できないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現できるトランスジェニックマウスを用いて産生することもできる。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子と軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体を、無作為にまたは相同的組換えにより、マウス胚幹細胞に導入してよい。あるいは、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域を、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えてマウス胚幹細胞に導入してよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同的組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別にまたは同時に非機能性を付与され得る。特に、JH領域の同種接合体欠失は、内因性抗体産生を防止する。修飾胚幹細胞を拡大し、胚盤胞中に微量注入してキメラマウスを産生する。次いで、キメラマウスを交配させてヒト抗体を発現する同種接合体の産仔を産生する。トランスジェニックマウスは、選択された抗原、例えば、所望の標的ポリペプチドのすべてまたは一部を用いて通常の方法で免疫化する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて免疫化されたトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスに宿ったヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、細胞の分化中に再配列してから、クラススイッチおよび体細胞変異を遂げる。このように、かかる技術を用いて、治療的に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するための当該技術の概要については、Lonberg and Huszar Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するための当該技術およびかかる抗体を産生するためのプロトコールの詳細な議論については、例えば、PCT公開WO98/24893号；WO96/34096号；WO96/33735号；米国特許第5,413,923号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,569,825号；同第5,661,016号；同第5,545,806号；同第5,814,318号；および同第5,939,598号（これらは、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.)およびGenPharm (San Jose, Calif.)などの企業が、上記のものと類似した技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに取り組み得る。

20

30

40

【0206】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイド選択」と呼ばれる技術を用いて生成できる。この方法では、選択された非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）を用いて、同一のエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択をガイドする。（Jespers et al., Bio/Technology 12:899-903 (1988)。米国特許第5,565,332号も参照されたい）。

【0207】

「親和性成熟」抗体とは、そのCDRの1つ以上に改変を1つ以上有し、その結果、それらの改変（1つまたは複数）を有さない親抗体と比較して抗体の抗原親和性が改善された抗体である。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル親和性、またはピ

50

コモル親和性さえも有するであろう。親和性成熟抗体は、当技術分野で知られている手段により産生される。Marks et al Bio/Technology 10:779-783 (1992) には、VHドメインとVLドメインの混合による親和性成熟について記載されている。CDRおよび/またはフレームワーク残基の無作為変異誘発については、Barbas et al, Proc Natl. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al, J. Immunol. 154.7):3310-9 (1995); および Hawkins et al, J. Mol Biol. 226:889-896 (1992) によって記載されている。 10

【0208】

B. 単鎖結合分子

他の実施形態では、本発明の結合分子は、単鎖結合分子であってよい(例えば、単鎖可変領域またはscFv)。単鎖抗体産生のために記載された技術(米国特許第4,694,778号; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); および Ward et al., Nature 334:544-554 (1989))を改変して単鎖結合分子を産生することができる。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖と軽鎖断片とをアミノ酸結合を介して結合することにより形成され、単鎖抗体を生成する。E coli中の機能的Fv断片の組立技術も用いてよい(Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988))。 20

【0209】

ある実施形態では、本発明の結合分子は、scFv分子(例えば、scFvリンカーにより結合した本発明の抗LT抗体由来のVHドメインおよびVLドメイン)であるか、またはかかる分子を含む。scFv分子は従来のscFv分子または安定化scFv分子であってよい。改善された安定性(例えば、改善された熱安定性)をscFvまたはscFvを含む結合分子に付与する安定した変異、ジスルフィド結合、または至適化されたリンカーを含む安定化scFvについては、米国特許第11/725,970号(その全体を参照することにより本明細書に組み込まれる)に詳述されている。 30

【0210】

他の実施形態では、本発明の結合分子は、scFv分子を含むポリペプチドである。ある実施形態では、多特異的な結合分子は、scFv分子(例えば、安定化scFv分子)を上記抗LT抗体、または1つの抗LT抗体の結合部位を含む単一特異的な結合分子と結合させることにより作製してよく、ここでscFv分子および親結合分子は同じ結合特異性を有する。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、scFv分子が融合されている天然抗LT抗体である。

【0211】

安定化scFv分子の熱安定性は改善されている(例えば、融解温度(Tm)値が54超(例えば55、56、57、58、59、60またはそれ以上)またはT50値が39超(例えば40、41、42、43、44、45、46、47、48、50、51、52、53、54、55、56、57、58、または59)である。本発明のscFv分子またはそれらを含む融合タンパク質の安定性は、従来の(安定していない)scFv分子または従来のscFv分子を含む結合分子の生物物理学的特性(例えば、熱安定性)を参照して評価できる。1つの実施形態では、本発明の結合分子の熱安定性は対照の結合分子(例えば、従来のscFv分子)より約0.1、約0.25、約0.5、約0.75、約1、約1.25、約1.5、約1.75、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、または約10高い。 40 50

【0212】

1つの実施形態では、s c F v リンカーは、アミノ酸配列 (G l y₄ S e r)₄ からなるかまたは (G l y₄ S e r)₄ 配列を含む。他の例示的なリンカーは、(G l y₄ S e r)₃ および (G l y₄ S e r)₅ 配列を含むか、またはそれからなる。本発明の s c F v リンカーの長さは様々であることができる。1つの実施形態では、本発明の s c F v リンカーは、約5～約50個のアミノ酸の長さである。別の実施形態では、本発明の s c F v リンカーは、約10～約40個のアミノ酸の長さである。別の実施形態では、本発明の s c F v リンカーは、約15～約30個のアミノ酸の長さである。別の実施形態では、本発明の s c F v リンカーは、約17～約28個のアミノ酸の長さである。別の実施形態では、本発明の s c F v リンカーは、約19～約26個のアミノ酸の長さである。別の実施形態では、本発明の s c F v リンカーは、約21～約24個のアミノ酸の長さである。

10

【0213】

ある実施形態では、本発明の安定化 s c F v 分子は、V L ドメイン中のアミノ酸と V H ドメイン中のアミノ酸を結合するジスルフィド結合を少なくとも1つ含む。システイン残基が、ジスルフィド結合を提供するために必要である。本発明の s c F v 分子には、例えば、V L の F R 4 と V H の F R 2 を連結するか、または V L の F R 2 と V H の F R 4 を連結するためにジスルフィド結合を含むことができる。ジスルフィド結合の例示的な位置としては、V H の 4 3 位、4 4 位、4 5 位、4 6 位、4 7 位、1 0 3 位、1 0 4 位、1 0 5 位、および 1 0 6 位ならびに V L の 4 2 位、4 3 位、4 4 位、4 5 位、4 6 位、9 8 位、9 9 位、1 0 0 位、および 1 0 1 位 (カバット番号付け) が挙げられる。システイン残基に変異しているアミノ酸位置の例示的な組み合わせとしては、V H 4 4 - V L 1 0 0、V H 1 0 5 - V L 4 3、V H 1 0 5 - V L 4 2、V H 4 4 - V L 1 0 1、V H 1 0 6 - V L 4 3、V H 1 0 4 - V L 4 3、V H 4 4 - V L 9 9、V H 4 5 - V L 9 8、V H 4 6 - V L 9 8、V H 1 0 3 - V L 4 3、V H 1 0 3 - V L 4 4、および V H 1 0 3 - V L 4 5 が挙げられる。1つの実施形態では、ジスルフィド結合は V_H アミノ酸 4 4 位と V_L アミノ酸 1 0 0 位を結合する。

20

【0214】

1つの実施形態では、本発明の安定化 s c F v 分子は、V_H ドメインと V_L ドメイン間に割り込んだアミノ酸配列 (G l y₄ S e r)₄ を有する s c F v リンカーを含み、ここで V_H ドメインと V_L ドメインは、V_H 中のアミノ酸 4 4 位と V_L 中のアミノ酸 1 0 0 位間のジスルフィド結合により結合されている。

30

【0215】

他の実施形態では、本発明の安定化 s c F v 分子は、1つ以上 (例えば2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上) の安定した変異を s c F v の可変ドメイン (V H または V L) 内に含む。1つの実施形態では、安定した変異は、以下からなる群から選択される：a) V L のカバット 3 位のアミノ酸 (例えば、グルタミン) の、例えば、アラニン、セリン、バリン、アスパラギン酸、もしくはグリシンとの置換；(b) V L のカバット 4 6 位のアミノ酸 (例えば、セリン) の、例えば、ロイシンとの置換；(c) V L のカバット 4 9 位のアミノ酸 (例えば、セリン) の、例えば、チロシンもしくはセリンとの置換；(d) V L のカバット 5 0 位のアミノ酸 (例えば、セリンもしくはバリン) の、例えば、セリン、トレオニン、およびアルギニン、アスパラギン酸、グリシン、もしくはリシンとの置換；(e) V L のカバット 4 9 位のアミノ酸 (例えば、セリン) およびカバット 5 0 位のアミノ酸 (例えば、セリン) の、それぞれ、チロシンおよびセリンとの置換；チロシンおよびトレオニンとの置換；チロシンおよびアルギニンとの置換；チロシンおよびグリシンとの置換；セリンおよびアルギニンとの置換；またはセリンおよびリシンとの置換；(f) V L のカバット 7 5 位のアミノ酸 (例えば、バリン) の、例えば、イソロイシンとの置換；(g) V L のカバット 8 0 位のアミノ酸 (例えば、プロリン) の、例えば、セリンもしくはグリシンとの置換；(h) V L のカバット 8 3 位のアミノ酸 (例えば、フェニルアラニン) の、例えば、セリン、アラニン、グリシン、もしくはトレオニンとの置換；(i) V H のカバット 6 位のアミノ酸 (例えば、グルタミン酸) の、例えば、グルタミンとの置

40

50

換；(j) V_Hのカバット13位のアミノ酸（例えば、リシン）の、例えば、グルタメートとの置換；(k) V_Hのカバット16位のアミノ酸（例えば、セリン）の、例えば、グルタメートもしくはグルタミンとの置換；(l) V_Hのカバット20位のアミノ酸（例えば、バリン）の、例えば、イソロイシンとの置換；(m) V_Hのカバット32位のアミノ酸（例えば、アスパラギン）の、例えば、セリンとの置換；(n) V_Hのカバット43位のアミノ酸（例えば、グルタミン）の、例えば、リシンもしくはアルギニンとの置換；(o) V_Hのカバット48位のアミノ酸（例えば、メチオニン）の、例えば、イソロイシンもしくはグリシンとの置換；(p) V_Hのカバット49位のアミノ酸（例えば、セリン）の、例えば、グリシンもしくはアラニンとの置換；(q) V_Hのカバット55位のアミノ酸（例えば、バリン）の、例えば、グリシンとの置換；(r) V_Hのカバット67位のアミノ酸（例えば、バリン）の、例えば、イソロイシンもしくはロイシンの置換；(s) V_Hのカバット72位のアミノ酸（例えば、グルタミン酸）の、例えば、アスパルテートもしくはアスパラギンとの置換；(t) V_Hのカバット79位のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン）の、例えば、セリン、バリン、もしくはチロシンの置換；ならびに(u) V_Hのカバット101位のアミノ酸（例えば、プロリン）の、例えば、アスパラギン酸との置換。

10

【0216】

C. 単ドメイン結合分子

ある実施形態では、結合分子は、ナノボディとしても知られている単ドメイン結合分子（例えば単ドメイン抗体）であるか、それを含む。例示的な単ドメイン分子としては、抗体の単離した重鎖可変ドメイン（V_H）、すなわち、軽鎖可変ドメインのない重鎖可変ドメイン、および抗体の単離した軽鎖可変ドメイン（V_L）、すなわち、重鎖可変ドメインのない軽鎖可変ドメインが挙げられる。本発明の結合分子に使用される例示的な単ドメイン抗体としては、例えば、Hamers - Casterman, et al., Nature 363: 446 - 448 (1993)、およびDumoulin, et al., Protein Science 11: 500 - 515 (2002)に記載のラクダ科重鎖可変ドメイン（約118～136個のアミノ酸残基）が挙げられる。単ドメイン抗体の多量体も本発明の範囲内である。他の単ドメイン抗体としては、サメ抗体（例えば、サメIg - NAR）が挙げられる。サメIg - NARは、1つの可変ドメイン（V - NAR）のホモ二量体および5つのC様定常ドメイン（C - NAR）を含み、残基5～23個の長さで変化する伸長したCDR3領域に多様性が集中している。ラクダ科種（例えば、ラマ）において、重鎖可変領域（V_HHと呼ばれる）は完全抗原結合ドメインを形成する。ラクダ科V_HH可変領域と従来の抗体（V_H）由来のものとの主な相違点としては、(a) V_Hの軽鎖接触表面中における、V_HHの対応領域と比較してより疎水性のアミノ酸、(b) V_HHにおけるより長いCDR3、および(c) V_HHのCDR1とCDR3間のジスルフィド結合の生じる頻度、が挙げられる。単ドメイン結合分子の作製方法については、米国特許第6,005,079号および同第6,765,087号（両方とも、参照することにより本明細書に組み込まれる）に記載されている。

20

30

【0217】

D. 小体

ある実施形態では、本発明の結合分子は小体であるか、または小体を含む。小体は当技術分野に記載の方法を用いて作製できる（例えば、米国特許第5,837,821号またはWO94/09817A1号を参照されたい）。ある実施形態では、小体は、天然もしくは非天然（例えば、変異した）重鎖可変ドメインもしくは軽鎖可変ドメイン、またはそれらの組み合わせの相補性決定領域（CDR）を2つのみ含む結合分子である。かかる小体の例は、Pessier et al., Nature 362: 367 - 369 (1993)によって記載されている。別の例示的な小体は、CH3ドメインまたは完全なFc領域に結合または融合しているscFv分子を含む。小体の多量体も、本発明の範囲内である。

40

50

【0218】

E．結合分子断片

特に記載のない限り、本明細書で使用する、結合分子に関する「断片」とは、抗原結合断片、すなわち、抗原に特異的に結合する結合部分を指す。1つの実施形態では、本発明の結合分子は抗体断片であるか、またはかかる断片を含む。特異的なエピトープを認識する抗体断片は既知の技術により生成してよい。例えば、F a bおよびF (a b ')₂断片は組換え産生してもよいし、免疫グロブリン分子のタンパク質切断により(F a b断片を産生するための)パパインや(F (a b ')₂断片を産生するための)ペプシンなどの酵素を用いて産生してもよい。F (a b ')₂断片は、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のC H 1ドメインを含む。

10

【0219】

F．多価小体

1つの実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、第一結合部位のある少なくとも1つのs c F v断片および第二結合部位のある少なくとも1つのs c F vを有する多価小体である。2つのs c F v分子の結合部位は同じでも異なってもよい。好ましい実施形態では、少なくとも1つのs c F v分子は安定している。例示的な二重特異性の二価小体構築物は、N末端でCペプチドに融合しているC H 3ドメインを含み、CペプチドはN末端でV Hドメインに融合し、V HドメインはN末端で(G l y 4 S e r)_n可動性リンカーに融合し、(G l y 4 S e r)_n可動性リンカーはN末端でV Lドメインに融合している。ある実施形態では、多価小体は二価であっても、三価(例えば、三量体)であっても、二重特異性(例えば、二重特異性抗体)であっても、または四価(例えば、四量体)であってもよい。

20

【0220】

別の実施形態では、本発明の結合分子は、異なる結合特異性を有する第一および第二s c F v断片を含むs c F v四価小体の各重鎖部分を有するs c F v四価小体である。好ましい実施形態では、少なくとも1つのs c F v分子は安定している。前記第二s c F v断片は、第一s c F v断片のN末端に結合してよい(例えば二重特異性のN_Hs c F v四価小体または二重特異性のN_Ls c F v四価小体)。あるいは、第二s c F v断片は、前記第一s c F v断片を含む前記重鎖部分のC末端に結合してもよい(例えば二重特異性のC-s c F v四価小体)。二重特異性の四価小体の第一重鎖部分の第一s c F v断片と第二s c F v断片が同じ標的L T分子に結合する場合、二重特異性の四価小体の第二重鎖部分の第一s c F v断片と第二s c F v断片の少なくとも1つは同じL T標的分子に結合してもよいし、異なるL T標的分子に結合してもよい。

30

【0221】

G．多特異的な抗体

本発明の多特異的な結合分子は、少なくとも2つの結合部位を含んでよく、このうち少なくとも1つの結合部位は、上記1つの単一特異的な結合分子由来の結合部位に由来するかまたはそれを含む。ある実施形態では、本発明の多特異的な結合分子の少なくとも1つの結合部位は、抗体の抗原結合領域またはその抗原結合断片(例えば上記の抗体または抗原結合断片)である。

40

【0222】

ある実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、二重特異性である。二重特異性の結合分子は二価であり得、より高い結合価(例えば、三価、四価、五価など)でもあり得る。二重特異性の二価抗体、およびそれらの作製方法については、例えば米国特許第5,731,168号;同第5,807,706号;同第5,821,333号;ならびに米国特許公開第2003/020734号および第2002/0155537号(これらの開示はすべて、参照することにより本明細書に組み込まれる)に記載されている。二重特異性の四価抗体およびそれらの作製方法については、例えば、WO02/096948号およびWO00/44788号(両開示は、参照することにより本明細書に組み込まれる)に記載されている。概して、P C T公開WO93/17715号;WO92/0880

50

2号; WO 91/00360号; WO 92/05793号; Tuttle et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991); 米国特許第4,474,893号; 同第4,714,681号; 同第4,925,648号; 同第5,573,920号; 同第5,601,819号; Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)を参照されたい。

【0223】

H. s c F v含有の多特異的な結合分子

1つの実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、s c F v分子(例えば上記のs c F v分子)を少なくとも1つ含む多特異的な結合分子である。他の実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、2つのs c F v分子(例えば二重特異性のs c F v (Bis-s c F v))を含む。ある実施形態では、s c F v分子は従来のs c F v分子である。他の実施形態では、s c F v分子は上記の安定化s c F v分子である。ある実施形態では、多特異的な結合分子は、上記の抗L T抗体または1つの抗L T抗体の結合部位を含む単一特異的な結合分子にs c F v分子(例えば、安定化s c F v分子)を結合させることにより作製することができ、ここでs c F v分子とL Tの異なる領域に結合する親結合分子は異なる重要なL T接触残基を有する。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、s c F v分子が融合している天然抗L T抗体である。1つの実施形態では、かかるs c F v分子は安定している。

10

【0224】

安定化s c F vが親結合分子に結合している場合、安定化s c F v分子の結合は好ましくは結合分子の熱安定性を少なくとも約2 または3 改善する。1つの実施形態では、本発明のs c F v含有の結合分子の熱安定性は、従来の結合分子と比較して1 改善されている。別の実施形態では、本発明の結合分子の熱安定性は、従来の結合分子と比較して2 改善されている。別の実施形態では、本発明の結合分子の熱安定性は、従来の結合分子と比較して4、5、6 改善されている。

20

【0225】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は安定化「抗体」または「免疫グロブリン」分子、例えば、天然抗体または免疫グロブリン分子(またはその抗原結合断片)または抗体分子に類似した形で抗原に結合し本発明のs c F v分子を含む遺伝子組換え抗体分子である。本明細書で使用する「免疫グロブリン」という用語は、任意の関連する特異的な免疫再活性を所有するかどうかを問わず、2本の重鎖と2本の軽鎖の組み合わせを有するポリペプチドを含む。

30

【0226】

1つの実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、抗体重鎖のC末端に結合した少なくとも1つのs c F v(例えば2つ、3つ、または4つのs c F v、例えば、安定化s c F v)を含み、s c F vと抗体は異なる結合特異性を有する。別の実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、抗体重鎖のN末端に結合した少なくとも1つのs c F v(例えば2つ、3つ、または4つのs c F v、例えば、安定化s c F v)を含み、s c F vと抗体は異なる結合特異性を有する。別の実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、抗体軽鎖のN末端に結合した少なくとも1つのs c F v(例えば、2つ、3つ、もしくは4つのs c F vまたは安定化s c F v)を含み、s c F vと抗体は異なる結合特異性を有する。別の実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、抗体重鎖もしくは軽鎖のN末端に結合した少なくとも1つのs c F v(例えば、2つ、3つ、または4つのs c F vまたは安定化s c F v)、重鎖のC末端に結合した少なくとも1つのs c F v(例えば、2つ、3つ、もしくは4つのs c F vまたは安定化s c F v)を含み、s c F vは異なる結合特異性を有する。

40

【0227】

I. 多特異的な二重特異性抗体

他の実施形態では、本発明の結合分子は、多特異的な二重特異性抗体である。1つの実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、二重特異性の二重特異性抗体であり、二重

50

特異性抗体の各腕は直列 s c F v 断片を含む。好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの s c F v 断片は安定している。1 つの実施形態では、二重特異性の二重特異性抗体は、第一結合特異性を有する第一の腕および第二結合特異性を有する第二の腕を含んでよい。別の実施形態では、二重特異性抗体の各腕は、第一結合特異性を有する第一 s c F v 断片および第二結合特異性を有する第二 s c F v 断片を含んでよい。ある実施形態では、多特異的な二重特異性抗体は完全な F c 領域または F c 部分（例えば C H 3 ドメイン）に直接融合できる。

【0228】

J．多特異的な結合分子断片

ある実施形態では、本発明の結合分子断片を多特異的に作製し得る。本発明の多特異的な結合分子は、二重特異性の F a b 2 または多特異的な（例えば三重特異的な）F a b 3 分子を含む。例えば、多特異的な結合分子断片は、異なる特異性を有する F a b または s c F v 分子の化学的に複合した多量体（例えば二量体、三量体、または四量体）を含んでよい。

【0229】

K．s c F v 2 四価抗体

他の実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、各重鎖部分が s c F v 分子を含む s c F v 2 四価抗体である。好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの s c F v 分子は安定している。s c F v 断片は、重鎖部分の可変領域の N 末端（例えば N_H s c F v 2 四価抗体または N_L s c F v 2 四価抗体）に結合し得る。あるいは、s c F v 断片は、s c F v 2 四価抗体の重鎖部分の C 末端に結合し得る。s c F v 2 四価抗体の各重鎖部分は可変領域、ならびに同じもしくは異なる標的 L T 分子もしくはエピトープに結合する s c F v 断片を有し得る。多特異的な分子の場合、s c F v 断片および s c F c 2 四価抗体の第一重鎖部分の可変領域は同じ標的分子またはエピトープと結合し、二重特異性の四価小体の第二重鎖部分の第一および第二 s c F v 断片の少なくとも 1 つは異なる標的分子またはエピトープと結合する。

【0230】

L．直列可変ドメイン結合分子

他の実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、直列抗原結合部位を含む結合分子を含んでよい。例えば、可変ドメインは、直接融合しているかまたは連続して結合している可変重ドメイン（V H ドメイン）を少なくとも 2 つ（例えば、2 つ、3 つ、4 つ、またはそれ以上）含むように遺伝子操作された抗体重鎖、ならびに直接融合しているかまたは連続して結合している可変軽ドメイン（V L ドメイン）を少なくとも 2 つ（例えば、2 つ、3 つ、4 つ、またはそれ以上）含むように遺伝子操作された抗体軽鎖を含んでよい。V H ドメインは対応する V L ドメインと相互作用して一連の抗原結合部位を形成し、ここで少なくとも 2 つの結合部位は L T の同じ、または異なるエピトープに結合する。直列可変ドメイン結合分子は、2 つ以上の重鎖または軽鎖を含んでよく、結合価がより高い（例えば、二価または四価）。直列可変ドメイン結合分子の作製方法は、当技術分野で知られており、例えば W O 2 0 0 7 / 0 2 4 7 1 5 号を参照されたい。

【0231】

M．多特異的な融合タンパク質

別の実施形態では、本発明の多特異的な結合分子は、多特異的な融合タンパク質である。本明細書で使用する「多特異的な融合タンパク質」という語句は、上記の結合特異性を少なくとも 2 つ有する（本明細書の上記に定義した）融合タンパク質を示す。多特異的な融合タンパク質は集合でき、例えば、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体またはヘテロ四量体、本質的に W O 8 9 / 0 2 9 2 2 号（1989 年 4 月 6 日公開）、欧州特許第 3 1 4 , 3 1 7 号（1989 年 5 月 3 日公開）、および米国特許第 5 , 1 1 6 , 9 6 4 号（1992 年 5 月 2 日発行）に開示されている。好ましい多特異的な融合タンパク質は、二重特異性である。ある実施形態では、多特異的な融合タンパク質の結合特異性の少なくとも 1 つが s c F v、例えば、安定化 s c F v を含む。

10

20

30

40

50

【0232】

他の様々な多価抗体構築物が、例えばPCT国際特許第PCT/US86/02269号；欧州特許第184,187号；欧州特許第171,496号；欧州特許第173,494号；PCT国際公開特許第WO86/01533号；米国特許第4,816,567号；欧州特許第125,023号；Better et al. (1988) Science 240:1041-1043；Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526；Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005；Wood et al. (1985) Nature 314:446-449；Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559；Morrison (1985) Science 229:1202-1207；Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214；米国特許第5,225,539号；Jones et al. (1986) Nature 321:552-525；Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534；Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060；およびWinter and Milstein, Nature, 349, pp. 293-99 (1991))に記載の通例の組換えDNA技術を用いて当業者により開発され得る。好ましくは、非ヒト抗体は、非ヒト抗原結合ドメインをヒト定常ドメインと結合させることにより「ヒト化」されている（例えばCabilly et al.、米国特許第4,816,567号；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, pp. 6851-55 (1984)）。

【0233】

多価抗体構築物を調製するために用いてよい他の方法については、以下の刊行物に記載されている：Ghetie, Maria-Ana et al. (2001) Blood 97:1392-1398；Wolff, Edith A. et al. (1993) Cancer Research 53:2560-2565；Ghetie, Maria-Ana et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:7509-7514；Kim, J.C. et al. (2002) Int. J. Cancer 97(4):542-547；Todorovska, Aneta et al. (2001) Journal of Immunological Methods 248:47-66；Coloma M.J. et al. (1997) Nature Biotechnology 15:159-163；Zuo, Zhuang et al. (2000) Protein Engineering (Suppl.) 13(5):361-367；Santos A.D., et al. (1999) Clinical Cancer Research 5:3118s-3123s；Presta, Leonard G. (2002) Current Pharmaceutical Biotechnology 3:237-256；van Spruiel, Annemiek et al., (2000) Review Immunology Today 21(8) 391-397

【0234】

IV. 修飾結合分子

ある実施形態では、本発明の結合分子の少なくとも1つは、修飾を1つ以上含んでよい。修飾形態の本発明のLT結合分子は、当技術分野で知られている技術を用いて完全な前駆体または親抗体から作製できる。

【0235】

ある実施形態では、本発明の修飾LT結合分子は、天然ポリペプチド上に見られない特徴を示すように改変（例えば、機能（例えば、エフェクター機能）を低下または向上させるように修飾）されているポリペプチドである。1つの実施形態では、結合分子の1つ以上の残基は官能性側鎖の反応により化学的に誘導体化し得る。1つの実施形態では、結合分子は、20種類の標準的なアミノ酸の1つ以上の天然アミノ酸誘導体を含むように修飾してよい。例えば、4-ヒドロキシプロリンはプロリンと置換してよい；5-ヒドロキシリシンはリシンと置換してよい；3-メチルヒスチジンはヒスチジンと置換してよい；ホモセリンはセリンと置換してよい；およびオルニチンはリシンと置換してよい。

【0236】

1つの実施形態では、本発明のLT結合分子は、1つ以上のドメインが部分的にまたは完全に欠失している（「ドメイン欠失結合分子」）合成定常領域を含む。ある実施形態では、適合する修飾結合分子は、完全CH2ドメインが除かれているドメイン欠失構築物または変異体（CH2構築物）を含む。他の実施形態では、可変領域に柔軟性および移動の自由を付与するために短いCペプチドを欠失ドメインと置換してよい。かかる構築物は異化率の抗体上のCH2ドメインの調節特性のために特に好ましいことを、当業者は理解するであろう。ドメイン欠失構築物は、IgG₁ヒト定常ドメインをコードするベクターを用いて得ることができる（例えば、WO 02/060955 A2号およびWO 02/096948 A2号を参照されたい）。このベクターは、CH2ドメインを欠失して、IgG₁定常領域を欠くドメインを発現する合成ベクターを提供するために遺伝子操作される。

10

20

【0237】

1つの実施形態では、本発明のLT結合分子は、単量体サブユニット間の結合が可能な限り数個またはわずか1個のアミノ酸の欠失または置換を有する免疫グロブリン重鎖を含む。例えば、ある状況では、Fc結合を実質的に低下させるためには、CH2ドメインの選択された領域における1個のアミノ酸変異で十分である場合がある。同様に、調整すべきエフェクター機能（例えば補体結合）を制御する1つ以上の定常領域ドメインの一部を単に欠失させることが望まれる場合がある。定常領域のかかる部分的な欠失により、対象の定常領域ドメインインタクトに関連する他の望まれる機能を残しつつ、抗体の選択された特徴（血清半減期）が改善される場合がある。さらに、上記に暗示されるように、結合分子の定常領域は、生成構築物のプロファイルを高める1つ以上のアミノ酸の変異または置換を介して改変される場合がある。この点において、修飾結合分子の立体配置および免疫原性プロファイルを実質的に維持しつつ、保守的結合部位により提供される活性（例えばFc結合）を中断することが可能である場合がある。さらに他の実施形態では、定常領域にアミノ酸を1つ以上付加して、望まれる特性（エフェクター機能など）を高めるか、または細胞毒もしくは炭水化物結合をより多く提供することを含む。かかる実施形態では、選択された定常領域ドメイン由来の特異的な配列を挿入または複製することが所望され得る。

30

【0238】

本発明は、本明細書に記載の結合部分（例えば、抗体分子のVH領域および/またはVL領域）の変異体（誘導体を含む）を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる結合分子も提供し、この結合部分はLTポリペプチドに免疫特異的に結合する。LT結合分子をコードするヌクレオチド配列中に変異を誘発するために使用できる、当業者に知られている標準的な技術としては、部位指向変異誘発およびアミノ酸置換に至るPCR介入変異誘発が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、変異体（誘導体を含む）は、参照VH領域のVH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL領域のVL-CDR1、VL-CDR2、またはVL-CDR3と比較して50個未満のアミノ酸置換、40個未満のアミノ酸置換、30個未満のアミノ酸置換、25個未満のアミノ酸置換、20個未満のアミノ酸置換、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置換をコードする。「保守的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基を

40

50

類似した電荷の側鎖を有するアミノ酸残基で置換したものである。類似の電荷の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、

分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。あるいは、（飽和変異誘発などにより）すべてまたは一部のコード配列に沿って変異を無作為に誘発することができ、誘発した変異の生体活性をスクリーニングして、活性（例えば、LTポリペプチドと結合する能力）を保持する変異を特定することができる。

【0239】

例えば、本発明の結合分子（例えば、抗体分子）のフレームワーク領域のみまたはCDR領域のみに変異を誘発することが可能である。誘発された変異はサイレントであってもよいし、中和ミスセンス変異であってもよい。すなわち、抗原に結合する能力に対する効果がないかほとんどなくてもよく、実際かかる変異の一部はいかなるアミノ酸配列も変化させない。これらの種類の変異は、コドン使用を至適化するために、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。あるいは、非中和ミスセンス変異は抗原に結合する結合分子の能力を変化させ得る。例えば、最も多くのサイレントおよび中和ミスセンス変異の抗体位置は、フレームワーク領域にある可能性が高く、最も多くの非中和ミスセンス変異の位置は、CDRにある可能性が高い（ただし、これは絶対的な必要条件ではない）。当業者は、抗原結合活性の改変または結合活性の改変を起こさないように所望の特性を有する被験変異分子（例えば、抗原結合活性における改善または抗体特異性における変化）を設計することが可能であろう。変異誘発後、コードタンパク質は定期的に発現し得、コードタンパク質の機能的および/もしくは生体活性（例えば、少なくとも1つのLTポリペプチドのエピトープに免疫特異的に結合する能力）は、本明細書に記載の技術を用いて、または当技術分野で知られている技術を定期的に修正することにより決定できる。

【0240】

A．共有結合

本発明のLT結合分子は、例えば、分子の結合分子への共有結合（結合分子が同族エピトープへ特異的に結合することを妨げない形の共有結合）により修飾してよい。例えば、これらに限定されないが、本発明の結合分子は、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンドもしくは他のタンパク質への結合など（含むか除くかのいずれか）により修飾してよい。多数の化学的修飾のいずれも既知の技術（特異的な化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などが挙げられるが、これらに限定されない）により実施してよい。さらに、誘導体は、従来と異なるアミノ酸を1つ以上含んでよい。

【0241】

本明細書の他の個所において詳細に論じているように、本発明の結合分子は、N末端またはC末端で異種のポリペプチドにさらに組換え融合してもよいし、ポリペプチドまたは他の組成物に化学的に複合してもよい（共有結合および非共有結合接合を含む）。例えば、LT特異的な結合分子は、検出アッセイにおける標識として有用な分子およびエフェクター分子（異種のポリペプチド、薬剤、放射性核種、または毒素など）に組換え融合してもよいし、複合してもよい。例えば、PCT公開WO 92/08495号；WO 91/14438号；WO 89/12624号；米国特許第5,314,995号；および欧州特許第396,387号を参照されたい。

【0242】

本発明のLT結合分子は、ペプチド結合または修飾ペプチド、すなわち、ペプチドイソスター結合によって互いに結合しているアミノ酸から構成されることができ、20種類の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでよい。LT特異的な結合分子は、翻訳後プロセッシングなどの自然なプロセスにより修飾してもよいし、当技術分野において周知である化学的修飾技術により修飾してもよい。かかる修飾は基本的な教科書およびより詳細なモノグラフ、ならびに膨大な研究文献に詳述されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端もしくはカルボキシル末端または部分（炭水化物など）を含むLT特異的な結合分子内のどこでも起こることができる。同一種類の修飾は、所与のLT特異的な結合分子内のいくつかの部位において同程度存在してもよいし、異なる程度存在してもよいことが理解されるであろう。また、所与のLT特異的な結合分子は、多種類の修飾を含んでよい。LT特異的な結合分子は例えば、ユビキチン化の結果として分枝していてもよいし、分岐を伴うまたは伴わない環状でもよい。環状、分枝、および分枝環状LT特異的な結合分子は、翻訳後の自然なプロセスによるものでもよいし、合成方法によって作製してもよい。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有架橋形成、システイン形成、ピログルタメート形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、転移RNA介入のアミノ酸のタンパク質への付加（アルギニン化、およびユビキチン化など）が挙げられる（例えば、Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth Enzymol 182: 626-646 (1990); Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663: 48-62 (1992)を参照されたい）。

【0243】

本発明は、LT結合分子、および異種のポリペプチドを含む融合タンパク質も提供する。抗体が融合した異種のポリペプチドは、標的のLTポリペプチド発現細胞に所望の機能性も提供し得、有用でもあり得る。1つの実施形態では、本発明の融合タンパク質は、本発明の結合分子の任意の1つ以上の結合部位のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび異種のポリペプチド配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。別の実施形態では、本明細書に開示された診断および治療方法における使用のための融合タンパク質は、LT特異的な結合分子の任意の1つ、2つ、もしくは3つのVH-CDRのアミノ酸配列またはLT特異的な結合分子の任意の1つ、2つ、もしくは3つのVL-CDRのアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに異種のポリペプチド配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。1つの実施形態では、融合タンパク質は、本発明のLT特異的な結合分子のVH-CDR3のアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに異種のポリペプチド配列を含み、この融合タンパク質は少なくとも1つのLTエピトープと特異的に結合する。別の実施形態では、融合タンパク質は、本発明のLT特異的な結合分子の少なくとも1つのVH領域のアミノ酸配列および本発明のLT特異的な結合分子の少なくとも1つのVL領域のアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに異種のポリペプチド配列を含む。1つの実施形態では、融合タンパク質のVH領域およびVL領域は、少なくとも1つのLTエピトープに特異的に結合する単一の結合分子源に相当する。さらに別の実施形態では、本明細書に開示された診断および治療方法における使用のための融合タンパク質はLT特異的な結合分子の任意の1つ、2つ、もしくは3つまたは

それ以上のVH CDRのアミノ酸配列とLT特異的な結合分子の任意の1つ、2つ、もしくは3つまたはそれ以上のVL CDRのアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに異種のポリペプチド配列を含む。1つの実施形態では、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つのVH-CDR(1つまたは複数)またはVL-CDR(1つまたは複数)は本発明の単一の結合分子源に相当する。これらの融合タンパク質をコードする核酸分子も本発明に包含する。

【0244】

文献中で報告された例示的な融合タンパク質は、T細胞受容体(Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 (1987)); CD4(Capon et al., Nature 337:525-531 (1989); Traunecker et al., Nature 339:68-70 (1989); Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9:347-353 (1990); およびByrn et al., Nature 344:667-670 (1990); L-セレクトイン(ホーミング受容体)(Watson et al., J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990); およびWatson et al., Nature 349:164-167 (1991)); CD44(Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990)); CD28およびB7(Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)); CTLA-4(Lisley et al., J. Exp. Med. 174:561-569 (1991)); CD22(Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991)); TNF受容体(Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991); およびPeppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991)); およびIgE受容体(Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, Abstract No. 1448 (1991))の融合を含む。

【0245】

本明細書の他の個所において論じているように、本発明のLT抗体、またはその抗原結合断片、変異体、もしくは誘導体は、ポリペプチドのインビボ半減期を延ばすためまたは当技術分野で知られている方法を用いた免疫アッセイにおける使用のために異種のポリペプチドに融合してよい。例えば、1つの実施形態では、本発明のLT結合分子に複合できるPEGは、それらのインビボ半減期を延ばす。Leong, S.R., et al., Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002)。

【0246】

さらに、本発明のLT結合分子は、それらの精製または検出を促進できるマーカー配列(ペプチドなど)に融合することができる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、ヘキサヒスチジンペプチド(pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)に提供されるタグなど)であり、とりわけ、これらの多くは市販されている。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)に記載のとおり、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の便利な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザ血球凝集素タンパク質由来のエピトープと相関する「HA」タグ(Wilson et al., Cell 37:767 (1984))および「フラグ」タグが挙げら

れるが、これらに限定されない。

【0247】

融合タンパク質は、当技術分野において周知である方法（例えば米国特許第5,116,964号および同第5,225,538号を参照されたい）を用いて調製できる。融合を行う正確な部位は、融合タンパク質の分泌または結合特性を至適化するように経験的に選択してよい。次いで、融合タンパク質をコードするDNAを発現のための宿主細胞中にトランスフェクトする。

【0248】

本発明のLT結合分子は、非複合形態で使用してもよいし、例えば、分子の治療特性を改善するため、標的検出を促進するため、または患者の画像化もしくは療法のために様々な分子のうち少なくとも1つに複合してもよい。本発明のLT結合分子は、精製を実施時、精製前か精製後のいずれかに標識または複合できる。

10

【0249】

特に、本発明のLT結合分子は、治療薬、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生体反応修飾因子、医薬品、またはPEGに複合してよい。

【0250】

結合体は複合のために選択された薬剤に応じて様々な技術を用いて組み立て得ることも、当業者は理解するであろう。例えば、ビオチンとの結合体は、例えば結合ポリペプチドをビオチンの活性化エステル（ビオチンN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルなど）と反応させることにより調製する。同様に、蛍光マーカ-との結合体はカップリング薬剤の存在下、例えば本明細書に列挙したものにおいて、またはイソチオシアネート、好ましくはフルオレセイン-イソチオシアネートとの反応により調製してよい。本発明のLT結合分子の結合体は類似した形で調製する。

20

【0251】

本発明は、診断または治療薬に複合した本発明のLT結合分子をさらに包含する。LT結合分子は、例えば、疾患の発現または進行をモニタリングするために、例えば、所与の治療および/または予防計画の有効性を決定するための部分的な臨床試験手段として診断的に使用できる。検出は、LT結合分子を検出可能な物質にカップリングすることにより促進できる。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、配合団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射活性物質、様々な陽電子放出断層撮影を用いた陽電子放出金属、および非放射活性常磁性金属イオンが挙げられる。本発明による診断としての使用のため抗体に複合できる金属イオンについては、例えば、米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素の例としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な配合団結合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、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、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられる；ならびに適切な放射活性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In または ^{99}Tc が挙げられる。

30

40

【0252】

LT結合分子は、化学ルミネセンス化合物へカップリングすることにより検出可能に標識もできる。次いで、化学反応経過中に生じる発光の存在を検出することにより、化学ルミネセンスタグ化LT結合分子の存在を決定する。特に有用な化学ルミネセンス標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

【0253】

LT結合分子が検出可能に標識できる1つの方法は、LT結合分子を酵素に結合して酵素免疫測定法（EIA）において結合した生産物を用いることである（Vollmer,

50

A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kigaku Shoin, Tokyo (1981)。LT結合分子に結合している酵素は、検出できる化学部分を産生する形で、例えば、分光光度法、蛍光測定により、または視覚的手段により適切な基質（好ましくは発色基質）と反応する。検出可能に標識した抗体のために使用できる酵素としては、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ-グリセロリン酸、デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、検出は、酵素の発色基質を用いる比色分析方法によって成し遂げることができる。検出は、同様に調製した標準と比較した基質の酵素反応範囲の視覚的比較によって成し遂げてもよい。

【0254】

検出は、他の任意の様々な免疫アッセイを用いて達成することができる。例えば、放射活性的に標識したLT結合分子により、ラジオイムノアッセイ(RIA)の使用を介して結合分子を検出することが可能である（例えば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (March, 1986)（参照することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。放射活性同位体は、計数器、シンチレーション計数器、またはオートラジオグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない手段により検出できる。

【0255】

LT結合分子は、蛍光放出金属（ ^{152}Eu など）、または他のランタニド系列を用いて検出可能に標識することもできる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)としてのかかる金属キレート化群を用いて結合分子に結合できる。

【0256】

様々な部分を結合分子に接合する技術は周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '8

4: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303 - 16 (1985)、および Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119 - 58 (1982) を参照されたい。
【0257】

特に、本明細書に開示された診断および治療方法における使用のための結合分子は、細胞毒（放射同位体、細胞毒性薬、または毒素など）治療薬、細胞増殖抑制剤、生物毒素、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生体反応修飾因子、医薬品、免疫学的活性リガンド（例えば、リンフォカインまたは他の抗体であり、生成分子は腫瘍細胞とT細胞などのエフェクター細胞との両方に結合する）、またはPEGに複合し得る。別の実施形態では、本明細書に開示された診断および治療方法における使用のための結合分子は、腫瘍の血管新生を低減する分子に複合できる。他の実施形態では、開示された組成物は、薬剤またはプロドラッグにカップリングした結合分子を含んでよい。本発明のさらに他の実施形態では、特異的な生体毒素またはそれらの細胞毒性断片（リシン、ゲロニン、緑膿菌外毒素またはジフテリア毒素など）に複合される結合分子の使用を含む。どの複合結合分子または非複合結合分子を使用するかを選択は、癌の種類および病期、補助治療（例えば、化学療法または外部放射線）の使用ならびに患者の状態に応じる。当業者は、かかる選択を本明細書における教示に照らして容易に行うことができることが理解されるであろう。

【0258】

先行試験において、同位体で標識した抗腫瘍抗体が、固形腫瘍細胞ならびに動物モデルにおける（および一部の場合ではヒトにおける）リンパ腫/白血病を破壊するために成功裏に使用されていることが理解されるであろう。例示的な放射同位体としては、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{105}Rh 、 ^{153}Sm 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re および ^{188}Re が挙げられる。放射性核種は作用して核DNA中の複数の鎖切断を引き起こす電離放射線を産生し、細胞死をもたらす。治療結合体を産生するために使用される同位体は、典型的には、短経路長の高エネルギー粒子または粒子を産生する。かかる放射性核種は近接する細胞、例えば結合体が結合しているかまたは進入している腫瘍性細胞を殺傷する。それらは非局所化細胞に対して効果がほとんどないか無効である。放射性核種は、本質的に非免疫原性である。

【0259】

本発明と共に放射標識された結合体の使用に関して、結合分子は（例えばヨウ素化を介して）直接標識してもよいし、キレート剤の使用を介して間接的に標識してもよい。本明細書で使用する「間接標識」および「間接標識法」という語句は両方とも、キレート剤が結合分子に共有結合し、少なくとも1種の放射性核種がキレート剤と結合することを意味する。かかるキレート剤は、ポリペプチドと放射同位体の両方に結合するため、二官能性キレート剤と典型的に呼ばれる。特に好ましいキレート剤は、1-イソチオサイクマトベンジル-3-メチルジオセレントリアミン五酢酸（「MX-DTPA」）およびシクロヘキシルジエチレントリアミン五酢酸（「CHX-DTPA」）誘導体を含む。他のキレート剤は、P-DOTAおよびEDTA誘導体を含む。間接標識のために特に好ましい放射性核種としては、 ^{111}In および ^{90}Y が挙げられる。

【0260】

本明細書で使用する「直接標識」および「直接標識法」という語句は両方とも、放射性

核種が（典型的には、アミノ酸残基を介して）直接ポリペプチドに共有結合していることを意味する。より具体的に述べると、これらの結合技術には、無作為標識および部位特異的標識が含まれる。後者の場合、標識は、ポリペプチド上の特定部位（結合体のFc部分のみに存在するN結合型糖類残基など）が対象とされる。さらに、様々な直接標識技術およびプロトコールが本発明に適合する。例えば、テクネチウム-99標識ポリペプチドは、リガンド交換プロセスにより、スズイオン溶液を用いて過テクネチウム酸（ TcO_4^- ）を還元し、セファデックスカラム上へ還元されたテクネチウムをキレート化し、このカラムに結合ポリペプチドを適用することにより、またはバッチ標識技術により、例えば過テクネチウム酸、還元剤（ SnCl_2 など）、緩衝液（フタル酸ナトリウム-カリウム溶液など）、および結合分子をインキュベーションすることによって調製してよい。いずれの場合でも、ポリペプチドを直接標識するために好ましい放射性核種は当技術分野において周知であり、直接標識のために特に好ましい放射性核種はチロシン残基を介して共有結合する ^{131}I である。本明細書に開示された方法における使用のための結合分子は、例えば、放射性ナトリウムまたはヨウ化カリウムおよび化学的酸化剤（次亜塩素酸ナトリウム、クロラミンTなど）、または酵素的酸化剤（ラクトペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼおよびグルコースなど）を用いて誘導し得る。

10

【0261】

キレート剤およびキレート剤結合体に関する特許は、当技術分野で知られている。例えば、Gansowの米国特許第4,831,175号は、ポリ置換されたジエチレントリアミン五酢酸キレートおよびこれを含むタンパク質結合体、ならびにそれらの調製方法を対象としている。Gansowの米国特許第5,099,069号、同第5,246,692号、同第5,286,850号、同第5,434,287号および同第5,124,471号もポリ置換されたDTPAキレートに関する。これらの特許は、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる。適合する金属キレートの他の例は、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DPTA）、1,4,8,11-テトラアザテトラデカン、1,4,8,11-テトラアザテトラデカン-1,4,8,11-四酢酸、1-オキサ-4,7,12,15-テトラアザヘプタデカン-4,7,12,15-四酢酸などである。シクロヘキシル-DTPAまたはCHX-DTPAが特に好ましく、以下で何度も例示する。さらに他の適合するキレート剤（未発見のものを含む）が当業者により容易に識別され得、明らかに本発明の範囲内である。

20

30

【0262】

結合分子（例えば、結合ポリペプチド）に接合するためのさらなる好ましい薬剤は、細胞毒性薬であり、特に癌療法に使用される薬剤である。本明細書で使用する「細胞毒または細胞毒性薬」とは、細胞の成長および増殖弊害をもたらす、細胞または悪性腫瘍を低下させる、阻害するかまたは破壊するように作用し得る任意の薬剤を意味する。例示的な細胞毒としては、放射性核種、生体毒素、酵素活性毒素、細胞増殖抑制剤もしくは細胞毒性治療薬、プロドラッグ、免疫学的活性リガンドおよび生体反応修飾因子（サイトカインなど）が挙げられるが、これらに限定されない。免疫反応細胞または悪性腫瘍細胞の増殖を遅延化または緩慢化するように作用する細胞毒はいずれも本発明の範囲内である。

40

【0263】

様々な部分を結合分子に接合する技術は周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carri-

50

rs Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy : A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303 - 16 (1985)、および Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119 - 58 (1982)を参照されたい。
【0264】

B. 免疫原性の低下

ある実施形態では、本発明のLT結合分子またはその一部を、当技術分野で認識されている技術を用いてそれらの免疫原性を低下させるように修飾する。例えば、結合分子またはその一部はヒト化、霊長類化、または脱免疫化であることができる。1つの実施形態では、キメラ結合分子を作製することもでき、または結合分子がキメラ抗体分子の少なくとも一部を含んでもよい。かかる場合、非ヒトLT結合分子、典型的には、親結合分子の抗原結合特性を保持するかまたは実質的に保持するがヒトにおける免疫原性は低いマウスまたは霊長類結合分子を構築する。これは、(a)ヒト定常領域上へ完全非ヒト可変ドメインをグラフトしてキメラ結合分子を生成すること；(b)重要なフレームワーク残基を保持しつつまたは保持せずヒトフレームワークおよび定常領域中に1つ以上の非ヒト相補性決定領域(CDR)を少なくとも一部グラフトすること；または(c)完全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基を置換することによりそれらをヒト様部分で「覆い隠す」こと、を含む様々な方法により成し遂げ得る。かかる方法については、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851 - 6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65 - 92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 - 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 - 498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169 - 217 (1994)、ならびに米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、および同第6,190,370号(これらのすべてがそれらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる)に開示されている。

【0265】

1つの実施形態では、本発明の結合分子(例えば、抗体)またはその一部はキメラであってよい。キメラ結合分子は、結合分子の異なる部分が異なる動物種に由来している結合分子(マウスモノクローナル抗体由来である可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体など)である。キメラ結合分子の産生方法は、当技術分野で知られている。例えば、Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191 - 202 (1989); 米国特許第5,807,715号；同第4,816,567号；および同第4,816,397号(これらは、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい。「キメラ抗体」産生のために開発した技術(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851 - 855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604 - 608 (1984); Takeda et al., Nat

ure 314:452-454 (1985))を用いて、前記分子を合成してよい。例えば、マウスLT抗体分子の結合特異性をコードする遺伝子配列を適切な生体活性のヒト抗体分子の配列と融合してよい。本明細書で使用する、キメラ結合分子とは、異なる部分が異なる動物種由来の分子(マウスモノクローナル抗体由来である可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなど)、例えば、ヒト化抗体である。

【0266】

別の実施形態では、本発明の結合分子またはその一部は霊長類化されている。抗体の霊長類化方法は、Newman, Biotechnology 10: 1455-1460 (1992)により開示されている。具体的には、この技術により、サル可変ドメインおよびヒト定常配列を含む抗体が生成される。この参考文献は、その全体を参照することにより本明細書に組み込まれる。さらに、この技術は、一般に指定された米国特許第5,658,570号、同第5,693,780号および同第5,756,096号(それぞれは、参照することにより本明細書に組み込まれる)にも記載されている。

【0267】

別の実施形態では、本発明の結合分子(例えば、抗体)またはその一部はヒト化されている。ヒト化結合分子は、非ヒト種由来の結合特異性を有する、すなわち、非ヒト種抗体由来の相補性決定領域(CDR)を1つ以上、およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する結合分子である。ヒトフレームワーク領域におけるフレームワーク残基は、抗原結合を変異することが多く、好ましくは改善するために変異させる、例えば、CDRドナー抗体由来の対応する残基と置換する。これらのフレームワーク置換は、当技術分野において周知の方法により特定される(例えば、抗原結合にとって重要であるフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基の相互作用のモデリング、および特定の位置の通常ではないフレームワーク残基を同定するための配列比較により)。(例えば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号; Reichmann et al., Nature 332:323 (1988)(これらは、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる)を参照されたい)。抗体は、例えば、CDRグラフト(欧州特許第239,400号; PCT公開WO91/09967号; 米国特許第5,225,539号; 同第5,530,101号; および同第5,585,089号)、ベニアリング又は表面再処理(欧州特許第592,106号; 欧州特許第519,596号; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994))、および鎖混合(米国特許第5,565,332号)を含む当技術分野で知られている様々な技術を用いてヒト化できる。抗体のヒト化に関する他の参考文献としては、以下が挙げられる: Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Edition, U.S. Dept. Health and Human Services. U.S. Govt. Printing Office. Chothia, C., Lesk, A.M., Ramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., Tulip, W.R., Colman, P.M., Spinelli, S., Alzari, P.M. and Poljak, R.J. (1989) Nature 342:877-883. Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R. and Karpus, M. (1985) J. Mol. Biol. 186:651 Brensing-Kuppers J, Zocher I, Thiebe R, Zachau HG. (1997). Gene. 191(2):173-81. Matsu

da F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T. (1998) J Exp Med. 188(11):2151-62. Carter P.J. and Presta L.J. (2000) "Humanized antibodies and methods for making them" 米国特許第6,407,213号 Johnson, T.A., Rassenti, L.Z., and Kippes, T.J. (1997) J. Immunol. 158:235-246、それぞれは、参照することにより本明細書に組み込まれる。本出願に包含される例示的なヒト化可変領域を、実施例に説明する。

【0268】

脱免疫化も、結合分子の免疫原性を低減するために使用することができる。本明細書で使用する「脱免疫化」という用語は、T細胞エピトープを修飾するための結合分子の改変を含む(例えば、WO9852976A1号、WO0034317A2号を参照されたい)。例えば、開始抗体からのVHおよびVL配列を分析することができ、各V領域からのヒトT細胞エピトープ「マップ」が相補性決定領域(CDR)および配列内の他の主要残基に関してエピトープ位置を示す。T細胞エピトープマップからの個々のT細胞エピトープは、最終抗体の活性を変えるリスクが低い代替アミノ酸置換を特定するために分析される。アミノ酸置換の組み合わせを含む一連の代替VHおよびVL配列を設計し、続いてこれらの配列を一連の結合ポリペプチド(例えば、本明細書に開示された診断および治療方法における使用のためのLT特異的抗体またはその免疫特異的な断片)に組み込んでから機能について試験する。典型的には、12~24の変異体抗体を生成して試験する。次いで、完全抗体の産生のため、修飾VおよびヒトC領域を含む完全な重鎖および軽鎖遺伝子を発現ベクターにクローン化し、その結果生じるプラスミドを細胞系中に導入する。次いで、抗体を適切な生化学的および生物学的アッセイにおいて比較し、至適変異体を特定する。

【0269】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、ヒト化抗体であるかまたはアクセプターヒトフレームワークまたは実質的にヒトアクセプターフレームワークを有するヒト化抗体可変領域を含む。本明細書の目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンフレームワーク由来、またはヒトコンセンサスフレームワーク由来のVLまたは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である。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「由来の」アクセプターヒトフレームワークとは、それと同じアミノ酸配列を含んでもよいし、変化したあるアミノ酸配列を含んでもよい。1つの実施形態では、VLアクセプターヒトフレームワークは、配列中でVLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

【0270】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択において最も多く生じるアミノ酸残基を示すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループ由来である。ヒト生殖系列配列または一部のコンセンサス配列(例えば、FR4)の生殖系列配列も考慮し得る。

【0271】

1つの実施形態では、軽鎖および重鎖のアクセプターフレームワーク配列は、正準、接触面およびベニヤゾーン残基におけるマウス開始抗体配列と高い類似性を有するものを特定する。生殖系列配列との類似性を決定時にCDR配列は除外する。1つの実施形態では、アクセプター配列は同じ長さの(CDR-H3を除く)CDRを有する;および最少数の復帰変異を必要とする。

【0272】

1つの実施形態では、ヒト化設計の物理化学特性を改善するために、安定したコンセン

サスクラスからより離れているアクセプターフレームワークを選別する。

【0273】

105抗体の1つの実施形態では、(コンセンサスヒトKV3 FR4を有する)ヒト生殖系列配列h u L 6およびヒトg i | 3 0 0 4 6 8 8をそれぞれ軽鎖および重鎖のアクセプターフレームワークとして用いてよい。

【0274】

1つの実施形態では、アミノ酸1位に復帰変異(E D;すなわち、EからDへ)を含むヒト化105軽鎖を作製する。1つの実施形態では、アミノ酸21位に復帰変異(L I)を作製する。別の実施形態では、アミノ酸68位に復帰変異(G R)を作製する。さらに別の実施形態では、アミノ酸86位に復帰変異(Y F)を作製する。

10

【0275】

1つの実施形態では、1位に復帰変異を含むヒト化軽鎖の第1の型を作製する。別の実施形態では、1位、21位、および86位に復帰変異を含む105軽鎖の第2の型を作製する。別の実施形態では、1位、21位、68位、および86位に復帰変異を含む105軽鎖の第3の型を作製する。

【0276】

3つの異なる型のヒト化LT105軽鎖を以下に記載する。ヒト化LT105軽鎖は生殖系列h u L 6フレームワーク//コンセンサスヒトKV4 FR4//LT105 L CDRを含む。下記L1、L2、およびL3の復帰変異を小文字の太字フォントで示す。CDR(コチア定義を含む)を下線で示す。

20

【化1】

>L0=グラフト

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASESVDNYGISFMHW
YQQKPGQAPRLLIY RASNLESGI PARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYC QQSNKDPYTFGQGGTKVEIK (配列番号:)

>L1

dIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASESVDNYGISFMHW
YQQKPGQAPRLLIY RASNLESGI PARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYC QQSNKDPYTFGQGGTKVEIK (配列番号:)

>L2

dIVLTQSPATLSLSPGERATiSC RASESVDNYGISFMHW
YQQKPGQAPRLLIY RASNLESGI PARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVfYC QQSNKDPYTFGQGGTKVEIK (配列番号:)

>L3

dIVLTQSPATLSLSPGERATiSC RASESVDNYGISFMHW
YQQKPGQAPRLLIY RASNLESGI PARFSGSGS rTDFTLT
ISSLEPEDFAVfYC QQSNKDPYTFGQGGTKVEIK (配列番号:)

30

【0277】

1つの実施形態では、アミノ酸1位に復帰変異(E D)を含むヒト化105重鎖を作製する。1つの実施形態では、アミノ酸2r位に復帰変異(A V)を作製する。別の実施形態では、アミノ酸25位に復帰変異(S T)を作製する。さらに別の実施形態では、アミノ酸37位に復帰変異(V I)を作製する。さらに別の実施形態では、アミノ酸47位に復帰変異(W G)を作製する。さらに別の実施形態では、アミノ酸48位に復帰変異(I M)を作製する。さらに別の実施形態では、アミノ酸49位に復帰変異(S G)を作製する。さらに別の実施形態では、アミノ酸67位に復帰変異(F I)を作製する。さらに別の実施形態では、アミノ酸78位に復帰変異(L F)を作製する。さらに別の実施形態では、アミノ酸82位に復帰変異(M L)を作製する。

40

【0278】

1つの実施形態では、24位および47位に復帰変異を含むヒト化105重鎖の第1の

50

型を作製する。別の実施形態では、24位、37位、49位、67位、および78位に復帰変異を含む105重鎖の第2の型を作製する。別の実施形態では、1位、24位、25位、37位、47位、49位、67位、および78位に復帰変異を含む105重鎖の第3の型を作製する。別の実施形態では、1位、24位、25位、37位、47位、48位、49位、67位、78位、および82位に復帰変異を含む105重鎖の第4の型を作製する。

【0279】

4つの異なる型のヒト化LT105重鎖を以下に記載する。ヒト化LT105重鎖はgi | 3004688フレームワーク//LT105 H CDRを含む。下記H1、H2、H3、およびH4の復帰変異を小文字の太字フォントで示す。CDR(コチア定義を含む)を下線で示す。

10

【化2】

>H0=グラフト

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITSGYYWNWVR
QAPGKGLEWISYISYDGSNNYNPSLKNRFTISRDSAKNS
LYLHMHSLRAEDTAVYYCARDAYSYGMDYWGQGTTTSTVS
S (配列番号:)

>H1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAvSGYSITSGYYWNWVR
QAPGKGLE **gIS**YISYDGSNNYNPSLKNRFTISRDSAKNS
fYLHMHSLRAEDTAVYYCARDAYSYGMDYWGQGTTTSTVS
S (配列番号:)

20

>H2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAvSGYSITSGYYWNW**i**R
QAPGKGLE **gIg**YISYDGSNNYNPSLKNR**i**TISRDSAKNS
fYLHMHSLRAEDTAVYYCARDAYSYGMDYWGQGTTTSTVS
S (配列番号:)

>H3

dEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAv**t**GYSITSGYYWNW**i**R
QAPGKGLE **gIg**YISYDGSNNYNPSLKNR**i**TISRDSAKNS
fYLHMHSLRAEDTAVYYCARDAYSYGMDYWGQGTTTSTVS
S (配列番号:)

30

>H4

dEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAv**t**GYSITSGYYWNW**i**R
QAPGKGLE **gm**gYISYDGSNNYNPSLKNR**i**TISRDSAKNS
fYLH**I**HSLRAEDTAVYYCARDAYSYGMDYWGQGTTTSTVS
S (配列番号:)

【0280】

上に説明するように、105抗体の代替の型を生成するためにさらに改変してよく、様々な軽鎖と重鎖の組み合わせを行うことができる。例えば、1つの実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第0の型の軽鎖またはそのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第1の型の重鎖またはそのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第0の型の軽鎖またはそのCDRと、105抗体の第1の型の重鎖またはそのCDRとの組み合わせを含む。

40

L0

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NY
GISFMHWY QQKPGQAPRL

51 LIYRASNL ES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SL
EPEDFAVY YCQQSNKDPY

101 TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SG

50

T A S V V C L L N N F Y P R E A K V
 1 5 1 Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
 2 0 1 T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 :)
 H 1
 1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G Y S I T S G
 Y Y W N W V R Q A P G K G L E G I S
 5 1 Y I S Y D G S N N Y N P S L K N R F T I S R D S A K N S F Y L H
 M H S L R A E D T A V Y Y C A R D A
 1 0 1 Y S Y G M D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S 10
 S K S T S G G T A A L G C L V K D Y
 1 5 1 F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S
 L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I
 2 0 1 C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A
 P E L L G G P S V F L F P P K P K D
 2 5 1 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
 V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T
 3 0 1 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P
 I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
 3 5 1 T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W 20
 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 4 0 1 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A
 L H N H Y T Q K S L S L S P G
 (配列番号 :)

別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体のA型の軽鎖またはそのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体のB型の軽鎖またはそのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体のC型の軽鎖またはそのCDRを含む。例えば、1つの実施形態では、かかる軽鎖は105抗体の重鎖の型と対合できる。

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S E S V D N Y 30
 G I S F M H W Y Q Q K P G Q A P R L
 5 1 L I Y K A S N L E S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L
 E P E D F A V Y Y C Q Q S N K D P Y
 1 0 1 T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G
 T A S V V C L L N N F Y P R E A K V
 1 5 1 Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
 2 0 1 T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

B 型

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S E S V D N Y 40
 G I S F M H W Y Q Q K P G Q A P R L
 5 1 L I Y R A S S L E S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L
 E P E D F A V Y Y C Q Q S N K D P Y
 1 0 1 T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G
 T A S V V C L L N N F Y P R E A K V
 1 5 1 Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
 2 0 1 T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

C 型

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S E S V D N Y 50

```

G I S F M H W Y   Q Q K P G Q A P R L
   5 1   L I Y K A S S L E S   G I P A R F S G S G   S G T D F T L T I S   S L
E P E D F A V Y   Y C Q Q S N K D P Y
   1 0 1   T F G Q G T K V E I   K R T V A A P S V F   I F P P S D E Q L K   S G
T A S V V C L L   N N F Y P R E A K V
   1 5 1   Q W K V D N A L Q S   G N S Q E S V T E Q   D S K D S T Y S L S   S T
L T L S K A D Y   E K H K V Y A C E V
   2 0 1   T H Q G L S S P V T   K S F N R G E C

```

【0281】

別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第10の型の軽鎖またはそのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第1の型の重鎖またはそのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第10の型の軽鎖またはそのCDRと105抗体の第1の型の重鎖またはそのCDRとの組み合わせを含む。

10

L10

```

   1   A I Q L T Q S P S S   L S A S V G D R V T   I T C R A S E S V D   N Y
G I S F M H W Y   Q Q K P G K A P K L
   5 1   L I Y K A S S L E S   G V P S R F S G S G   S G T D F T L T I S   S L
Q P E D F A T Y   Y C Q Q S N K D P Y
   1 0 1   T F G Q G T K V E I   K R T V A A P S V F   I F P P S D E Q L K   S G
T A S V V C L L   N N F Y P R E A K V
   1 5 1   Q W K V D N A L Q S   G N S Q E S V T E Q   D S K D S T Y S L S   S T
L T L S K A D Y   E K H K V Y A C E V
   2 0 1   T H Q G L S S P V T   K S F N R G E C

```

20

【0282】

別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第12の型もしくは13の型の軽鎖またはそのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第1の型の重鎖またはそのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第12の型もしくは13の型の軽鎖またはそのCDRと105抗体の第1の型の重鎖またはそのCDRとの組み合わせを含む。

30

L12

```

   1   D I Q L T Q S P S S   L S A S V G D R V T   I T C R A S E S V D   N Y
G I S F M H W Y   R Q K P G K A P K L
   5 1   L I Y K A S S L E S   G V P S R F S G R G   S G T D F T L T I S   S L
Q P E D F A T Y   Y C Q Q S N K D P Y
   1 0 1   T F G Q G T K V E I   K R T V A A P S V F   I F P P S D E Q L K   S G
T A S V V C L L   N N F Y P R E A K V
   1 5 1   Q W K V D N A L Q S   G N S Q E S V T E Q   D S K D S T Y S L S   S T
L T L S K A D Y   E K H K V Y A C E V
   2 0 1   T H Q G L S S P V T   K S F N R G E C

```

40

L13

```

   1   D I R L T Q S P S S   L S A S V G Q R V T   I S C R A S E S V D   N Y
G I S F M H W Y   R Q K P G K A P K L
   5 1   L I Y K A S S L E S   G V P S R F S G R G   S G T D F T L T I S   S L
Q P E D F A T Y   Y C Q Q S N K D P Y
   1 0 1   T F G Q G T K V E I   K R T V A A P S V F   I F P P S D E Q L K   S G
T A S V V C L L   N N F Y P R E A K V
   1 5 1   Q W K V D N A L Q S   G N S Q E S V T E Q   D S K D S T Y S L S   S T
L T L S K A D Y   E K H K V Y A C E V
   2 0 1   T H Q G L S S P V T   K S F N R G E C

```

50

別の実施形態では、本発明の結合分子は、105抗体の第11の型または第14の型の重鎖またはそのCDR、例えば、105抗体の軽鎖の型との組み合わせを含む。

H11

```

      1  EVQLVESGGG  LVQPRGSLRL  SCAVSGYSIT  SG
YYWNWIRQ  APGKGLEWVS
      51  YISYDGSNNY  NPSLKNRFTI  SRDNSKNTFY  LQ
MNNLRAED  TAAYYCADA
     101  YSYGMDYWGQ  GTTVTVSSAS  TKGPSVFPLA  PS
SKSTSGGT  AALGCLVKDY
     151  FPEPVTVSWN  SGALTSGVHT  FPAVLQSSGL  YS
LSSVVTVP  SSSLGTQTYI
     201  CNVNHKPSNT  KVDKKVEPKS  CDKTHTCPPC  PA
PELLGGPS  VFLFPPKPKD
     251  TLMISRTPEV  TCVVVDVSHE  DPEVKFNWYV  DG
VEVHNAKT  KPREEQYNST
     301  YRVVSVLTVL  HQDWLNGKEY  KCKVSNKALP  AP
IEKTISKA  KGQPREPQVY
     351  TLPSPSRDELT  KNQVSLTCLV  KGFYPSDIAV  EW
ESNGQPEN  NYKTTTPVLD
     401  SDGSFFLYSK  LTVDKSRWQQ  GNVFSCSVMH  EA
LHNHYTQK  SLSLSPG

```

H14

```

      1  EVQLQESGGG  LVKPRGSLRL  SCAVSGYSIT  SG
YYWNWIRQ  APGKGLEWVS
      51  YISYDGSNNY  NPSLKNRFSI  SRDNSKNTFY  LK
MNRLRAED  SAAYYCADA
     101  YSYGMDYWGQ  GTTVTVSSAS  TKGPSVFPLA  PS
SKSTSGGT  AALGCLVKDY
     151  FPEPVTVSWN  SGALTSGVHT  FPAVLQSSGL  YS
LSSVVTVP  SSSLGTQTYI
     201  CNVNHKPSNT  KVDKKVEPKS  CDKTHTCPPC  PA
PELLGGPS  VFLFPPKPKD
     251  TLMISRTPEV  TCVVVDVSHE  DPEVKFNWYV  DG
VEVHNAKT  KPREEQYNST
     301  YRVVSVLTVL  HQDWLNGKEY  KCKVSNKALP  AP
IEKTISKA  KGQPREPQVY
     351  TLPSPSRDELT  KNQVSLTCLV  KGFYPSDIAV  EW
ESNGQPEN  NYKTTTPVLD
     401  SDGSFFLYSK  LTVDKSRWQQ  GNVFSCSVMH  EA
LHNHYTQK  SLSLSPG

```

【0283】

102抗体の1つの実施形態では、(コンセンサスHUMKV2 FR4を有する)ヒト生殖系列配列huA3および(コンセンサスHUMHV3 FR4を有する)ヒト生殖系列配列huVH3-11を使用する。

【0284】

再加工した可変軽鎖の1つの型を設計し、軽および重CDRグラフト配列に加えて、4つの型の再加工した可変重鎖を設計した。重鎖において、第1の型は、最少数の復帰変異を含み、次の型は、より多くの復帰変異を含む(すなわちそれらは最小の「ヒト化」である)。すべての型の重鎖においてマウスA113を(ヒトHV FR4に存在する)S113に置換し、これは復帰変異として分析しなかった。番号付けはカバット体系に従う。

【0285】

1つの実施形態では、ヒト化LT102 (huLT102) の再加工した軽鎖は生殖系列huA3フレームワーク、コンセンサスヒトKV2 FR4、およびLT102 L CDRを含む。hu102の軽鎖における復帰変異は、I2Vを含む。V2は、CDR-L1を支持する正準残基である。

【0286】

例示的なヒト化LT102軽鎖配列は、下記である(復帰変異に関する詳細については、上記を参照されたい)。ヒト化LT102軽鎖は、生殖系列huA3フレームワーク/コンセンサスヒトKV2 FR4//LT102 L CDRを含む。復帰変異を小文字の太字フォントで示す。CDR(コチア定義を含む)を下線で示す。

10

【化3】

>L0=グラフト

DIVMTQSP^LSLPVTPTGEPASISCRSSQNI^VHSNGNTYLE
WYLQKPGQSPQLLIYK^VSNRFS^GVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCF^QQGSHPWT^FFGQGTKVEIK

>L1

D^vVM^TQSP^LSLPVTPTGEPASISCRSSQNI^VHSNGNTYLE
WYLQKPGQSPQLLIYK^VSNRFS^GVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCF^QQGSHPWT^FFGQGTKVEIK

【0287】

4つの異なる型のヒト化LT102重鎖を以下に記載する。ヒト化LT102重鎖は生殖系列huVH3-11フレームワーク//コンセンサスヒトHV3 FR4//LT102 H CDRを含む。下記H1、H2、H3、およびH4の復帰変異を小文字の太字フォントで示す。CDR(コチア定義を含む)を下線で示す。

20

【化4】

>H0=グラフト

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS^GFTFSDYYMYWIRQ
APGKGLEWVS^TIGDGTSTHY^PDSVQGRFTISRDN^AKN
SLYLQMNSLR^AEDTAVYYCAR^DLGTPFAYWGQGT^LVTVS

30

>H1

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA^vS^GFTFSDYYMYWIRQ
APGKGLEWVS^TIGDGTSTHY^PDSVQGRFTISRDN^AKN
SLYLQMNSLR^AEDTAVYYCAR^DLGTPFAYWGQGT^LVTVS

>H2

^eVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA^vS^GFTFSDYYMYWIRQ
APGKGLEWVS^TIGDGTSTHY^PDSVQGRFTISR^D^yAKNS
SLYLQMNSLR^AEDTAVYYCAR^DLGTPFAYWGQGT^LVTVS

40

>H3

^eV^kLVESGGGLVKPGGSLRLSCA^vS^GFTFSDYYMYWIRQ
APGKGLEWVS^TIGDGTSTHY^PDSVQGRFTISR^D^yAKNS
SLYLQMNSLR^AEDTAVYYCAR^DLGTPFAYWGQGT^LVTVS

>H4

^eV^kLVESGGGLVKPGGSLRLSCA^vS^GFTFSDYYMYWIRQ
APGKGLEWVS^TIGDGTSTHY^PDSVQGRFTISR^D^yA^tNⁿ
SLYLQMNSLR^AEDTAVYYCAR^DLGTPFAYWGQGT^LVTVS

1つの実施形態では、アミノ酸2位に復帰変異(I V)を含むヒト化102軽鎖を作

50

製する。

【0288】

1つの実施形態では、アミノ酸24位に復帰変異(A V)を含むヒト化102重鎖を作製する。1つの実施形態では、アミノ酸73位に復帰変異(N Y)を含むヒト化102重鎖を作製する。1つの実施形態では、アミノ酸3位に復帰変異(Q K)を含むヒト化102重鎖を作製する。1つの実施形態では、アミノ酸位置に復帰変異(K T)を含むヒト化102重鎖を作製する。1つの実施形態では、アミノ酸77位に復帰変異(S N)を含むヒト化102重鎖を作製する。

【0289】

1つの実施形態では、24位に復帰変異を含むヒト化102重鎖の第1の型を作製する。別の実施形態では、24位、1位、および73位に復帰変異を含む102重鎖の第2の型を作製する。別の実施形態では、24位、1位、73位、および3位に復帰変異を含む102重鎖の第3の型を作製する。別の実施形態では、24位、1位、73位、3位、75位、および77位に復帰変異を含む102重鎖の第4の型を作製する。

【0290】

C. エフェクター機能およびFc修飾

本発明のLT結合分子は、エフェクター機能を1つ以上媒介する定常領域を含んでよい。例えば、抗体定常領域への補体C1成分の結合は補体系を活性化し得、したがって、標的細胞の補体依存性細胞毒を引き起こす。補体の活性化は、細胞病原のオプソニン化および溶解において重要である。補体の活性化は炎症反応も刺激し、自己免疫性過敏症にも関与し得る。さらに、抗体は、細胞上のFc受容体(FcR)へ結合する抗体Fc領域上のFc受容体結合部位で、Fc領域を介して、様々な細胞上の受容体に結合する。IgG(受容体)、IgE(イプシロン受容体)、IgA(アルファ受容体)およびIgM(ミュー受容体)を含む、異なるクラスの抗体に特異的なFc受容体がいくつかある。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、抗体コーティングした粒子の貪食および破壊、免疫結合体のクリアランス、(抗体依存性細胞傷害、またはADCCと呼ばれる)キラー細胞による抗体コーティングした標的細胞の溶解、炎症メディエーターの放出、胎盤通過および免疫グロブリン産生の制御を含む多くの重要な多様な生体反応を引き起こす。

【0291】

本発明のある実施形態は、ほぼ同じ免疫原性の完全な、改変されていない抗体と比較して、エフェクター機能(1つまたは複数)の低下、エフェクター機能(1つまたは複数)の上昇、非共有二量体化の能力の改善、腫瘍部位に局所化する能力の増大、低下した血清半減期、または増大した血清半減期などの所望の生化学特性を提供するように、1つ以上の定常領域ドメインの少なくとも1個のアミノ酸が欠失しているかあるいは改変されているLT結合分子を含む。例えば、本明細書に記載の診断および治療方法における使用のためのある結合分子は、免疫グロブリン重鎖に類似するポリペプチド鎖を含むが1つ以上の重鎖ドメインの少なくとも一部を欠くドメインを欠失した抗体である。例えば、ある抗体、修飾抗体の定常領域の1つの完全ドメインは欠失される、例えば、すべてのまたは部分的なCH2ドメインが欠失される。

【0292】

あるLT結合分子では、抗LT結合部位はFc部分に融合してよい。1つの実施形態では、Fc部分は抗体分子由来の野生型Fc部分であってよい。別の実施形態では、当技術分野で知られている技術を用いて、エフェクター機能を変化(例えば、上昇または低下)させるためにFc部分を変異させてよい。例えば、定常領域ドメインの欠失または不活性化(点変異または他の手段を介して)は、Fc受容体の循環中修飾結合分子への結合を低下し得、したがって腫瘍の局所化を増大し得る。他の場合、本発明と一致する定常領域修飾は補体結合を緩和し得、したがって血清半減期および複合細胞毒の非特異的な結合を低下させ得る。さらに定常領域の他の修飾を用いて、増大した抗原特異性または柔軟性により高まった局所化を可能とするジスルフィド結合またはオリゴ糖部分を修飾し得る。結果として生じる生理的プロファイル、生物学的利用能および修飾の他の生化学的效果(腫瘍

10

20

30

40

50

局所化、体内分布および血清半減期など)を過度の実験なしに周知の免疫技術を用いて容易に測定かつ定量化し得る。

【0293】

ある実施形態では、本発明の結合ポリペプチドに使用されるFcドメインは、Fc変異体である。本明細書で使用する「Fc変異体」という用語は、Fcドメインが由来する野生型Fcドメインと比較して、アミノ酸置換を少なくとも1つ有する前記Fcドメインを指す。例えば、FcドメインはヒトIgG1抗体に由来し、前記ヒトIgG1 FcドメインのFc変異体は、野生型Fcドメインと比較して(例えば、結合分子のエフェクター機能または半減期を改変するように設計されている)アミノ酸置換を少なくとも1つ含む。

10

【0294】

Fc変異体のアミノ酸置換(1つまたは複数)はFcドメイン内の任意の位置(すなわち、任意のEU規定アミノ酸位置)に位置してよい。1つの実施形態では、Fc変異体は、ヒンジドメインまたはその一部に位置するアミノ酸に置換を含む。別の実施形態では、Fc変異体は、CH2ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸に置換を含む。別の実施形態では、Fc変異体は、CH3ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸に置換を含む。別の実施形態では、Fc変異体は、CH4ドメインまたはその一部に位置するアミノ酸に置換を含む。

【0295】

本発明の結合ポリペプチドは、エフェクター機能および/またはFcR結合の改善(例えば、低下または上昇)を付与することが知られている当技術分野で認識されているFc変異体を用いてよい。前記Fc変異体は、例えば、PCT国際出願公開WO88/07089A1号、同WO96/14339A1号、同WO98/05787A1号、同WO98/23289A1号、同WO99/51642A1号、同WO99/58572A1号、同WO00/09560A2号、同WO00/32767A1号、同WO00/42072A2号、同WO02/44215A2号、同WO02/060919A2号、同WO03/074569A2号、同WO04/016750A2号、同WO04/029207A2号、同WO04/035752A2号、同WO04/063351A2号、同WO04/074455A2号、同WO04/099249A2号、同WO05/040217A2号、同WO05/070963A1号、同WO05/077981A2号、同WO05/092925A2号、同WO05/123780A2号、同WO06/019447A1号、同WO06/047350A2号、および同WO06/085967A2号または米国特許第5,648,260号;同第5,739,277号;同第5,834,250号;同第5,869,046号;同第6,096,871号;同第6,121,022号;同第6,194,551号;同第6,242,195号;同第6,277,375号;同第6,528,624号;同第6,538,124号;同第6,737,056号;同第6,821,505号;同第6,998,253号;および同第7,083,784号(それぞれは、参照することにより本明細書に組み込まれる)に開示の任意の1つのアミノ酸置換を含んでよい。

20

30

【0296】

ある実施形態では、本発明の結合ポリペプチドは、抗原に依存しない抗体のエフェクター機能、特に抗体の循環中半減期を改変するアミノ酸置換を含むFc変異体ポリペプチドを含む。かかる結合ポリペプチドは、これらの置換がない結合ポリペプチドと比較時、FcRnへの結合が増大または低減しており、したがって、それぞれ、血清中半減期が増大しているかまたは低減している。FcRnに対する親和性の改善されたFc変異体の血清半減期はより長いことが予想され、かかる分子は、(例えば、慢性疾患または障害を治療するために)投与したポリペプチドの半減期が長いことが望まれる場合に、哺乳類の治療方法における用途に有用である。一方、FcRn結合親和性が低減したFc変異体の半減期はより短いことが予想され、かかる分子は、短縮された循環時間が有利であり得る場合(例えばインビボ診断画像化用)、または開始ポリペプチドが循環中に長時間存在時に毒

40

50

性副作用を有する状況下で、例えば、哺乳類への投与にも有用である。FcRn 結合親和性が低減したFc変異体は胎盤と交差する可能性も低いため、妊娠女性が呈する疾患または障害の治療にも有用である。加えて、低減したFcRn 結合親和性が望まれ得る他の用途としては、脳、腎臓、および/または肝臓に局所化した用途が挙げられる。1つの例示的な実施形態では、改変された本発明のポリペプチドは、血管系から腎臓系球体上皮を通過する輸送の低減を示す。別の実施形態では、改変された本発明のポリペプチドは、脳から血液脳関門(BBB)を通過する脈管性間隙への輸送の低減を示す。1つの実施形態では、FcRn 結合の改変された結合ポリペプチドは、Fcドメインの「FcRn 結合ループ」内に1つ以上のアミノ酸置換を有するFcドメインを含む。FcRn 結合ループは、アミノ酸残基280~299位(EU番号付けに従う)を含む。他の実施形態では、FcRn 結合親和性が改変された本発明の結合ポリペプチドは、15 FcRn「接触ゾーン」内に1つ以上のアミノ酸置換を有するFcドメインを含む。本明細書で使用する、15 FcRn「接触ゾーン」という用語は、243~261位、275~280位、282~293位、302~319位、336~348位、367位、369位、372~389位、391位、393位、408位、424位、425~440位(EU番号付け)の残基を含む。好ましい実施形態では、FcRn 結合親和性が改変された本発明の結合ポリペプチドは、256位、277~281位、283~288位、303~309位、313位、338位、342位、376位、381位、384位、385位、387位、434位、および438位の任意の1つにアミノ酸置換を1つ以上有するFcドメインを含む。FcRn 結合活性が改変された例示的なアミノ酸置換については、PCT国際出願公開WO05/047327号(参照することにより本明細書に組み込まれる)に開示されている。

10

20

30

40

50

【0297】

他の実施形態では、本明細書に記載の診断および治療方法における使用のためのある結合分子の定常領域(例えば、IgG4重鎖定常領域)は、グリコシル化を低減または除去するために改変されている。例えば、本発明の結合ポリペプチドは、結合ポリペプチドのグリコシル化を改変するアミノ酸置換を含むFc変異体も含んでよい。例えば、前記Fc変異体は、低減したグリコシル化(例えば、N結合またはO結合グリコシル化)を有してもよいし、改変された野生型Fcドメインのグリコフォーム(例えば、フコースが少ないかフコースを含まないグリカン)を含んでもよい。かかる改変された形態を産生するために、かかるフコースが少ないかフコシル化形態の分子を、当技術分野で知られている代替細胞系を用いて作製することができる。1つの実施形態では、Fc変異体はフコシル化である。

【0298】

例示的な実施形態では、Fc変異体は、アミノ酸297位(EU番号付け)に通常見られるN結合型グリカンの低減したグリコシル化を含む。別の実施形態では、結合ポリペプチドは、グリコシル化モチーフ、例えば、アミノ酸配列NXTまたはNXSを含むN結合グリコシル化モチーフの近辺または中にアミノ酸置換を有する。特定の実施形態では、結合ポリペプチドは、アミノ酸228位または299位(EU番号付け)でアミノ酸置換したFc変異体を含む。さらにより特定の実施形態では、結合分子は、S228PおよびT299A変異(EU番号付け)を含むIgG4定常領域を含む。

【0299】

グリコシル化を低下させるか改変する例示的なアミノ酸置換については、PCT国際出願公開WO05/018572号(参照することにより本明細書に組み込まれる)に開示されている。好ましい実施形態では、本発明の結合分子は、グリコシル化を除去するように修飾される。かかる結合分子は、「agly」結合分子(例えば「agly」抗体)と呼び得る。理論に縛られないが、「agly」結合分子は改善されたインビボ安全性および安定性プロファイルを有し得ると考えられる。例示的なagly結合分子は、IgG4抗体のグリコシル化Fc領域(「IgG4.P」)を含み、これはFcエフェクター機能を欠き、したがってLTを発現する正常な重要臓器に対するFc介入毒性の可能性が除か

れる。特定の実施形態では、本発明の a g l y 結合分子は、当技術分野で知られているように I g G 4 . P または I g G 4 P E 定常領域を含んでよい。

【0300】

V. 結合分子の作製方法

周知のように、RNA は、標準的な技術（グアニジニウムイソチオシアネート抽出および沈殿、その後の遠心分離またはクロマトグラフィーなど）によりオリジナルのハイブリドーマ細胞からまたは他の形質転換細胞から単離することができる。所望の場合、mRNA は、標準的な技術（オリゴdTセルロース上のクロマトグラフィーなど）により総RNA から単離してよい。適切な技術は当技術分野において精通している。

【0301】

1つの実施形態では、本発明の結合分子の別々の鎖（例えば、抗体の軽鎖および重鎖）をコードするcDNAは、周知の方法に従い逆転写酵素およびDNAポリメラーゼを用いて同時に作製しても別々に作製してもよい。例えば、コンセンサス定常領域プライマーによって、またはより特異的なプライマーによって、公開DNAおよびアミノ酸配列に基づきPCRを開始してよい。上に論じたように、別々の結合分子鎖をコードするDNAクローンを単離するためにもPCRを用いてよい。この場合、ライブラリーをコンセンサスプライマーまたはより大きな相同プローブ（マウス定常領域プローブなど）によりスクリーニングしてよい。DNA（典型的には、プラスミドDNA）は、当技術分野で知られている技術を用いて、例えば、組換えDNA技術に関する前述の参考文献に詳細に説明されている標準的な、周知の技術に従い制限酵素マッピングおよび配列した細胞から単離してよい。勿論、DNAは、単離プロセスまたは続く分析中の任意の時点で本発明に従って合成してよい。本発明の結合分子を提供する単離された遺伝子物質の操作後、LT結合分子をコードするポリヌクレオチドを、典型的には、所望の量のLT結合分子を産生するために用い得る宿主細胞への導入用の発現ベクターに挿入する。

【0302】

結合分子、例えば、本明細書に記載の標的分子に結合する抗体（例えば、LT）の重鎖または軽鎖の組換え発現には、結合分子をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築を必要とする。本発明の結合分子（または鎖もしくはその一部）をコードするポリヌクレオチドがいったん得られたら、当技術分野において周知の技術を用いた組換えDNA技術により結合分子産生用ベクターを産生してよい。したがって、ヌクレオチド配列をコードする結合分子を含むポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を調製する方法は、本明細書に記載している。当業者に周知である方法を用いて、結合分子コード配列ならびに適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えが挙げられる。したがって、本発明は、本発明の結合分子をコードするヌクレオチド配列、またはその鎖もしくはドメインを含み、プロモーターに作動可能に連結した複製できるベクターを提供する。かかるベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでよく（例えば、PCT公開WO86/05807号；PCT公開WO89/01036号；および米国特許第5,122,464号を参照されたい）、結合分子（またはその鎖もしくはドメイン）をコードするヌクレオチドは、完全結合分子の発現のためかかるベクターにクローン化してよい。

【0303】

本発明の結合分子が二量体である場合、宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクターである、第一ポリペプチド単量体をコードする第一ベクターと第二ポリペプチド単量体をコードする第二ベクターとをコトランスフェクトしてよい。2つのベクターは、単量体の同等の発現を可能とする同一選択可能マーカーを含んでよい。あるいは、単量体の両方をコードする単一ベクターを用いてよい。実施形態では、単量体は抗体軽鎖および重鎖であり、軽鎖は、重鎖の前に有利に置かれて過剰な毒性遊離重鎖を避ける（Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)）。結合分子の単

10

20

30

40

50

量体のためのコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含んでよい。本明細書で使用する「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、宿主細胞内に導入し、そこで所望の遺伝子を発現させるためのビヒクルとして本発明により使用されるベクターを意味する。当業者に知られているように、かかるベクターはプラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスからなる群から容易に選択し得る。通常、本発明と適合するベクターは、選択マーカー、所望の遺伝子のクローニングおよび真核生物もしくは原核生物細胞への進入および／もしくは複製能を促進する適切な制限部位を含む。

【0304】

本発明の目的のために、多数の発現ベクター系を用いてよい。例えば、ベクターのあるクラスは、動物ウイルス（ウシ乳頭腫ウイルス、ポリオマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（RSV、MMTVまたはMOMLV）またはSV40ウイルスなど）由来のDNA因子を用いる。他は、配列内リボソーム結合部位を有する多シストロン系の使用に關与する。さらに、トランスフェクトした宿主細胞の選択を可能とする1つ以上のマーカーを導入することにより、DNAを染色体中に統合した細胞を選択してよい。このマーカーにより、栄養要求性宿主に対する原栄養性、殺生物剤耐性（例えば、抗生剤）または重金属（銅など）耐性が得られる場合がある。選択可能なマーカー遺伝子は、DNA配列に直接結合して発現させることもでき、同時形質転換により同じ細胞に導入することもできる。追加要素もmRNAの至適合成のために必要な場合がある。これらの要素としては、シグナル配列、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終止シグナルを挙げ得る。特に好ましい実施形態では、上に論じたように、重鎖および軽鎖定常領域遺伝子（好ましくはヒト）合成とあわせて、クローン化可変領域遺伝子を発現ベクターに挿入する。1つの実施形態では、これは、NEOSPLAと呼ばれるBiogen Inc. 専売の発現ベクターを用いて成し遂げる（米国特許第6,159,730号に開示されている）。このベクターは、サイトメガロウイルスプロモーター／エンハンサー、マウスベータグロビン主要プロモーター、複製のSV40起点、ウシ増殖ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン1およびエクソン2、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子およびリーダー配列を含む。このベクターは、可変および定常領域遺伝子の取込時、CHO細胞へのトランスフェクション時、その後のG418含有培地およびメトトレキサート増幅の選択時に抗体を非常に高レベル発現することが見出されている。勿論、本発明には、真核細胞中で発現させることができるいかなる発現ベクターを使用してもよい。適切なベクターの例としては、プラスミドp cDNA3、p HCMV / Zeo、p CR3.1、p EF1 / His、p IND / GS、p Rc / HCMV2、p SV40 / Zeo2、p TRACER - HCMV、p UB6 / V5 - His、p VAX1、およびp ZeoSV2（Invitrogen, San Diego, CAから入手可能）、およびプラスミドp CI（Promega, Madison, WIから入手可能）が挙げられるが、これらに限定されない。通常、多数の形質転換細胞に対する免疫グロブリン重鎖および軽鎖にて適切に高レベル発現するもののスクリーニングは、（例えば、ロボット系により）実施できる通例の実験である。ベクター系は、米国特許第5,736,137号および同第5,658,570号（それぞれ、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる）にも教示されている。この系により、高い発現レベル、例えば、30 pg / 細胞 / 日超が得られる。他の例示的なベクター系については、例えば、米国特許第6,413,777号に開示されている。

【0305】

他の好ましい実施形態では、本発明の結合分子は、米国特許公開第2003-0157641 A1号（2002年11月18日出願）（その全体は本明細書に組み込まれる）に開示されたものなど、多シストロン性構築物を用いて発現し得る。これらの新規発現系において、目的の複数の遺伝子生産物（抗体の重鎖および軽鎖など）を単一の多シストロン性構築物から産生し得る。これらの系は、配列内リボソーム進入部位（IRES）を有利に用いて、真核宿主細胞内のそのLT結合分子を比較的高レベルで得る。適合するIR

10

20

30

40

50

ES配列については、米国特許第6,193,980号(これも本明細書に組み込まれる)に開示されている。かかる発現系を用いて本出願に開示の全範囲のLT結合分子を効果的に産生し得ることを、当業者は理解するであろう。

【0306】

より一般的に、LT結合分子の単量体サブユニットをコードするベクターまたはDNA配列をいったん調製したら、発現ベクターを適切な宿主細胞に導入してよい。プラスミドの宿主細胞への導入は、当業者に周知の様々な技術により成し遂げることができる。これらの技術としては、トランスフェクション(電気泳動および電気穿孔を含む)、原形質融合、リン酸カルシウム沈殿、封入DNAとの細胞融合、微量注入、およびインタクトウイルス感染が挙げられるが、これらに限定されない。Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Chapter 24.2, pp. 470-472 (1988)を参照されたい。典型的には、宿主へのプラスミド導入は、電気穿孔を介す。発現構築物を持つ宿主細胞は、結合分子の産生に適した状態で増殖し、結合分子の合成についてアッセイした。例示的なアッセイ技術としては、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、または蛍光活性化細胞選別器分析(FACS)、免疫組織化学などが挙げられる。

10

【0307】

従来の技術により発現ベクターを宿主細胞に移し、次いでトランスフェクトした細胞を従来の技術により培養して、本明細書に記載の方法に使用する結合分子を産生する。したがって、本発明は、本発明の結合分子、またはその単量体もしくは鎖をコードするポリヌクレオチドを含む、異種のプロモーターに作動可能に連結した宿主細胞を含む。二重鎖または二量体結合分子の発現のために好ましい実施形態では、結合分子鎖を別々にコードするベクターは、以下に詳述するように、完全結合分子の発現のため宿主細胞中で共発現し得る。

20

【0308】

本明細書で使用する「宿主細胞」とは、組換えDNA技術を用いて構築したベクターを持ち、異種の遺伝子を少なくとも1つコードする細胞を指す。組換え宿主から結合分子を単離するプロセスの説明において、「細胞」および「細胞培養」という用語は、他に明確に指示されない限り、結合分子源と同義的に使用される。言い換えると、「細胞」からのポリペプチドの回復とは、遠沈した完全細胞から、または培地と細胞浮遊液の両方を含む細胞培養からのいずれかを意味し得る。

30

【0309】

本明細書に記載の方法における使用用に結合分子を発現するために、様々な宿主発現ベクター系を用いてよい。かかる宿主発現系は、目的のコード配列を産生し、続いて精製し得るビヒクルを表すが、適切なヌクレオチドコード配列と形質転換時またはトランスフェクト時に本発明の抗体分子をin situ発現し得る細胞も表す。これらとしては、結合分子コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAもしくはコスミドDNA発現ベクターと形質転換した細菌(例えば、大腸菌(E. coli)、枯草菌(B. subtilis))などの微生物; 結合分子コード配列を含む組換え酵母発現ベクターと形質転換した酵母(例えば、サッカロミセス属(Saccharomyces)、ピキア属(Pichia)); 結合分子コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染させた昆虫細胞系; 結合分子コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイク病ウイルス、TMV)と感染させたか、もしくは組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)と形質転換した植物細胞系; または哺乳類細胞ゲノム(例えば、メタロチオネインプロモーター)もしくは哺乳類ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーター; ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)由来のプロモーターを含む組換え発現構築物を持つ哺乳類細胞系(例えば、COS、CHO、BLK、293、3

40

50

T3細胞)が挙げられるが、これらに限定されない。組換え結合分子の発現のために、好ましくは、細菌細胞(大腸菌(*Escherichia coli*)など)、より好ましくは、真核細胞が、特に完全な組換え結合分子の発現のために使用される。例えば、ベクター(ヒトサイトメガロウイルス由来の主要な最初期遺伝子プロモーター要素など)と連結した哺乳類細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)など)は、抗体および他の結合分子の効果的な発現系である(Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990))。

【0310】

タンパク質発現のために使用する宿主細胞系は、哺乳類由来であることが多い；そこで発現する、所望の遺伝子生産物に最も適した特定の宿主細胞系を選択的に決定する能力が当業者にはあると考えられる。例示的な宿主細胞系としては、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)、DG44およびDUXB11(チャイニーズハムスター卵巣系、DHFR(-))、HELA(ヒト頸癌)、CVI(サル腎臓系)、COS(SV40T抗原とのCVI誘導体)、VERY、BHK(ベビーハムスター腎臓)、MDCK、293、WI38、R1610(チャイニーズハムスター線維芽細胞)BALBC/3T3(マウス線維芽細胞)、HAK(ハムスター腎臓系)、SP2/O(マウス骨髓腫)、P3x63-Ag3.653(マウス骨髓腫)、BFA-1c1BPT(ウシ内皮細胞)、RAJI(ヒトリンパ球)および293(ヒト腎臓)が挙げられるが、これらに限定されない。CHO細胞が特に好ましい。宿主細胞系は、典型的には、市販のサービスであるAmerican Tissue Culture Collectionまたは公開文献から入手可能である。加えて、挿入した配列の発現を調整するか、または遺伝子生産物を所望の特異方法で修飾およびプロセスする宿主細胞株を選択し得る。タンパク質生産物のかかる修飾(例えば、グリコシル化)およびプロセッシング(例えば、切断)はタンパク質機能にとって重要であり得る。異なる宿主細胞がタンパク質および遺伝子生産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的かつ特異的な機序を有する。正しい修飾および発現した外来タンパク質のプロセッシングを確実にするために適切な細胞系または宿主系を選別できる。この目的のため、主要転写物の適切なプロセッシング、遺伝子生産物のグリコシル化、およびリン酸化の細胞機構を所有する真核宿主細胞を用いてよい。

【0311】

組換えタンパク質の長期、大量生産のために、安定した発現が好ましい。例えば、結合分子を安定的に発現する細胞系を遺伝子操作してよい。宿主細胞は、ウイルス複製起点を含む発現ベクターを用いてではなく、適切な発現制御要素(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写終結部位、ポリアデニル化部位など)により制御されたDNA、および選択マーカーにより形質転換できる。外来DNA導入後、遺伝子操作された細胞は1~2日間栄養強化培地において増殖が可能であり得、次いで選択培地に変更される。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択物に耐性を付与し、細胞がそれらの染色体中にプラスミドを安定的に統合することを可能とし、増殖して次にクローン化できる病巣を形成して、細胞系内に拡大する。この方法を有利に用いて、結合分子を安定的に発現する細胞系を遺伝子操作してよい。

【0312】

単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992))が挙げられるが、これらに限定されないいくつかの選択系を用いてよく、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., Cell 22:817 (1980))遺伝子をそれぞれtk、hgprtまたはaprt細胞に使用できる。また、抗代謝物質耐性を以下の遺伝子選択の基礎として使用できる。メトトレキサート耐性を付与するdhfr(Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980))

); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); ミコフェノール酸耐性を付与する gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); アミノグリコシド G-418 耐性を付与する neo (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshchev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:513-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); および Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIB TECH 11(5): 155-215 (May, 1993); およびハイグロマイシン耐性を付与する hygro (Santerre et al., Gene 30:147 (1984))。当技術分野において一般に知られている使用できる組換え DNA 技術方法については、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); および Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981) (これらは、それらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0313】

結合分子の発現レベルは、ベクター増幅により高められ得る (総論については、Bebington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987) を参照されたい)。結合分子を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能な場合、宿主細胞培養物中に存在する阻害剤レベルの上昇は、マーカー遺伝子のコピー数を増加させる。増幅された領域は結合分子と関連するため、結合分子の産生もまた増大する (Crouse et al., Mol. Cell Biol. 3:257 (1983))。

【0314】

インビトロ産生は拡大して大量の所望のポリペプチドを得ることが可能である。組織培養条件下の哺乳類細胞培養技術は、当技術分野で知られており、同種懸濁培養 (例えばエアリフト型リアクタ中または連続攪拌リアクタ中)、または固定化もしくは封入細胞培養 (例えば中空繊維中、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズ上またはセラミック薬包上) が挙げられる。必要な場合および/または所望の場合、ポリペプチド溶液が慣例のクロマトグラフィー方法 (例えばゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE セルロース上のクロマトグラフィーまたは (免疫) 親和性クロマトグラフィー) により、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的な生合成後または本明細書に記載の HIC クロマトグラフィー工程の前もしくは後に精製できる。

【0315】

本発明の LT 結合分子をコードする遺伝子は、非哺乳類細胞 (細菌または昆虫または酵母菌または植物細胞など) にも発現できる。核酸を容易に取り込む細菌としては、腸内細菌科メンバー (大腸菌 (*Escherichia coli*) またはサルモネラ (*Salmonella*) 株など); 枯草菌 (*Bacillus subtilis*); 肺炎球菌 (*Pneumococcus*); 連鎖球菌 (*Streptococcus*)、およびイン

フルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) など) が挙げられる。異種のポリペプチドは、細菌中に発現時、典型的には、封入体の一部となることがさらに理解されるであろう。異種のポリペプチドは、単離、精製してから、機能的分子中に集合させなければならない。四価形態の結合分子を所望の場合、サブユニットを四価結合分子 (例えば四価抗体 (WO 02/096948 A 2 号)) 中に自己集合する。

【0316】

細菌系において、いくつかの発現ベクターは、発現している結合分子のために意図された使用に応じて有利に選択し得る。例えば、結合分子の医薬組成物生成のためにかかるタンパク質が大量に産生される場合、高い発現レベルの融合タンパク質生産物を対象とし容易に精製されるベクターが所望され得る。かかるベクターとしては、融合タンパク質が産生されるように、結合分子コード配列が個々に *lacZ* コーディング領域を有するフレーム中でベクターにライゲーションされ得る大腸菌 (*E. coli*) 発現ベクター *pUR278* (Rutherford et al., *EMBO J.* 2:1791 (1983)); *pIN* ベクター (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985)); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)); などが挙げられるが、これらに限定されない。外来ポリペプチドを発現するために、*pGEX* ベクターをグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (*GST*) との融合タンパク質として使用し得る。通常、かかる融合タンパク質は可溶性であり、遊離グルタチオンの存在下で、マトリックスグルタチオンアガロースビーズへの吸着および結合、その後の溶離により溶解細胞から容易に精製できる。*pGEX* ベクターは、クローン化された標的遺伝子生産物が *GST* 部分から放出できるように、トロンピンまたは *Xa* 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0317】

原核生物に加えて、真核微生物も使用してよい。サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) つまり一般的パン酵母は、真核微生物の間で最も一般的に使用されているが、他のいくつかの菌株、例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) も一般に利用可能である。

【0318】

サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) 内での発現のためには、例えば、プラスミド *YRp7* (Stinchcomb et al., *Nature* 282:39 (1979)); Kingsman et al., *Gene* 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene* 10:157 (1980)) が一般的に使用されている。このプラスミドは既に、例えば *ATCC* 寄託番号 44076 または *PEP4-1* といったようなトリプトファン内で増殖する能力を欠く酵母の変異菌株のための選択マーカーを提供する *TRP1* 遺伝子を含む (Jones, *Genetics* 85:12 (1977))。このとき、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としての *trp1* 病変の存在は、トリプトファンの不在下での増殖による形質転換を検出するために効果的な環境を提供する。

【0319】

昆虫系において、キンウワバ科 (*Autographa californica*) 核多角体ウイルス (*AcNPV*) は、典型的には、ベクターとして外来遺伝子を発現させるために使用される。ウイルスは、スポドプテラ・フルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞中で増殖する。抗体コード配列はウイルスの非必須領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) 中に個々にクローン化し得、および *AcNPV* プロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の制御下に置かれる。

【0320】

本発明の結合分子は、いったん組換えで発現したら、結合分子の精製のため当技術分野で知られている任意の方法、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、親和性、特にタンパク質 A の後に特異的な抗原に対する親和性により、およびサイズ排除カラム

10

20

30

40

50

クロマトグラフィー)、遠心分離、吸収率較差溶解度、またはタンパク質精製のための他の任意の標準的な技術により精製し得る。あるいは、本発明の結合分子(例えば抗体)の親和性を増大する好ましい方法は、米国特許公開第2002 0123057 A1号に開示されている。

【0321】

VI. LTに結合する結合分子を含む組成物を用いた治療方法

本発明の1つの実施形態では、抗LT結合分子の投与から恩恵を受けるであろう対象の治療方法を提供し、この方法は本明細書に記載の有効量の本発明の結合分子または組成物を動物に投与することを含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

【0322】

1つの実施形態では、本発明の結合分子を、炎症を伴う障害または自己免疫性反応を呈する対象に投与する。1つの実施形態では、本発明の結合分子を、癌を呈する対象に投与する。

【0323】

例示的な炎症または自己免疫性障害としては、臓器特異的な疾患(すなわち、免疫反応が1つの臓器系(内分泌系、造血系、皮膚、心肺系、胃腸および肝系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経系など)を特異的に指向する)または複数の臓器系に影響を与え得る全身疾患(例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ、多発性筋炎など)が挙げられる。1つの実施形態では、本発明の結合分子による治療のための自己免疫性または炎症障害は、異所性リンパ系徴候を有するものである。

【0324】

例示的な自己免疫性または炎症疾患としては、例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、ループス(SLEおよびループス腎炎など)、多発性筋炎/皮膚筋炎、低温型グロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群、および乾癬性関節炎)、自己免疫性胃腸および肝障害(例えば、炎症性腸疾患(例えば、潰瘍性大腸炎およびクローン病)、自己免疫性胃炎および悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、およびセリアック病など)、血管炎(例えば、ANCA陰性血管炎およびANCA関連血管炎、チャグストラウス血管炎、ヴェグナー肉芽腫症、および顕微鏡的多発性血管炎などを含む)、自己免疫性神経障害(例えば、多発性硬化症(MS)、RRMS、SPMS、眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、および自己免疫性多発神経障害など)、腎障害(例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、およびベルガー病など)、自己免疫性皮膚障害(例えば、乾癬、蕁麻疹(urticaria)、蕁麻疹(hives)、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および皮膚エリテマトーデスなど)、血液障害(例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後紫斑病、および自己免疫性溶血性貧血など)、アテローム性動脈硬化症、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患(例えば、内耳疾患および聴力低下など)、ベーチェット病、レイノー症候群、皮膚筋炎、臓器移植、および自己免疫性内分泌障害(例えば、糖尿病関連自己免疫性疾患(インスリン依存性糖尿病(IDDM)など)、アジソン病、および自己免疫性甲状腺疾患(例えば、グレーブス病および甲状腺炎)など)が挙げられる。より好ましいかかる疾患としては、例えば、RA、IBD(クローン病および潰瘍性大腸炎を含む)、ANCA関連血管炎、ループス、MS、シェーグレン症候群、グレーブス病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎、および糸球体腎炎が挙げられる。さらにより好ましいものは、RA、IBD、ループス、およびMSであり、より好ましいものはRAおよびIBDであり、最も好ましいものはRAである。

【0325】

例示的な非自己免疫性適応としては、濾胞性リンパ腫、アテローム性動脈硬化症、ウイルス誘発性肝炎、気管支喘息、およびウイルス性ショック症候群が挙げられる。

【0326】

1つの実施形態では、主題の結合分子は、関節リウマチ治療に使用される。本明細書で使用する「関節リウマチ」または「RA」とは、RA分類のためのAmerican R

10

20

30

40

50

heumatoid Association基準2000年改訂版、または任意の類似の基準に従い診断し得る、認識されている疾患状態を指し、以下に定義する活動性、初期、および初発性RAを含む。RAの生理的指標としては、対称性の関節腫脹が挙げられるが、それは関節リウマチにおいて特徴的であるが不変ではない。手の近位指節間（PIP）関節、ならびに中手指節関節（MCP）、手首、肘、膝、足首および中足指節（MTP）関節の紡錘状腫脹を通常発症しており、腫脹は容易に検出される。受動運動時の疼痛は、関節炎症に対して最も感度の高い試験であり、炎症および構造的な変形は、罹患している関節の可動域を制限することが多い。典型的な目に見える変化としては、MCP関節における指の尺側偏位、MCPおよびPIP関節の過伸展または過屈曲、肘の屈曲拘縮、ならびに手根骨および足指の垂脱臼が挙げられる。RAを呈する対象は、症状を治療する際にDMARDが有効ではないか、または完全に有効ではないという点においてDMARDに対して抵抗性であり得る。

10

【0327】

1つの実施形態では、本発明による療法の候補者として、TNF阻害剤による過去または現在の治療が十分に奏効していない者が挙げられる。

【0328】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、活動性関節リウマチの治療に使用される。「活動性関節リウマチ」患者とは、活動性であって潜伏性ではないRA症状を呈する患者を意味する。「初期活動性関節リウマチ」を呈する対象は、RA分類のためのACR基準1987年改訂版に従い少なくとも8週間かつ4年以下、活動性RAと診断されている対象である。「初期関節リウマチ」を呈する対象は、RA分類のためのACR基準1987年改訂版に従い少なくとも8週間かつ4年以下、RAと診断されている対象である。初期RAとしては、例えば、若年発症RA、若年性特発性関節炎（JIA）、または若年性RA（JRA）が挙げられる。

20

【0329】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、初発性関節リウマチの治療に使用される。「初発性RA」患者は、RA診断のためのACR基準を完全に満たしてはいないが、RA特異的な予後生物マーカー（抗CCPおよび共有エピトープなど）の存在と関連している初期多発性関節炎を呈する。それらの患者としては、多発性関節炎を呈するが、まだRAと診断されておらず、公式ACR基準RAを発現するリスクが高い（95%の可能性）抗CCP抗体陽性患者が挙げられる。

30

【0330】

「関節損傷」とは、最も広義に使用され、1つ以上の関節（結合組織および軟骨を含む）の任意の部分に対する損傷または部分的もしくは完全な破壊を指し、ここで損傷は任意の原因による構造的および/または機能的損傷を含み、関節の疼痛/関節痛を引き起こしていてもいなくてもよい。関節損傷としては、炎症性関節疾患に関連するか炎症性関節疾患に続発する関節損傷、ならびに非炎症性関節疾患に関連するか非炎症性関節疾患に続発する関節損傷が挙げられるが、これらに限定されない。この損傷は、任意の状態（自己免疫性疾患など、特に関節炎、最も特にRA）により惹起され得る。例示的なかかる状態（急性および慢性関節炎を含む）としては、RA（若年発症RAを含む）、若年性特発性関節炎（JIA）、または若年性RA（JRA）、および病期（リウマチ滑膜炎など）、痛風もしくは痛風関節炎、急性免疫性関節炎、慢性炎症性関節炎、変性関節症、II型コラーゲン誘発関節炎、感染性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、スチル病、脊椎関節炎、骨関節炎、慢性進行性関節炎、変形性関節炎、原発性慢性多発性関節炎、反応性関節炎、更年期関節炎、エストロゲン欠乏性関節炎、および強直性脊椎炎/リウマチ性脊椎炎）、RA以外のリウマチ性自己免疫性疾患、ならびにRAに続発する著しい全身性関連（血管炎、肺線維症またはフェルティ症候群）が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書の目的において、関節とは（動物などの脊椎動物の）骨格因子間で骨格因子を取り囲んで支える部分の接触点であり、例えば、腰、脊椎間の関節、背骨と骨盤間の関節（仙腸関節）、腱と靱帯が骨に結合する関節、肋骨と背骨間の

40

50

関節、肩、膝、足、肘、手、指、足首、および足指、特に両手両足の関節が挙げられるが、これらに限定されない。

【0331】

1つの実施形態では、対象は、障害を治療するための免疫抑制剤（1種または複数）などの薬剤（1種または複数）治療歴が一度もなく、特定の実施形態では、TNFアンタゴニスト治療歴が一度もない。代替的な実施形態では、対象は、障害を治療するための、（TNFアンタゴニストを含む）薬剤（1種または複数）治療歴がある。

【0332】

なおさらなる態様では、患者は障害を再発している。代替的な実施形態では、患者は障害を再発していない。

【0333】

別の態様では、本明細書の抗体は、障害を治療するために対象に投与する唯一の薬剤である。代替的な態様では、本明細書の結合分子は、障害を治療するために使用する薬剤の1つである。

【0334】

さらなる態様では、対象は自己免疫性障害としてRAのみ呈する。

【0335】

あるいは、対象は自己免疫性障害としてMSのみ呈する。さらに代替的に、対象は自己免疫性障害としてループス、またはANCA関連血管炎、またはシェーグレン症候群のみ呈する。

【0336】

VIII. 医薬組成物および投与方法

LT特異的な結合分子の調製およびそれを必要としている対象への投与方法は、当業者に周知であるかまたは当業者により容易に決定される。結合分子の投与経路は、例えば、経口、非経口（吸入または局所による）であってよい。本明細書で使用する、非経口という用語は、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸または腔投与を含む。これらの投与形態はすべて、本発明の範囲内であることを明確に意図し、投与形態は注射液、特に静脈内または動脈内の注射または点滴用である。通常、注射用に適した医薬組成物は、緩衝液（例えば酢酸、リン酸またはクエン酸緩衝液）、界面活性剤（例えばポリソルベート）を含んでよく、任意に安定剤（例えばヒトアルブミン）などを含んでよい。しかしながら、本明細書における教示と適合する他の方法によっても結合分子を有害な細胞集団部位に直接送達すること、それによって治療薬に対する疾患組織の曝露を増大することができる。

【0337】

非経口投与のための調製物としては、滅菌水溶液もしくは滅菌非水溶液、懸濁液、および乳剤が挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（オリーブ油など）、および注入可能有機エステル（オレイン酸エチルなど）である。水性担体としては、水、アルコール/水溶液、乳剤または懸濁液が挙げられ、それらには生理食塩水および緩衝液が含まれる。主題の本発明において、医薬上許容可能な担体としては、0.01～0.1Mリン酸緩衝液、好ましくは0.05Mリン酸緩衝液または0.8%生理食塩水が挙げられるが、これらに限定されない。他の一般的な非経口ビヒクルとしては、リン酸ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液、または不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養物補充液及び電解質補充液（リンガーデキストロースに基づくものなど）などが挙げられる。保存剤および他の添加剤（例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなど）も存在してよい。

【0338】

さらに特に、注入のための使用に適した医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性）、または滅菌注射液もしくは分散液の即時調製用の分散液および滅菌粉末を含む。かかる場合において、組成物は滅菌でなければならず、容易に注射器に入る程度に流体であるべきである

10

20

30

40

50

。製造および保存状況下において安定し、好ましくは微生物（細菌および真菌など）の汚染活動から保護される。担体は、例えば、水、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、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散培地であることができる。適切な流動性は、例えば、コーティング（レシチンなど）の使用により、分散の場合、必要な粒子サイズを維持することにより、および界面活性剤の使用により維持できる。本明細書で開示する治療方法における使用に適した製剤については、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16th ed. (1980)に記載されている。

【0339】

微生物の活動の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより成し遂げることができる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖類、多価アルコール（マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムなど）を含めることが好ましい。注入可能な組成物の持続性吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることにより引き起こすことができる。

【0340】

いずれの場合も、滅菌注射液は、本明細書に列挙した成分の1つまたは組み合わせと適切な溶媒中に必要量の活性化化合物（例えば、本発明の結合分子）を組み込み、必要に応じて、その後に滅菌濾過することにより調製できる。一般に、分散液は、塩基性分散培地および上に列挙した他の必要成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むことにより調製する。滅菌注射液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより活性成分と、先に滅菌濾過したその溶液由来の任意のさらなる所望の成分との粉末が得られる。注射用調製物は、当技術分野で知られている方法に従い、プロセス化し、容器（アンプル、袋、瓶、シリンジまたはバイアルなど）中に充填し、無菌状態で密封する。さらに、調製物はパッケージ化してキット形態で販売し得る（同時係属出願US 2009/0259,337号（米国特許第2002-0102208 A1号）（その全体を参照することにより本明細書に組み込まれる）に記載されているものなど）。かかる製品には好ましくは関連する組成物が自己免疫性または腫瘍性障害を呈するかまたは呈しやすい対象を治療するために有用であることを示すラベルが貼られるか、または添付文書が付随する。

【0341】

本明細書に記載の過剰増殖障害治療のための本発明の組成物の有効量は、多くの異なる要因（投与方法、対象部位、患者の生理状態、患者がヒトであるか動物であるか、他剤を投与されているかどうか、および処置が予防的であるか治療的であるかなど）によって異なる。通常、患者はヒトであるが、非ヒト哺乳類（トランスジェニック哺乳類を含む）も治療できる。治療投与量は、安全性および有効性を至適化するために、当業者に知られている通例の方法を用いて滴定してよい。

【0342】

抗体またはその断片による過剰増殖障害の治療において、投与量は、例えば、約0.0001~100mg/kg、より通常は0.01~5mg/kg（例えば、0.02mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kgなど）の宿主体重の範囲であることができる。例えば投与量は1mg/kg体重または10mg/kg体重または1~10mg/kg体重の範囲内であることができる、好ましくは少なくとも1mg/kgである。上記範囲の中間用量も本発明の範囲内であることを意図する。対象はかかる用量を連日、隔日、週1回または経験的分析により決定された他の任意のスケジュールに従い投与できる。例示的な治療は、複数回、長期間（例えば、少なくとも6ヶ月間）にわたる投与を伴う。さらなる例示的な治療計画は、2週間に1回または1ヶ月に1回または3~6ヶ月ごとに1回の投与を伴う。例示的な投与量スケジュールとしては、1~10mg/kgまたは15mg/kg連日、30mg/kg隔

日または60mg/kg週1回が挙げられる。いくつかの方法では、異なる結合特異性の2つ以上のモノクローナル抗体を、投与した各抗体の用量が指定範囲内に収まる場合、同時に投与する。

【0343】

本明細書に開示されたLT特異的な結合分子は、複数の場合において投与できる。各投与の間隔は週1回、月1回または年1回にできる。間隔は、適応があれば、患者における標的ポリペプチドまたは標的分子の血中レベルの測定により不規則にすることもできる。いくつかの方法では、投与量は、血漿ポリペプチド濃度を1~1000µg/mlに達するように、いくつかの方法では25~300µg/mlに達するように調整する。あるいは、結合分子は、低頻度の投与が要される場合、徐放性製剤として投与できる。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期により異なる。結合分子の半減期は、安定したポリペプチドまたは部分、例えば、アルブミンまたはPEGとの融合を介して延長することもできる。通常、ヒト化抗体は最長の半減期を示し、その後キメラ抗体および非ヒト抗体と続く。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、非複合形態で投与できる。別の実施形態では、結合分子は、本明細書に開示された方法における使用のために複合形態で複数回投与できる。さらに別の実施形態では、本発明の結合分子は、非複合形態で投与してから複合形態で投与することもでき、逆順で投与することもできる。

10

【0344】

投与量および投与頻度は、処置が予防的であるのか治療的であるのかによっても変わり得る。予防用途の場合、抗体またはその混合物を含む組成物を、まだその疾患の症状を呈していない患者か、または前症状患者に投与し、患者の抵抗力を高める。かかる量を「予防的有効量」と定義する。本用途でも、正確な量は、患者の健康状態および全身の免疫状態によってやはり変わるが、一般に1回の投与あたり0.1~25mgの範囲であり、特に、1回の投与あたり0.5~2.5mgの範囲である。長期間にわたって、比較的低用量を比較的低頻度の間隔で投与する。一部の患者は、残りの生涯ずっと治療を受け続ける。

20

【0345】

治療用途の場合、比較的高用量（例えば、結合分子（例えば、抗体）を1回の投与あたり約1~400mg/kg、放射性免疫結合体の場合、5~25mg、細胞毒と薬物の複合分子の場合には、これより多い量が一般に使用される）を比較的に短い間隔で、疾患進行が遅くなるか、または抑えられるまで、好ましくは、患者が疾患症状の部分的または完全な改良を示すまで必要とされる場合がある。その後、予防計画に沿って患者に投与できる。

30

【0346】

1つの実施形態では、対象を、LT特異的な抗体またはその免疫特異的な断片をコードする核酸分子（例えば、ベクター中にある）で治療できる。ポリペプチドをコードする核酸の用量範囲は、患者あたり、約10ng~1g、100ng~100mg、1µg~10mg、または30~300µgのDNAである。感染ウイルスベクターの用量範囲は、1回の投与あたり、10~100ビリオンまたは100ビリオン超である。

40

【0347】

治療薬を、予防的および/または治療的処置のため、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内または筋肉内に投与できる。いくつかの方法では、LT-Rを発現する細胞が集まっている特定の組織に薬剤を直接、例えば、頭蓋内注射により注射する。抗体を投与する場合、筋肉内注射または静脈内注射が好ましい。いくつかの方法では、特定の治療用抗体を、頭蓋に直接注射する。いくつかの方法では、抗体を徐放性組成物または徐放性機器（Medipad（商標登録）機器など）として投与する。

【0348】

LT結合分子は、任意に、（例えば、予防的または治療的）処置を必要としている障害または状態を治療する上で有効な他の薬剤と併用して投与できる。

【0349】

50

本開示の範囲内を維持しつつ、本発明のLT特異的結合分子を上記の処置方法に従い、治療的または予防的効果を得るために十分な量でヒトまたは他の動物に投与してよい。本発明のLT特異的抗体結合分子は、本発明の抗体を既知の技術に従い従来の医薬上許容可能な担体または希釈液と混合して調製した従来の投与形態でかかるヒトまたは他の動物に投与できる。医薬上許容可能な担体または希釈液の形態および特性は、混合する活性分量、投与経路および他の周知の変数により決定されることを、当業者は認識するであろう。さらに、本発明による結合分子の1つ以上の種を含む混合物が特に効果的であることが証明され得ることを、当業者は理解するであろう。

【0350】

本発明の実践には、別段の指定のない限り、当技術分野の技能内である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を使用する。かかる技術は、文献中で十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), DNA Cloning, D. N. Glover ed., Volumes I and II (1985); Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait ed., (1984); Mullis et al. 米国特許第4,683,195号; Nucleic Acid Hybridization, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Transcription And Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, (1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology, Academic Press, Inc., N.Y.; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, Mayer and Walker, eds., Academic Press, London (1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., (1986); Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)を参照されたい。

【0351】

抗体工学の一般的原理については、Antibody Engineering, 2nd edition, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995)に説明されている。タンパク質工学の一般

的原理については、Protein Engineering, A Practical Approach, Rickwood, D., et al., Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995)に説明されている。抗体および抗体ハプテン結合の一般的原理については、Nisonoff, A., Molecular Immunology, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984);およびSteward, M.W., Antibodies, Their Structure and Function, Chapman and Hall, New York, NY (1984)に説明されている。さらに、当技術分野で知られており具体的な記載のない免疫学における標準的な方法は、一般に、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al. (eds), Basic and Clinical - Immunology (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) and Mishell and Shiigi (eds), Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., New York (1980)に従う。

10

【0352】

免疫学の一般的原理を説明する標準的な参考資料としては、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination, John Wiley & Sons, New York (1982); Kennett, R., et al., eds., Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" in Burden, R., et al., eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984), Kuby Immunology 4th ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt and Barbara A. Osborne, H. Freeman & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. and Male D., Immunology 6th ed. London: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. and Lichtman, A., Cellular and Molecular Immunology Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann and Dubel, Antibody Engineering, Springer Verlag (2001); Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, Genes VIII, Prentice Hall (2003); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach and Dveksler, PCR Primer Cold Spring Harbor Press (2003)が挙げられる。

20

30

40

【0353】

上に引用した参考文献のすべて、ならびに本明細書に引用した参考文献のすべてが、そ

50

これらの全体を参照することにより本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0354】

(実施例1)

抗リンホトキシン抗体のクローニング

ヒトリンホトキシン(LT)に対するマウスモノクローナル抗体(mAb)を、ビーズ上に存在するLT 1 2をマウスに注射することにより調製した。当技術分野で認識されている技術を用いて(抗myc抗体を用いてまたはビーズ表面に対するCnBr固定を介して)、LT 1 2をビーズに結合した。

【0355】

Qiagen RNeasyミニキットを製造業者の推奨プロトコールに従って用いて、マウスハイブリドーマ細胞から総細胞RNAを調製した。第一鎖cDNAのプライミングのため無作為六量体を用いて、RT-PCRにより、重鎖および軽鎖の可変領域をコードするcDNAを総細胞RNAからクローン化した。インタクトシグナル配列によるマウス免疫グロブリン可変ドメインのPCR増幅のため、退化順行プライマーの混合物を、複数のマウス免疫グロブリン遺伝子ファミリーシグナル配列およびマウス定常ドメインの5末端に特異的な単一の逆行プライマーにハイブリッドする。PCRには、Clontech Advantage 2 Polymerase混合物を製造業者の推奨プロトコールに従って用いた。PCR生産物をゲル精製し、InvitrogenのpCR2.1TOPOベクター中に、製造業者の推奨プロトコールに従って、InvitrogenのTOPOクローニングキットを用いてサブクローン化した。複数の独立したサブクローン由来の挿入物を配列してコンセンサス配列を確立した。推定成熟免疫グロブリンN末端はハイブリドーマからエドマン分解により決定したものと一致した。

【0356】

特異的なサブグループへの割り当ては、カバットデータベース(Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Govt. Printing Office.)由来のコンセンサス免疫グロブリン可変ドメイン配列を用いたBLAST分析に基づいた。以下のCDRはカバット定義を用いて示している。

【0357】

mAb A0D9

以下に、A0D9成熟重鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

1 QVQLKQSGPG LVQPSQSLSI TCTVS GFSLS TY
GVHWVRQF PGKGLEWLG
 51 IWRGGNTNYN AAFMSRLTIS KDNSKSKQVFF KM
 NSLQAKDT AIYYCVR NQI
 101 YDGYDYAMD YWGQGTSVTV SS (配列番号:)

A0D9重鎖はマウスサブグループI(B)重鎖である。

【0358】

以下に、A0D9重鎖可変ドメイン(pYL460由来)のDNA配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す(シグナルコード重鎖は、MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (配列番号:))である。

1 ATGGCTGTCC TGGGGCTGCT CTTCTGCCTG GT
GACATTCC CAAGCTGTGT
 51 CCTGTCCCAG GTGCAGCTGA AGCAGTCAGG AC
 CTGGCCTA GTGCAGCCCT
 101 CACAGAGCCT GTCCATCACCC TGCACAGTCT CT
 GGTTTCTC ATTATCTACC

1 5 1 T A T G G T G T C C A C T G G G T T C G C C A G T T T C C A G G
 A A A G G G T C T G G A G T G G C T
 2 0 1 G G G A G T G A T A T G G A G A G G T G G A A C A C A A A C T
 A T A A T G C A G C T T T T C A T G T
 2 5 1 C C A G A C T G A C C A T C A G C A A G G A C A A T T C C A A G
 A G T C A A G T T T T C T T T A A A
 3 0 1 A T G A A C A G T C T G C A A G C T A A A G A C A C A G C C A T
 A T A T T A T T G T G T C A G A A A
 3 5 1 C C A G A T C T A T G A T G G T T A C T A C G A C T A T G C T A
 T G G A C T A C T G G G G T C A G G
 4 0 1 G A A C C T C A G T C A C C G T C T C C T C A (配列番号 :)

10

【 0 3 5 9 】

以下に、A 0 D 9 成熟軽鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

1 D I K M T Q S P S S M Y A S L G E R V T I T C K A S Q D I N T Y
L N W L Q Q K P G K S P K T L I Y R
 5 1 A N R L V D G V P S R F S G R G S G Q D Y S L T I S S L E Y E D
 V G I Y Y C L H Y D A F P W T F G G
 1 0 1 G T K L E I K

A 0 D 9 軽鎖は、マウスサブグループ V 軽鎖である。

20

【 0 3 6 0 】

以下に、成熟軽鎖可変ドメイン (p Y L 4 6 3 由来) の DNA 配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す (シグナルコード軽鎖は、M R A P A Q F F G F L L L W F P G I K C (配列番号 :) である) 。

1 A T G A G G G C C C C T G C T C A G T T T T T T G G C T T C T T
G T T G C T C T G G T T T C C A G G
 5 1 T A T C A A A T G T G A C A T C A A G A T G A C C C A G T C T C
 C A T C T T C C A T G T A T G C A T
 1 0 1 C T C T A G G A G A G A G A G T C A C T A T C A C T T G C A A G
 G C G A G T C A G G A C A T T A A T
 1 5 1 A C C T A T T T A A A C T G G C T C C A G C A G A A A C C A G G
 G A A A T C T C C T A A G A C C C T
 2 0 1 G A T C T A T C G T G C A A A C A G A T T G G T A G A T G G G G
 T C C C A T C A A G G T T C A G T G
 2 5 1 G C C G T G G A T C T G G G C A A G A T T A T T C T C T C A C C
 A T C A G C A G C C T G G A A T A T
 3 0 1 G A A G A T G T G G G A A T T T A T T A T T G T C T A C A C T A
 T G A T G C A T T T C C G T G G A C
 3 5 1 G T T C G G C G G A G G C A C C A A G C T G G A A A T C A A A (配列番号 :)

30

【 0 3 6 1 】

m A b A 1 D 5

以下に、A 1 D 5 成熟重鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

1 E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y
F M N W M R Q S H G K S L E W I G R
 5 1 I N P Y N G D S F Y N Q K F K D K A T L T V D K S S T T A H M E
 L L S L T S E D S A V Y Y C G R G Y
 1 0 1 D A M D Y W G Q G T S V T V S S (配列番号 :)

40

A 1 D 5 重鎖は、マウスサブグループ I (B) 重鎖である。

【 0 3 6 2 】

以下に、A 1 D 5 重鎖可変ドメイン (p Y L 3 3 8 由来) の DNA 配列を示し、そのシ

50

グナル配列を下線で示す（シグナルコード重鎖は、MGW S C V M L F L L S V T V G V F S（配列番号：）である）。

```

1  ATGGGATGGA GCTGTGTAAAT GCTCTTTCTCTC CT
GTCAGTAA CTGTAGGTGT
5 1  GTTTTCTGAG GTTCAGCTGCG AGCAGTCTGGG AC
CTGAGCTG GTGAAGCCTG
1 0 1  GGGCTTTCAGT GAAGATATCC TGCAAGGCTT CT
GGTTACTC ATTTACTGGC
1 5 1  TACTTTATGA ACTGGATGAG GCAGAGCCAT GG
AAAGAGCC TTGAGTGGAT
2 0 1  TGGACGTATT AATCCTTACA ATGGTGATTTC TT
TCTACAAC CAGAAGTTCA
2 5 1  AGGACAAGGC CACATTGACT GTAGACAAAT CC
TCTACCAC AGCCCAACATG
3 0 1  GAGCTCCTGA GCCTGACATC TGAGGACTCT GC
AGTCTATT ATTTGTGGAAG
3 5 1  AGGATACGAC GCTATGGACT ACTGGGGTCA AG
GAACCTCA GTCACCGTCT
4 0 1  CCTCA（配列番号：）

```

10

20

【0363】

以下に、A1D5成熟軽鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

```

1  DIQMTQTSS LSASLGDRV ISCRASQDIS NF
LTWYQQKP DGTVKLLIYY
5 1  TSKLHSGVPS RFSGSGSGSTD YSLTISNLEP GD
IATYYCQQ VSKFPWTFGG
1 0 1  GAKLEIK（配列番号）

```

A1D5軽鎖は、マウスサブグループV 軽鎖である。

【0364】

以下に、成熟軽鎖可変ドメイン（pYL352由来）のDNA配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す（シグナルコード軽鎖は、MVSTAQFLGLLLLCFQGTRC（配列番号）である）。

```

1  ATGGTGTCCA CAGCTCAGTT CCTTGGTCTCTC CT
GTTGCTCT GTTTTTCAAGG
5 1  TACCAGATGT GATATCCAGA TGACACAGAC TA
CATCCTCC CTGTCTGCCT
1 0 1  CTCTGGGAGA CAGAGTCACC ATTAGTTGCA GG
GCAAGTCA GGACATTAGC
1 5 1  AATTTTTTTAA CCTGGTATCA GCAGAAACCA GA
TGGAAGCTG TTAAACTCCT
2 0 1  GATCTACTAC ACATCAAAAT TACACTCAGG AG
TCCCATCA AGGTTCAGTG
2 5 1  GCAGTGGGTC TGGGACAGAT TATTCTCTCA CC
ATTAGCAA CCTGGAACCG
3 0 1  GGTGATATTG CCACCTTACTA TTGCCAACAG GT
TAGTAAGT TTCCGTGGAC
3 5 1  GTTCGGGTGGA GGCGCCAAGC TGGAAATCAA A（
配列番号：）

```

40

【0365】

mAb LT101およびLT103

抗体LT101（P1G4.4）とLT103（P1G9.1）は同一であることが見

50

出された。以下に、LT101とLT103の成熟重鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

1 QVQLQQSGPE LVKPGASVQI SCKASGYVFS SS
WMNWKQR PGRGLEWIGR

51 IYPGDGDDTDY TGKFKGKATL TADKSSNTAY MQ
LSSLTSDV SAVYFCASGY

101 FDFWGQGTPL TVSS (配列番号)

抗体LT101とLT103の重鎖は、マウスサブグループII(B)重鎖である。

【0366】

以下に、LT101重鎖可変ドメイン(pYL458またはpYL459由来)のDNA配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す(シグナルコード重鎖は、MGWSCIMFFLLSITAGVHC(配列番号)である)。

1 ATGGGGATGGA GCTGTATCAT GTTCTTCTCTC CT
GTCAATAA CTGCAGGTGT

51 CCATTGCCAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG AC
CTGAGCTG GTGAAGCCTG

101 GGGCCTCAGT GCAGATTTCC TGCAAAGCTT CT
GGCTACGT TTTCAGTAGT

151 TCTTGGATGA ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT GG
ACGGGGTCT TTGAGTGGAT

201 TGGGCGGATT TATCCTGGAG ATGGAGATAC TG
ACTACACT GGGAAAGTTCA

251 AGGGCAAGGC CACACTGACT GCAGACAAAT CC
TCCAACAC AGCCTACATG

301 CAGCTCAGCA GCCTGACCTC TGTGGACTCT GC
GGTCTATT TCTGTGCAAG

351 TGGGTACTTT GACTTCTGGG GCCAAGGCAC CC
CTCTCACCC GTCTCCTCA (配列番号)

【0367】

以下に、LT101およびLT103成熟軽鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

1 DITMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDMN NY
LRWFQQKP GKSPQTLIFR

51 ANRLVDGVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEF ED
MGIYCYCLQ HDKFPPTFGG

101 GTKLEIK (配列番号:)

LT101およびLT103の軽鎖は、マウスサブグループV 軽鎖である。

【0368】

以下に、成熟軽鎖可変ドメイン(pYL461またはpYL462由来)のDNA配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す(シグナルコード軽鎖は、MRAPAQFLGLILLWFPGIKC(配列番号:)である)。

1 ATGAGGGGCC CTGCTCAGTT TCTTGGCATC TT
GTTGCTCT GGTTTCCAGG

51 TATCAAATGT GACATCACGA TGACCCAGTC TC
CATCTTCC ATGTATGCAT

101 CTCTAGGAGA GAGAGTCACT ATCACTTGCA AG
GCGAGTCA GGACATGAAT

151 AACTATTTAA GGTGGTTCCA GCAGAAACCA GG
GAAGTCTC CTCAGACCCT

201 GATCTTTTCGT GCAAACAGAT TGGTTCGATGG GG

10

20

30

40

50

T C C C A T C A A G G T T C A G T G
 2 5 1 G C A G T G G A T C T G G G C A A G A T T A T T C T C T C A C C
 A T C A G C A G C C T G G A A T T T
 3 0 1 G A A G A T A T G G G A A T T T A T T A T T G T C T A C A G C A
 T G A T A A A T T T C C T C C G A C
 3 5 1 G T T C G G T G G A G G C A C C A A G C T G G A A A T C A A A (配列番号：)

【0369】

m A b L T 1 0 2

以下に、L T 1 0 2 (P 1 G 8 . 2) 成熟重鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、C D Rを下線で示す。

1 E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A V S G F T F S D Y
Y M Y W I R Q T P E K R L E W V A T
 5 1 I G D G T S Y T H Y P D S V Q G R F T I S R D Y A T N N L Y L Q
 M T S L R S E D T A L Y Y C A R D L
 1 0 1 G T G P F A Y W G Q G T L V T V S A (配列番号)
 L T 1 0 2 重鎖は、マウスサブグループ I I I (D) 重鎖である。

【0370】

以下に、L T 1 0 2 重鎖可変ドメイン (p Y L 3 7 5 由来) の DNA 配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す (シグナルコード重鎖は、M D F G L S W V F L V L V L K G V Q C (配列番号：) である)。

1 A T G G A C T T T C G G G T T G A G C T G G G T T T T C C T T G T
C C T T G T T T T A A A A G G T G T
 5 1 C C A G T G T G A A G T G A A G C T G G T G G A G T C T G G A G
 G A G G C T T A G T G A A G C C T G
 1 0 1 G A G G G T C C C T G A A A C T C T C C T G T G C A G T C T C T
 G G A T T C A C T T T C A G T G A C
 1 5 1 T A T T A T A T G T A T T G G A T T C G C C A G A C T C C G G A
 A A A G C G G C T G G A G T G G G T
 2 0 1 C G C A A C C A T T G G T G A T G G T A C T A G T T A C A C C C
 A C T A T C C A G A C A G T G T G C
 2 5 1 A G G G G C G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C T A T G C C
 A C G A A C A A C C T G T A C C T G
 3 0 1 C A A A T G A C T A G T C T G A G G T C T G A A G A C A C A G C
 C T T A T A T T A C T G T G C A A G
 3 5 1 A G A T C T T G G A A C C G G G C C T T T T G C T T A C T G G G
 G C C A G G G G A C T C T G G T C A
 4 0 1 C T G T C T C T G C A (配列番号：)

【0371】

以下に、L T 1 0 2 成熟軽鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、C D Rを下線で示す。

1 D V L M T Q T P R S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q N I V H S
N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K
 5 1 L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R
 V E A E D L G V Y Y C F Q G S H F P
 1 0 1 W T F G G G T K L E I K (配列番号：)
 L T 1 0 2 軽鎖は、マウスサブグループ I I 軽鎖である。

【0372】

以下に、成熟軽鎖可変ドメイン (p Y L 3 7 8 由来) の DNA 配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す (シグナルコード軽鎖は、M K L P V R L L V L M F W I P A S S S

10

20

30

40

50

(配列番号：)である)。

```

      1  ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG AT
GTTCTGGA TTCCTGCTTC
      5 1  CAGCAGTGAC GTTTTGTGATGA CCCAAACTCC AC
GCTCCCTG CCTGTCAAGTC
      1 0 1  TTGGAGATCA AGCCTCCATC TCTTGCAGAT CT
AGTCAGAA CATTTGTTCA T
      1 5 1  AGTAATGGAA ACACCTATTT AGAATGGTAC CT
GCAGAAAC CAGGCCAGTC
      2 0 1  TCCAAAGCTC CTGATCTACA AAGTTTCCAA CC 10
GATTTTCT GGGGTCC CAG
      2 5 1  ACAGGTTTCAG TGGCAGTGGA TCAGGGACAG AT
TTCACACT CAAGATCAGC
      3 0 1  AGAGTGGAGG CTGAGGATCT GGGAGTTTAT TA
CTGCTTTC AAGGTTTACA
      3 5 1  TTTTCCTTGG ACATTCGGTG GAGGCACCAA GC
TGGAGATC AAA (配列番号：)

```

【0373】

mAb LT105

以下に、LT105 (P2E9.7) 成熟重鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。 20

```

      1  DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGY SIT SG
YYWNWIRQ FPGNKLEGMG
      5 1  YISYDGSNNY NPSLKNRISI TRDSSSKNQFF LK
LNSVTAED SGTYYCARDA
      1 0 1  YSYGMDYWQ GTSVTVSS (配列番号：)
LT105 重鎖は、マウスサブグループI (A) 重鎖である。

```

【0374】

以下に、LT105 重鎖可変ドメイン (pYL382 由来) のDNA配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す (シグナルコード重鎖は、MMVLSLLYLLTAIPGLS (配列番号：) である)。 30

```

      1  ATGGACTTTCG GGTTGAGCTG GGTTTTTCCTT GT
CCTTGTTT TAAAAGGTGT
      5 1  CCAGTGTTGAA GTGAAGCTGG TGGAGTCTGG AG
GAGGCTTA GTGAAGCCTG
      1 0 1  GAGGGTCCCT GA AACTCTCC TGTGCAGTCT CT
GGATTAC TTTCAGTGAC
      1 5 1  TATTATATGT ATTGGATTCTG CCAGACTCCG GA
AAAGCGGC TGGAGTGGGT
      2 0 1  CGCAACCATTT GGTGATGGTA CTAGTTACAC CC 40
ACTATCCA GACAGTGTGC
      2 5 1  AGGGGCGATT CACCATCTCC AGAGACTATG CC
ACGAACAA CCTGTACCTG
      3 0 1  CAAATGACTA GTCTGAGGTC TGAAGACACA GC
CTTATATT ACTGTGCAAG
      3 5 1  AGATCTTGGAA ACCGGGCCTT TTGCTTACTG GG
GCCAGGGG ACTCTGGTCA
      4 0 1  CTGTCTCTGCA A (配列番号：)

```

【0375】

以下に、LT105 成熟軽鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す 50

。

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD NY
GISFMHWY QQKPGQP PKL

51 LIYRASNL ES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PV
ETDDVATF YCQQSNKDPY

101 TFGGGTKLEI K (配列番号：)

LT105 軽鎖は、マウスサブグループ I II 軽鎖である。

【0376】

以下に、成熟軽鎖可変ドメイン (pYL383 由来) の DNA 配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す (シグナルコード軽鎖は、METDTLLLLWVLLLVPGST G (配列番号：) である)。

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CT
GCTGCTCT GGGTTCCAGG

51 TTCCACAGGT GACATTGTGC TGACCCAATC TC
CAGCTTCT TTGGCTGTGT

101 CTCTAGGGCA GAGGGCCACC ATCTCCTGCA GA
GCCAGCGA AAGTGTTGAT

151 AATTATGGCA TTAGTTTTAT GCACTGGTAC CA
GCAGAAAC CAGGACAGCC

201 ACCCAAACCTC CTCATCTATC GTGCATCCAA CC
TAGAATCT GGGATCCCTG

251 CCAGGTTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG AC
TTCACCT CACCATTAAT

301 CCTGTGGAGA CTGATGATGT TGCAACCTTT TA
CTGTTCAGC AAAGTAATAA

351 GGATCCGTAC ACGTTCGGAG GGGGGACCAA GC
TGGAAATA AAA (配列番号：)

【0377】

mAb LT107

以下に、LT107 (P5C4.1) 成熟重鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

【化5】

1 QVQLKQSGPG LVQPSQNLSI TCTVS GFSLT N
YGIHWIRQP PGKGLEWLG V

51 IWSGGSTDHN AAFISRLSIS KDNSKSQVFF T
MNSLEVDDT AIYYCARN NRA

101 YYRYEGGMDY WGQGTSTVS S

LT107はマウスサブグループ I (B) 重鎖である。FR1中の潜在的N結合グリコシル化部位は上記の太字で示されていることに留意されたい。

【0378】

以下に、LT107重鎖可変ドメイン (pYL447 由来) の DNA 配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す (シグナルコード重鎖は、MAVLGLLFLVTFPSC VLS (配列番号：) である)。

1 ATGGCTGTCC TGGGGCTGCT CTTCTGCCTG GT
GACATTCC CAAGCTGTGT

51 CCTATCC CAG GTGCAGCTGA AACAGTCAGG AC
CTGGCCTC GTGCAGCCCT

101 CACAGAACCT GTCCATCACCC TGCACAGTCT CT
GGTTTCTC ATTAACCTAAC

1 5 1 T A T G G T A T A C A C T G G A T T C G C C A G C C T C C A G G
 A A A G G G T C T G G A G T G G C T
 2 0 1 G G G A G T G A T A T G G A G T G G T G G A A G C A C A G A C C
 A T A A T G C T G C T T T C A T A T
 2 5 1 C C A G A C T G A G C A T C A G C A A G G A C A A C T C C A A G
 A G C C A A G T T T T C T T T A C A
 3 0 1 A T G A A C A G T C T G G A A G T T G A T G A C A C A G C C A T
 A T A C T A C T G T G C C A G A A A
 3 5 1 T A G A G C C T A C T A T A G G T A C G A G G G G G G T A T G G
 A C T A T T G G G G T C A A G G A A
 4 0 1 C C T C A G T C A C C G T C T C C T C A (配列番号 :)

10

【 0 3 7 9 】

以下に、LT107成熟軽鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

1 D I K M T Q S P S S M Y A S L G E R V T I T C K A S Q D I N T Y
L N W F Q Q K P G K S P M T L I Y R
 5 1 A D R L L D G V P S R F S G S G S G Q D Y S L T I S S L E D E D
M G I Y Y C Q Q Y D D F P L T F G A
 1 0 1 G T K L E L K (配列番号 :)

20

【 0 3 8 0 】

これはマウスサブグループV 軽鎖である。以下に、成熟軽鎖可変ドメイン (p Y L 4 4 8 由来) の DNA 配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す (シグナルコード軽鎖は、MVSSAQFLGILLWFPGIKC (配列番号 :) である)。

1 A T G G T A T C C T C A G C T C A G T T C C T T G G A A T C T T
G T T G C T C T G G T T T C C A G G
 5 1 T A T C A A A T G T G A C A T C A A G A T G A C C C A G T C T C
C A T C T T C C A T G T A T G C A T
 1 0 1 C T C T A G G A G A G A G A G T C A C T A T C A C T T G C A A G
 G C G A G T C A G G A C A T T A A T
 1 5 1 A C C T A T T T A A A C T G G T T C C A G C A G A A A C C A G G
 G A A A T C T C C T A T G A C C C T
 2 0 1 G A T C T A T C G T G C A G A C A G A T T G T T A G A T G G G G
 T C C C A T C A A G G T T C A G T G
 2 5 1 G C A G T G G A T C T G G G C A A G A T T A T T C T C T C A C C
 A T C A G C A G C C T G G A G G A T
 3 0 1 G A G G A T A T G G G A A T T T A C T A T T G T C A A C A G T A
 T G A T G A C T T T C C T C T C A C
 3 5 1 G T T C G G T G C T G G G A C C A A G C T G G A G C T G A A A (配列番号 :)

30

【 0 3 8 1 】

m A b L T 1 0 8
 以下に、LT108 (P 4 F 2 . 2) 成熟重鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、CDRを下線で示す。

40

【 化 6 】

1 Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I T C T V S G F S L T D
Y G I H W I R Q P P G K G L E W L G V
 5 1 I W S G G S T D H N A V F T S R L N I S K D N S K S Q V F F K
M N S L E P D D T A M Y Y C A R N R A
 1 0 1 Y Y R Y E G G M D Y W G Q G T S V T V S S (配列番号 :)

50

G T T G C T C T G G T T T C C A G G
5 1 T A T C A A A T G T G A C A T C A A G A T G A C C C A G T C T C
C A T C T T T C C A T G T A T G C A T
1 0 1 C T C T A G G A G A G A G A G T C A C T A T C A C T T G C A A G
G C G A G T C A G G A C A T T A A T
1 5 1 A C C T A T T T A A A C T G G T T C C A G C A G A A A C C A G G
G A A A T C T C C T A T G A C C C T
2 0 1 G A T C T A T C G T G C A G A C A G A T T G T T A G A T G G G G
T C C C A T C A A G G T T C A G T G
2 5 1 G C A G T G G A T C T G G G C A A G A T T A T T C T C T C A C C 10
A T C A G C A G C C T G G A G G A T
3 0 1 G A A G A T A T G G G A A T T T A C T A T T G T C A A C A G T A
T G A T G A C T T T C C T C T C A C
3 5 1 G T T C G G T G C T G G G A C C A A G C T G G A G C T G A A A (
配列番号：)

これは、L T 1 0 7 の軽鎖と単一のヌクレオチドが異なる、すなわち残基 E 8 1 のコドンにおいてサイレント不安定位置が変化している。

【 0 3 8 5 】

以下は、9 B 4 成熟重鎖可変ドメインタンパク質配列であり、C D R を下線で示す。

1 Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L S T S 20
G M G V S W I R Q P S G K G L E W L
5 1 A H I Y W D D D K R Y N P S L R S R L T I S K D T S R N Q V F L
K I T S V D T A D T A T Y Y C A R R
1 0 1 E G Y Y G S S F D F D V W G A G T T V T V S S

抗体 9 B 4 の重鎖は、マウスサブグループ I (B) 重鎖である。

【 0 3 8 6 】

以下に、9 B 4 重鎖可変ドメイン (p Y L 5 7 3 由来) の D N A 配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す (シグナルコード重鎖は M G R L T F S F L L L I V P A Y V L S (配列番号) である)。

1 A T G G G C A G A C T T A C A T T C T C A T T C C T G C T G C T 30
G A T T G T C C C T G C A T A T G T
5 1 C C T T T C C C A G G T T A C C C T G A A A G A G T C T G G C C
C T G G G A T A T T G C A G C C C T
1 0 1 C C C A G A C C C T C A G T C T G A C T T G T T C T T T C T C T
G G G T T T T C A C T G A G C A C T
1 5 1 T C T G G G A T G G G T G T G A G C T G G A T T C G T C A G C C
T T C A G G A A A G G G T C T G G A
2 0 1 G T G G C T G G C A C A C A T T T A C T G G G A T G A T G A C A
A G C G C T A T A A C C C A T C C C
2 5 1 T G A G G A G C C G G C T C A C A A T C T C C A A G G A T A C C 40
T C C A G A A A C C A G G T A T T C
3 0 1 C T C A A G A T C A C C A G T G T G G A C A C T G C A G A T A C
T G C C A C A T A C T A C T G T G C
3 5 1 T C G A A G A G A G G G T T A C T A C G G T A G T A G C T T C G
A C T T C G A T G T C T G G G G C G
4 0 1 C A G G G A C C A C G G T C A C C G T C T C C T C T

【 0 3 8 7 】

以下に、L T 9 B 4 成熟軽鎖可変ドメインタンパク質配列を示し、C D R を下線で示す。

1 Q I V L S Q S P A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S V S Y M 50

I W Y Q Q K P G S S P K P W I Y A T

5 1 S S L A S G V P T R F S G S G S G T S Y S L T I S R V E A A D A
 A T Y Y C Q Q W S Y N P L T F G A G
 1 0 1 T K L E L K

【0388】

これはマウスサブグループV I 軽鎖である。以下に、成熟軽鎖可変ドメイン（p Y L 9 B 4 由来）のDNA配列を示し、そのシグナル配列を下線で示す（シグナルコード軽鎖は、MD L Q V Q I F S F L L I S A S V K M S R G（配列番号：）である）。

1 A T G G A T T T A C A G G T G C A G A T T T T C A G C T T C C T
G C T A A T C A G T G C T T C A G T

5 1 C A A A A T G T C C A G A G G A C A A A T T G T T C T C T C C C
 A G T C T C C A G C A A T C C T G T

1 0 1 C T G C A T C T C C A G G G G A G A A G G T C A C A A T G A C T
 T G C A G G G C C A G C T C A A G T

1 5 1 G T G A G T T A C A T G A T C T G G T A C C A A C A G A A G C C
 A G G A T C C T C C C C C A A A C C

2 0 1 C T G G A T T T A T G C C A C A T C C A G C C T G G C T T C T G
 G A G T C C C T A C T C G C T T C A

2 5 1 G T G G C A G T G G G T C T G G G A C C T C T T A C T C T C T C
 A C A A T C A G C A G A G T G G A G

3 0 1 G C T G C A G A T G C T G C C A C T T A T T A C T G C C A G C A
 G T G G A G T T A T A A C C C G C T

3 5 1 C A C G T T C G G T G C T G G G A C C A A G C T G G A G C T G A
 A A

【0389】

CDRコンセンサス配列

様々な抗L T 1 2 抗体の配列分析により、CDR内のコンセンサス配列をいくつか特定した。表1に重鎖配列のために特定したコンセンサス配列を記載し、表2に軽鎖配列のために特定したコンセンサス配列を記載する。

【表2-1】

表1 抗L T 抗体の重鎖のコンセンサス配列

抗体指定	CDR1	抗体指定	CDR2	抗体指定	CDR3
A0D9	GFSLSTYGVH	A0D9	VIWRGGNTNYNAAFMS	A0D9	NQIYDGYDYAMDY
108	GFSLTDYGIH	108	VIWSGGSTDHNAVFTS	108	NRAYRYEGGMDY
107	GFSLTNYGIH	107	VIWSGGSTDHNAAFIS	107	NRAYRYEGGMDY
9B4	GFSLSTSGMGVS			9B4	REGYYGSSFDV
				コンセンサスE	G/AYYG/A
コンセンサスA	GFSLX ₁ X ₂ Y/SGX ₃ H/GX ₆ X ₇ X ₁ はSまたはT X ₂ はT、D、またはN X ₃ はV、MまたはI	コンセンサスB	VIWX ₁ GGX ₂ TX ₃ X ₄ NAX ₅ FX ₆ S X ₁ はRまたはS X ₂ はNまたはS X ₃ はNまたはD	105	DAYSYGMDY

10

20

30

40

【表 2 - 2】

	X ₄ は欠損しているかまたはV X ₅ は欠損しているかまたはS (7/10 または 7/12 同一)		X ₄ はYまたはH X ₅ はAまたはV X ₆ はM、T、またはI (10/16 同一)		
A1D5	GYSFTGYFMN	A1D5	RINPYNGDSFYNQKFKD	A1D5	GYDAMDY
102	GFTFSDYYMY	102	TIGDGTSYTHYPDSVQG	102	GTGPFAY
101/103	GYVFSSWMN	101/103	RIYPGDGDTDTGKFKG	101/103	GYFDF
105	GYSITSGYYWN	105	GYISYDGSNNYNPSLKN		
		9B4	HIYWDDDKRYNPS		
コンセンサス C	GX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁ はY、F X ₂ はS、T、またはV X ₃ はFまたはI X ₄ はTまたはS X ₅ はG、D、またはS X ₆ はY、S、またはG X ₇ はF、Y、またはW X ₈ はMまたはY X ₉ はN、YまたはW X ₁₀ は欠損しているかまたはN	コンセンサス D	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ YX ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁ はR、T、G、または欠損 X ₂ はI、H、またはY X ₃ はN、G、Y、またはI X ₄ はP、D、Y、またはS X ₅ はY、W、またはG X ₆ はN、T、またはD X ₇ はG、DまたはS X ₈ はD、Y、またはS X ₉ はS、T、K、またはN X ₁₀ はF、H、D、R、またはN X ₁₁ はN、P、またはT X ₁₂ はQ、D、G、またはP X ₁₃ はKまたはS X ₁₄ はF、V、またはL X ₁₅ はKまたはQ X ₁₆ はD、G、またはN		

10

20

【表 3 - 1】

表 2 抗 L T 抗体の軽鎖のコンセンサス配列

抗体指定	CDR1	抗体指定	CDR2	抗体指定	CDR3
A0D9	KASQDINTYLN	A0D9	RANRLVD		
108	KASQDINTYLN	108	RADRLLD	108	QQYDDFPLT
107	KASQDINTYLN	107	RADRLLD	107	QQYDDFPLT
A1D5	RASQDISNFLT	101/103	RANRLVD	A1D5	QQVSKFPWT
101/103	KASQDMNNYLR	コンセンサス B	RAX ₁ RLX ₂ D X ₁ はNまたはD X ₂ はVまたはL (5/7 同一)	102	FQGSHPWT
コンセンサス A	X ₁ ASQDX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ LX ₆ X ₁ はKまたはR			105	QQSNKDPYT

30

40

【表 3 - 2】

	X_2 はIまたはM X_3 はNまたはS X_4 はTまたはN X_5 はYまたはF X_6 はN、T、またはR (5/11 同一)				
				9B4	QQWSYNPLT
				コンセンサス C	X_1 Q X_2 X_3 X_4 X_5 PX_6 T X_1 はQまたはF X_2 はY、V、G、W、またはS X_3 はD、S、またはN X_4 はD、H、Y、またはK X_5 はF、N、またはD X_6 はW、L、またはY (3/9 同一)
105	RASESVDNYGISF MH	A1D5	YTSKLHS	A0D9	LHYDAFPWT
9B4	<u>RASSVSYMI</u>	102	KVSNRFS	101/103	LQHDKFPPT
コンセンサス F	$RASX_1$ SVX_2 X_3 X_4 X_5 X_1 はEまたはS X_2 はDまたはS X_3 はNまたはY X_4 はYまたはM X_5 はGまたはI	105	RASNLES		
		105A	KASNLES		
		105B	RASSLES		
		105C	KASSLES		
		9B4	ATSSLAS		
102	RSSQNIVHSNGNT YLE				
		コンセンサス D	X_1 X_2 SX_3 X_4 X_5 S X_1 はA、Y、R、またはK X_2 はT、A、またはV	コンセンサス E	LX_1 X_2 DX_4 FPX_6 T X_1 はHまたはQ X_2 はHまたはY X_3 はAまたはK X_4 はWまたはP

10

20

30

40

【表 3 - 3】

			X_3 はK、S、またはN X_4 はLまたはR X_5 はH、E、A、またはF (2/7 同一)		(5/9 同一)
--	--	--	--	--	----------

10

(実施例 2)

【 0 3 9 0 】

抗リンホトキシン (L T) 抗体のインビトロ活性

I L - 8 放出アッセイ

I L - 8 放出アッセイを用いて、実施例 1 に記載の抗 L T 抗体の機能的活性を決定した。I L - 8 放出アッセイは、A 3 7 5 細胞 (ヒト黒色腫細胞系) 上の細胞表面リンホトキシンベータ受容体に可溶性組換えヒトリノトキシン 1 2 が結合後に観察される I L - 8 分泌に基づく。I L - 8 放出アッセイにより、可溶性リンホトキシン 1 2 へ結合し、リンホトキシンベータ受容体への結合を防止することによりこの I L - 8 分泌をブロックする抗体能を測定する。次いで、培地上清中に分泌される I L - 8 を E L I S A アッセイにより測定する。

20

【 0 3 9 1 】

抗体を適切な濃度に希釈し、9 6 ウェルマイクロタイタープレート中、可溶性組換えヒトリノトキシン 1 2 (1 7 0 n g / m l) で室温で 1 時間インキュベーションした。リンホトキシン 1 2 濃度を I L - 8 放出の最大量を決定する滴定実験により至適化した。

【 0 3 9 2 】

次いで、1 5 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 個の A 3 7 5 細胞を各ウェルに添加し、プレートを 3 7 ° で 5 % C O ₂ で 1 7 時間インキュベーションした。インキュベーション期間の終了時、プレートを遠心分離し、上清を回収した。上清の I L - 8 濃度を標準的なサンドイッチ E L I S A アッセイにて試験した。I L - 8 濃度を抗体濃度に対してプロットし、データの 4 変数曲線適合から I C 5 0 を決定した (阻害曲線については、図 1 A および 1 B を参照されたい) 。表 3 に各抗体の I C 5 0 計算値を記載する。I C 5 0 値の計算において、抗体濃度は、前インキュベーション工程中に L T 1 2 で示す (細胞および 4 倍低い緩衝液添加後の抗体濃度ではない) 。

30

【表 4】

表 3 I L - 8 放出阻害の I C 5 0 決定および I L - 8 放出の阻害パーセントの概要

抗体	IC50nM	最大阻害パーセント
9B4	0.6	95
102	0.406;0.991	92
103	1.11	90
105	0.52;1.056	100
107	0.53	95
108	1.3	100
A1D5	2.5	94
A0D9	1.67	94
C37	-	阻害なし
B27	-	阻害なし
B9	約 500nM(推定)	53%@667nM

40

50

【0393】

L T 3 E L I S A

加えて、結合実験により、実施例1に記載の抗LT抗体にて、mAb LT101/LT103のみLT3（可溶性ホモ三量体）と結合し、他は結合しなかったことが明らかになった。mAb LT101/LT103は、以下のアッセイを用いて測定したところ、LT12-LT β R相互作用をブロックできた（最大約70%ブロック）。しかしながら、LT101/103は、（ELISA形式のブロックにおいて評価した）LT3とTNFR-Ig（p55）間の相互作用はブロックできなかった。

【0394】

LT3 ELISAにおいて、マイクロタイタープレートにLT3（1または5 μ g/mlのPBS溶液）でコーティングし、次いで非特異的な結合部位を1%カゼイン緩衝液でブロックした。試料（抗体、受容体-Ig）を添加して、結合をHRP-複合抗マウスIg抗体で検出した。LT3とTNFR-hIg（p55）間の相互作用をブロックするmAb能を評価するため、プレートをLT3でコーティングし、上記のようにブロックした。TNFR-Ig添加の30分前に、プレートに連続希釈抗体を添加した。TNFR-hIgのプレート結合LT3への結合をHRP複合抗ヒトIg抗体にて検出した。

【0395】

LT β R-Igブロックアッセイ（II-23アッセイ）

II-23細胞を50 ng/ml PMA、5%CO₂で37℃で4時間インキュベーションした。細胞を洗浄し、500,000個の細胞を96ウェルプレートの各ウェルに添加した。抗体を適切な濃度に希釈し、II-23細胞に添加した。4℃で30分間インキュベーション後、ビオチン標識したLT β R-Igを各ウェルに添加して最終濃度を1 μ g/mlとした。細胞を4℃でさらに30分間インキュベーションしてから、3回洗浄する。ストレプトアビジン-PEを1/500に希釈し、各ウェルに添加して4℃で1時間インキュベーションした。細胞を1回洗浄し、FACS分析により読み込んだ。平均蛍光度を抗体濃度に対してプロットし、データの4変数曲線適合からIC50を決定する。

【0396】

II-23アッセイにおいて、90%超の効能を有するmAb（LT105、9B4、LT102、A1D5、およびA0D9を含む）をいくつか特定した。II-23アッセイにおいて、mAb LT102およびLT105のブロックは98%超であった。図4に示すように、II-23ブロックアッセイにおいて、LT102およびLT105は、抗LT抗体B9（米国特許第5,925,351号を参照されたい）、C37、およびB27（C37とB27は両方ともBrowning et al.（1995）J Immunol 154:33に記載されている）と比較して優れた効能を示した。データの概要を表4に示す。

【表5】

表4 LTへのLT β R結合の最大阻害パーセント

抗体	最大阻害パーセント
A0D9	92
105	97
9B4	99
103	77
102	98
107	80
108	81
A1D5	92
B9	44

【0397】

交差反応

LT105、9B4およびA1D5は、LT102が低い安定期で結合したように、カニクイザル（オナガザル科）由来のLTへも結合した。一部の抗LTmAbの交差反応評価の概要を下表5に記載する。先行技術のある抗体はカニクイザルLT（例えば、B9）に結合しなかったことは注目に値する。

【表6】

表5

mAb	A1D5	LT102	LT105	9B4	LT107-9	CE25
ヒトLT	+	+	+	+	+	+(低いプラト一期)
カニクイザルLT	+	+(低いプラト一期)	+	+	+/-	+(低いプラト一期)

10

【0398】

エピトープ分析

交差ブロック実験を実施して、実施例1に記載の新規抗LT抗体の結合したエピトープを決定した。当技術分野で知られている抗LT抗体の交差反応も決定した。表6に交差ブロック試験の概要を提示する。

【表7】

表6 交差ブロック結果

	LT012	LT105	9B4	LT107	A1D5	A0D9	B9	C37	B27
LT102		-	-	-	-	-	-	-	-
LT105	-		+	-	-	-	-	-	-
9B4		+							
LT107	-	-	-		-	+	-	-	-
A1D5	-	-	-	-		-	-	-	-
A0D9	-	-	-	+	-		-	-	-
B9	-	-	-	-	-	-		-	-
C37	-	-	-	-	-	-	-		+
B27	-	-	-	-	-	-	-	+	

20

30

【0399】

表6に記載のとおり、新規抗LT抗体間の交差反応は限られていた。さらに、LT102、LT105、9B4、LT9B4、LT107、A1D5、A0D9はすべて抗LT抗体B9、C37、およびB27と異なってエピトープと結合した。

【0400】

LT102は、ヒトLTと比較して、カニクイザルLTとより低い安定期で結合した。この結果により、LT102の臨界接触点（1つまたは複数）はカニクイザルLTとヒトLT間の非相同領域にある可能性が高いことが示唆された。したがって、D151R/Q153R；R193A/R194A；D151R/Q153R/R193A/R194A；PLK（96、97、98）WMS；TTK（106、107、108）ASQ；TTK（106、107、108）AWQ；FA（231、232）YR；T114R；DAE（121、122、123）PTH；およびP172Rのアミノ酸置換を含むヒトLTの変異体は、分子モデリングに基づき、この領域に設計した。

40

【0401】

この結果により、LT-R-Fc（陽性対照）は100ng/mlと10ng/mlの両濃度にて変異LTパネルのすべてのメンバーへ結合したことが示された。しかしながら、抗体LT102は（LT-R-Fc陽性対照と同一濃度にて）、変異LTパネルのすべてのメンバーのうち変異R193A/R194AおよびD151R/Q153R/R193A/R194Aは除いて結合した。したがって、残基R193およびR194はヒトL

50

TへのLT102結合にとって重要である。

【0402】

抗体LT105は、カニクイザルLTには結合するがマウスLTには結合しないことが見出された。この結果により、LT105の臨界接触点(1つまたは複数)はカニクイザルLTとマウスLT間の非相同領域内にある可能性が高いことが示唆された。ヒトLTの変異形態は、(LT Rとの相互作用の可能性に基づき)この領域内に設計した。D151R/Q153R; R193A/R194A; D151R/Q153R/R193A/R194A; PLK(96、97、98)WMS; TTK(106、107、108)ASQ; TTK(106、107、108)AWQ; FA(231、232)YR; T114R; DAE(121、122、123)PTH; およびP172Rのアミノ酸置換を含むヒトLTの変異体は、分子モデリングに基づき設計した。

10

【0403】

この結果により、LT R - Fc(陽性対照)は100 ng/mlと10 ng/mlの両濃度にて変異LTパネルのすべてのメンバーへ結合したことが示された。しかしながら、抗体LT105は、変異PLK(96、97、98)WMS; TTK(106、107、108)ASQ; およびTTK(106、107、108)AWQとは結合しなかった。したがって、P96/L97/K98およびT106/T107/K108はLTのLT105への結合にとって重要であることが見出された。9B4はLT105と交差競合し、この結合は、LT に対するP96/L97/K98変異により影響を受けるが、106位、107位、または108位の変異による影響は受けないことが見出された。

20

【0404】

結論として、ヒトLT の変異形態を用いたLT102、LT105、9B4およびA1D5のエピトープマッピングにより、R193/R194はLT102結合にとって重要であり、P96/L97/K98およびT106/T107/K108はLT105および9B4結合にとって重要な残基であることが示された。類似の変異試験により、残基P172はA1D5のヒトLTへの結合にとって重要であり、残基D151/Q153はLT107およびA0D9結合にとって重要であることが明らかになった。

【0405】

LTヘテロ三量体の図解を図6に記載する。サブユニットLT 上、D50NおよびY108F変異は、 / 裂け目側を定義する。加えて、LT105結合をブロックするLTB変異は、Y108F部位に密接して整列する。

30

(実施例3)

【0406】

抗リンホトキシン(LT)抗体のインビボ活性

以下の物質および方法を本実施例に使用した。

マウス: NOD - scid IL2rgnu11仔(生後72時間未満)に照射(100ラド)して、直後に 3×10^4 ヒトCD34 + 臍帯血細胞をRO洞注射した。詳細については、Pearson et al. (2008) Curr Top Microbiol Immunol 324:25を参照されたい。

試薬: LT102、LT105、およびB9は、マウス抗ヒトLT 1 2(mIgG1)抗体(BIIB、マウスLTと交差なし)である。BBF6は、ハムスター抗マウスLT 1 2抗体(BIIB、ヒトLTと交差なし)である。LT-LT R相互作用ブロックのために陽性対照としてマウスLT R - mIgG1を用いた(マウスLTの約2倍低い親和性でヒトLTと結合することが示された)。MOPC-21は、アイソタイプ対照抗体として用いたマウスIgG1抗体である。

40

投薬: 約4ヶ月齢時、再生マウスを群に無作為化した(マウス5匹/群)。マウスにアイソタイプ対照(MOPC-21)、陽性対照(mLT R - mIgG1)、BBF6、B9、LT102かLT105のいずれかを50 µg/マウス/週(図2)または200 µg/マウス/週(図3)注射した(腹腔内投与、計5回注射、マウス5匹/群)。最終注射から7日後、分析用に組織を回収した。

50

組織学的分析：PNA d / M E C A 7 9 (H E V) : リンパ節組織を10%中性緩衝液ホルマリンで24時間固定し、パラフィンブロックで保存した。3 μm切片を切断し、脱パラフィン化および抗原の回復 (D a k o) を実施した。

内因性ペルオキシダーゼブロック (D a k o) および F c ブロック (ウサギ血清) 後にラット抗マウス PNA d 一次抗体 (1 : 3 0 0) (B D) を適用した。ビオチン化ウサギ抗ラット I g G (H + L) 二次抗体 (V e c t o r) および A B C 標準キット (V e c t a s t a i n) を用いた後、DAB基質 (V e c t o r) で発現させた。マイヤーヘマトキシリン (M a y e r ' s h e m a t o x y l i n) (S i g m a) 対比染色を最終工程として行った後、スライドを95%および100%アルコールで連続脱水し、P e r m o u n t カバースリップで保存した。

シアロアドヘシン / M O M A - 1 : 1 0 μm切片をメチルブタンでOCT中で凍結した脾臓組織から切断し、-80℃で保存した。スライドをアセトンで固定し、1×TBS中で再水和し、内因性ペルオキシダーゼブロックおよびF c ブロック (B S A) を実施した。切片をラット抗マウスMOMA-1 F I T C 一次抗体 (1 : 1 0 0) (S e r o t e c) で染色した。抗F I T C - A P 二次抗体 (R o c h e) を用いた後、AP基質キット (V e c t o r) で発現させた。クリスタルマウント (C r y s t a l M o u n t) を用いて切片をカバーし、室温で一晩空気乾燥させた。

【0407】

抗ヒトLT 1 2 m A b の機能的活性を調査するため、歴史的m A b であるB9を参照したLT 1 0 2 およびLT 1 0 5、CD 3 4 + ヒト臍帯血細胞をグラフトしたN O D - s c i d I L 2 r y n u l l マウスを使用した。これらのマウスは機能的ヒト免疫系の多くの成分の発現を支持する。特に、キメラマウスは成功裏に再生されており、末梢リンパ節中のM E C A - 7 9 + H E V および脾臓中シアロアドヘシン / M O M A - 1 + マクロファージ環を示す。かかる構造は、LT - LT R 依存性であり、したがって、投与した抗LT抗体活性の読み出し情報として使用できる。

【0408】

M O P C - 2 1 を注射したキメラ化 (h u S C I D) マウスは、野生型C 5 7 B L / 6 マウスに観察されたものに類似の脾臓中シアロアドヘシン / M O M A - 1 + 好金属マクロファージ環を有することが、M O M A - 1 染色陽性により証明された (図 2 A および 2 B 参照) 。組織学的分析により、ヒトLT 1 2 ブロックにより脾臓中M O M A - 1 + 好金属マクロファージが損失することが示された。h u S C I D マウスにm L T R - m I g を注射したLT R 阻害により、M O M A - 1 + 好金属マクロファージの消失に至った (図 2 C 参照) 。これは、抗体B B F 6 を注射したh u S C I D マウスでは反復せず、マウスLT 1 2 へのm A b をブロックし (図 2 D 参照) 、LT 1 2 源がヒトであることが確認された。ヒトLT 1 2 に対する新規抗体 (LT 1 0 2 およびLT 1 0 5) を注射したH u S C I D マウスにおいても、M O M A - 1 染色の類似の損失が示された (図 2 F および 2 G 参照) 。先行技術の抗ヒトLT抗体であるB9による処置では、M O M A - 1 + マクロファージ構造は損失しなかったことに留意されたい (図 2 E) 。

【0409】

高内皮細静脈 (H E V) は、リンパ節への細胞進入を補助する特殊構造である。これらの構造の発現および維持はLT R 発現に依存することが示されている。組織学的分析により、H E V はヒトLT 1 2 のブロックにて低下できたことが示された。キメラモデルにおいて、H E V は同様に野生型マウス (C 5 7 B L / 6) およびM O P C - 2 1 を注射したh u S C I D マウスに存在することが示され (図 3 A、B) 、それらはLT R - I g 処置 (m L T R - m I g G 1 を注射したh u S C I D マウス) で損失したため、低頻度ではあるが同様にLT R シグナル伝達に依存することが示された (図 3 C) 。予想どおり、h u S C I D マウスへの抗マウスLT 1 2 m A b (B B F 6) 投与は効果がなかった (図 3 D) 。LT 1 0 2 かLT 1 0 5 のいずれかを注射したh u S C I D マウスにおけるh u L T 1 2 のブロックによりH E V は有意に低下し (図 3 F および 3 G) 、一方、先行技術の抗体B9による処置では、H E V 構造に対して最小限の効果しか得

10

20

30

40

50

られなかった（図 3 E）。

【0410】

結論として、新規抗ヒトLT抗体であるLT102およびLT105は、ヒト疾患の治療にとって重要である可能性が高い対象などに対し、先行技術のmAbであるB9に勝るインビボ機能的活性を有することが示された。これにより、低減した密度のCD169+（シアロアドヘシン/MOMA-1/Siglec-1）マクロファージにより証明された。この結論は、低減したHEV密度および機能的PNAd/MAdCAM（リンパ節への輸送を中断した）によっても支持される。

（実施例4）

【0411】

抗リンボトキシン（LT）抗体LT105のヒト化

マウスLT105軽鎖および重鎖の配列を、以下に説明する。

【化8】

軽鎖：

```

1  DIVLTQSPAS  LAVSLGQRAT  ISCRASESVDNY
GI SFMHWYQQKP  GQPPKLLIYR  50
51  ASNLESGIPA  RFSGSGSRTD  FTLTINP      V
ET  DDVATFYCQQ  SNKDPYTFGG  100
101  GTKLEIK（配列番号：）

```

重鎖：

```

1  DVQLQESGPG  LVKPSQSLSL  TCSVTGYSIT  S
GY  YWNWIRQF  PGNKLEGMGY  50
51  ISYDGSNNYN  PSLKNRISIT  RDSSKNQFFL  K
LNSVTAEDSGTY  YCARDAYSYGM  100a
101  DYWGQGTSVT  VSS（配列番号：）

```

下線：カバットCDR残基

斜体：コチアCDR残基

太字：正準残基

本実施例を通して番号付けはカバット体系に応じる。

【0412】

マウス可変領域の分析

相補性決定領域（CDR）は、抗原に結合する可能性が最も高くかつ再加工した抗体に保持されているはずである残基を含む。CDRは、Kabateal（1991）に応じる配列に定義される。CDRは主要残基がCDRループの広範囲の立体構造を決定する正準クラス（Chothia et al., 1989）に該当する。これらの残基は、再加工した抗体中にほぼ常に保持される。重鎖および軽鎖のCDRを以下のとおり正準クラスに分類した。

【化9】

軽鎖：

L1： 15残基 クラス4

L2： 7残基 クラス1

L3： 9残基 クラス1

正準クラス

重鎖：

H1： 6（+5 クラス2
コチア）
残基

H2： 16残基 クラス1

H3： 9残基 なし

これらのCDRクラスにとって重要である正準残基を表4に示す。

10

20

30

40

【表 8】

表 4：正準残基 mAb LT105

L1	クラス 4	2(I)	25(A)	27b(V)	33(M)	71(F)
L2	クラス 1	48(I)	51(A)	52(S)	64(G)	
L3	クラス 1	90(Q)	95(P)			
H1	クラス 2	24(V)	26(G)	26(Y)	29(I)	34(W) 94(R)
H2	クラス 1	55(G)	71(R)			
H3	正準クラスなし					

【0413】

B L A S T プログラムならびにコンパイルされたコンセンサスおよび生殖系列ブラストタンパク質配列データベースを用いて、マウスとヒトサブグループの可変軽鎖および重鎖をコンセンサス (Kabat et al, 1991) および生殖系列配列 (Matsuda et al, 1998, Brensing-Kuppers et al, 1997) を比較した。

【0414】

可変軽鎖は、マウスサブグループ 3 のメンバーであり (111 個のアミノ酸重複にて 89 % 同一である ; CDR - L3 は通常より残基 1 個分短い)、以下に示すとおり、マウス mu21 - 5 生殖系列に由来する可能性が高い (99 個のアミノ酸重複にて 94 % 同一)。

mu21 - 5

LT105 : 1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVD
NYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL ES 60

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVD
+ YG SFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL ES

Mu21 - 5 : 1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVD
SYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL ES 60

LT015 : 61 GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVAT
FYCQQSNKDP 99

GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVE DDVAT
+ YCQQSN + DP

Mu21 - 5 : 61 GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVAT
YYCQQSNEDP 99

【0415】

可変重鎖は、マウスサブグループ重 1A のメンバーであり (117 個のアミノ酸重複にて 81 % 同一である ; CDR - H1 および CDR - H2 は通常よりそれぞれ残基 1 個分短い)、以下に示すとおり、マウス VH36 - 60 生殖系列に由来する可能性が高い (97 個のアミノ酸重複にて 81 % 同一)。

muVH36 - 60

LT105 : 1

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSTITSGYYWNWIR
QFPGNKLEGMGYISYDGSNNY 60

+ VQLQESGP LVKPSQ + LSLTCSVTG S
ITS Y WNWIR + FPGNKLE MGYISY GSY

muVH3 - 60 : 1 EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDS
ITSDY - WNWIRK FPGNKLEYMGYISYSGSTYY 59

LT105 : 61 NPSLKNRISITRDSSKNQFFFLKLN SVT
AEDSGTY YCAR 98

NPSLK + RISITRD + SKNQ + + L + LNSVT
+ ED + TYYCAR

muVH3 - 60 : 60 NPSLKSRI SITRDTSKNQYYLQLNSVT

SEDTATYYCAR 97

【0416】

可変軽鎖は、ヒトサブグループ 4 と相関し (111 個のアミノ酸重複にて 67% 同一である; CDR-L1 は通常より残基 2 個分短い)、以下に示すとおり、ヒト B3 生殖系列に最も近い (99 個のアミノ酸重複にて 66% 同一)。

huB3

LT105: 1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESV - -
DNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL 58

DIV+TQSP SLAVSLG+RATI+C++S+SV

+ + + WYQQKPGQPPKLLIY AS

huB3: 1 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLY
SSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR 60

LT105: 59 ESGIPARFSGSGSRDFTLTINPVEITDDVA
TFYCCQQSNKDP 99

ESG+P RFSGSGSGS TDFTLTI+ + + DVA

+YCCQP P

huB3: 61 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVA
VYCCQQYYSTP 101

【0417】

可変重鎖は、ヒトサブグループ重 2 と相関し (114 個のアミノ酸重複にて 69% 同一である; CDR-H1 は通常より残基 1 個分短い; CDR-H2 は通常より残基 3 個分短い)、以下に示すとおり、ヒト VH4-28 生殖系列に最も近い (98 個のアミノ酸重複にて 68% 同一)。

huVH4-28

LT105: 2

VQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGYSTITSGYYWNWIRQ
FPGNKLEGMGYISYDGSNNYN 61

VQLQESGPGGLVKPS +LSLTCS+V+GYSI+S +W WIR
Q PG LE +GYI Y GSYN

huVH4-28: 2

VQLQESGPGGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISSSNWWGWIRQ
PPGKGLEWIGYIYYSGSTYYN 61

LT105: 62 PSLKNRISITRDSSKNQFFFLKLNSVTA
EDSGTYYYCAR 98

PSLK+R++++ D+SKNQF LKL+SVTA

D+ YYCAR

huVH4-28: 62 PSLKSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTA
VDTA VYYCAR 98

【0418】

可変領域構造のモデリング

この LT105 可変領域モデルのヒト化を、モデラー、SCWRL 側鎖配置、ならびに Gromos96 43b1 パラメータ集合との真空における簡単な最小化を用いて、軽鎖および重鎖の結晶構造 PDB ID 2F58 に基づき構築した。2F58 と LT105 の CDR およびフレームワーク領域の長さは同じである。

【0419】

再加工した可変領域の分析

軽鎖および重鎖の抗体アクセプターフレームワーク配列を選別するため、正準、接触面およびベニヤゾーン残基におけるマウス LT105 配列との類似性が高い; 可能な場合、同じ長さの CDR (CDR-H3 を除く); 最少数の復帰変異 (すなわち、ヒトアクセプターのフレームワーク残基種類から LT105 成熟マウス抗体のフレームワーク残基種類

10

20

30

40

50

への変化)候補を特定した。FR4フレームワーク領域においてヒトコンセンサス残基で埋めたヒト生殖系列配列を同様に考慮した。

選別したフレームワーク：(コンセンサスヒトKV3 FR4を有する)ヒト生殖系列配列 huL6 およびヒト gi | 3004688 をそれぞれ軽鎖および重鎖のアクセプターフレームワークとして複数の候補から選択した(下記配列を参照されたい)。アクセプターフレームワークは安定したKV3 からより離れており、HV3 コンセンサスクラスをヒト化設計の物理化学特性を改善するために選別した。

>LT105L

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWY
QQKPGQPPLLIYRASNL~~ES~~GIPARFSGSGSGSRTDFTLTIN
PVEDDDVATFYCQQSNKDPYTFGGGTKLEIK

10

>huL6

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP
GQAPRLLIYDASN~~RAT~~GIPARFSGSGSGSGTDFTLTISSLEP
EDFAVYYC

>コンセンサスヒトKV3 FR4 領域

FGQGTKVEIK

>LT105H

DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGY~~SITSG~~YYWNWIRQ
FPGNKLEGMGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDSSKNQF
FLKLNSVTAEDSGTYYC~~ARDAYS~~YGMDYWGQGTSTVTVSS

20

>gi | 3004688

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYEMNWVRQA
PGKGLEWISYISNGDNTIYYADSVKGRFTISRDSA~~KN~~SLY
LHMHSLRAEDTAVYYCARGDYGGNGYFY~~YYA~~MDVWGQGT
VTVSS

CDR(コチア定義を含む)を下線で示す。

【0420】

LT105のヒト化設計

3つの異なる型のヒト化LT105軽鎖を以下に記載する。ヒト化LT105軽鎖は、生殖系列 huL6 フレームワーク / / コンセンサスヒトKV4 FR4 / / LT105 L CDRを含む。下記L1、L2、およびL3の復帰変異を小文字の太字フォントで示す。CDR(コチア定義を含む)を下線で示す。

30

【化10】

>L0=グラフト

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMHW
YQQKPGQAPRLLIYRASNL~~ES~~GIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCQQSNKDPYTFGQGTKVEIK(配列番号:)

>L1

dIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMHW
YQQKPGQAPRLLIYRASNL~~ES~~GIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCQQSNKDPYTFGQGTKVEIK(配列番号:)

40

>L2

dIVLTQSPATLSLSPGERATiSCRASESVDNYGISFMHW
YQQKPGQAPRLLIYRASNL~~ES~~GIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVfYCQQSNKDPYTFGQGTKVEIK(配列番号:)

>L3

dIVLTQSPATLSLSPGERATiSCRASESVDNYGISFMHW
YQQKPGQAPRLLIYRASNL~~ES~~GIPARFSGSGSrTDFTLT
ISSLEPEDFAVfYCQQSNKDPYTFGQGTKVEIK(配列番号:)

50

【 0 4 2 1 】

4つの異なる型のヒト化LT105重鎖を以下に記載する。ヒト化LT105重鎖はgi | 3004688フレームワーク//LT105 H CDRを含む。下記H1、H2、H3、およびH4の復帰変異を小文字の太字フォントで示す。CDR（コチア定義を含む）を下線で示す。

【化11】

>H0=グラフト

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GYSITSGYYWNWVR
QAPGKGLEWIS YISYDGSNNYNPSLKNRRFTISRDSA
KNS
LYLHMHSLRAEDTAVYYCAR DAYSYGMDYWGQGT
TVTVS
S（配列番号：）

10

>H1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA **v** S GYSITSGYYWNWVR
QAPGKGLE **g** I S YISYDGSNNYNPSLKNRRFTISRDSA
KNS
f YLHMHSLRAEDTAVYYCAR DAYSYGMDYWGQGT
TVTVS
S（配列番号：）

>H2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA **v** S GYSITSGYYWNW **i** R
QAPGKGLE **g** I **g** YISYDGSNNYNPSLKNR **i** TISRDSA
KNS
f YLHMHSLRAEDTAVYYCAR DAYSYGMDYWGQGT
TVTVS
S（配列番号：）

20

>H3

d VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA **v** **t** GYSITSGYYWNW **i** R
QAPGKGLE **g** I **g** YISYDGSNNYNPSLKNR **i** TISRDSA
KNS
f YLHMHSLRAEDTAVYYCAR DAYSYGMDYWGQGT
TVTVS
S（配列番号：）

>H4

d VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA **v** **t** GYSITSGYYWNW **i** R
QAPGKGLE **g** **m** **g** YISYDGSNNYNPSLKNR **i** TISRDSA
KNS
f YLH **I** HSLRAEDTAVYYCAR DAYSYGMDYWGQGT
TVTVS
S（配列番号：）

30

（実施例5）

【 0 4 2 2 】

抗リンホトキシン（LT）抗体LT102のヒト化

マウスLT102軽鎖および重鎖の配列を、以下に説明する。

【化 1 2】

軽鎖：

1 DVLMTQTPRS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIVH
 SNGN TYLEWYLQKP GQSPKLLIYK 50
 51 VSNRFS GVPD RFSGSGSGTD FTLKISR
 VEA EDLGVYYCFQ GSHFPWTFGG 100
 101 GTKLEIK (配列番号：)

重鎖：

1 EV KLVESGGG LVKPGGSLKL SCAVS GFTFS
 DY YMYWIRQT PEKRLEWVAT 50
 51 IGDGTSYTHYP DSVQGRFTIS RDYATNNLYL
 QMTSLRSEDALY YCAR DLGTGPF 100a
 101 AY WGQGT LVT VSA (配列番号：)

下線：カバットCDR残基

斜体：コチアCDR残基

太字：正準残基

本実施例を通して番号付けはカバット体系に応じる。

10

【0 4 2 3】

マウス可変領域の分析

相補性決定領域 (CDR) は、抗原に結合する可能性が最も高くかつ再加工した抗体に保持されているはずである残基を含む。CDRは、Kabat et al (1991) に応じた配列により定義する。CDRは主要残基がCDRループの広範囲の立体構造を決定する正準クラス (Chothia et al, 1989) に該当する。これらの残基は、再加工した抗体中にほぼ常に保持される。重鎖および軽鎖のCDRを以下のとおり正準クラスに分類した。

20

【化 1 3】

軽鎖：

重鎖：

L1： 16 残基 クラス4 H1： 5 残基 クラス1
 L2： 7 残基 クラス1 H2： 17 残基 クラス3
 L3： 9 残基 クラス1 H3： 9 残基 正準クラスなし

30

これらのCDRクラスにとって重要である正準残基を表1に示す。

【表 9】

表5

L1	クラス4	2(V)	25(S)	27b(I)	33(L)	71(F)	
L2	クラス1	48(I)	51(V「非定型」)			52(S)	64(G)
L3	クラス1	90(Q)	95(P)				
H1	クラス1	24(V)	26(G)	27(F)	29(F)	34(M)	94(R)
H2	クラス3	54(T「非定型」)		71(R)			
H3	正準クラスなし						

40

【0 4 2 4】

マウスおよびヒトサブグループのための可変軽鎖および重鎖をBLASTプログラムを用いて、コンセンサス (Kabat et al, 1991) および生殖系列配列 (Matsuda et al, 1998, Brensing-Kuppers et al, 1997) を含むデータベースを検索して、コンセンサスおよび生殖系列配列と比較した。生殖系列との比較のためCDRは配列から除外した。

【0 4 2 5】

LT102の可変軽鎖は、マウスサブグループ 2のメンバーであり (112個のアミノ酸重複にて94%同一)、マウスmucrl生殖系列に由来する可能性が高い (100個のアミノ酸重複にて97%同一)。LT102のVLとmucrlのVL間の比較を以下に示す。

50

m u c r l
 クエリー： 1 D V L M T Q T P R S L P V S L G D Q A S I S
 C R S S Q N I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F 6
 0
 D V L M T Q T P S L P V S L G D Q A S I S
 C R S S Q + I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F
 S b j c t (データベース配列) : 1 D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
 S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F
 6 0
 クエリー： 6 1 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D 10
 L G V Y Y C F Q G S H F P 1 0 0
 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D
 L G V Y Y C F Q G S H P
 データベース配列： 6 1 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D
 L G V Y Y C F Q G S H V P 1 0 0
 【 0 4 2 6 】
 可変重鎖は、マウスサブグループ重3Dのメンバーである(1 1 8 個のアミノ酸重複に
 て80%同一)、マウスVH37.1生殖系列に由来する可能性が高い(9 8 個のアミノ
 酸重複にて86%同一)。LT102のVHとVH37.1のVH間の比較を以下に示す
 。 20
 m u V H 3 7 . 1
 クエリー： 1 E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A V S G F T
 F S D Y Y M Y W I R Q T P E K R L E W V A T I G D G T S Y T H Y 6 0
 E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A S G F T
 F S Y M W + R Q T P E K R L E W V A T I G S Y T + Y
 データベース配列： 1 E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T
 F S S Y G M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S G G G S Y T Y Y 6 0
 クエリー： 6 1 P D S V Q G R F T I S R D Y A T N N L Y L Q M T S L R
 S E D T A L Y Y C A R 9 8
 P D S V + G R F T I S R D A N N L Y L Q M + S L R 30
 S E D T A L Y Y C A R
 データベース配列： 6 1 P D S V K G R F T I S R D N A K N N L Y L Q M S S L R
 S E D T A L Y Y C A R 9 8
 【 0 4 2 7 】
 可変軽鎖は、ヒトサブグループ2と関連し(1 1 2 個のアミノ酸重複にて77%同一
)、ヒトA3生殖系列に最も近い(1 0 0 個のアミノ酸重複にて76%同一)。LT10
 2のVLとhuA3のVLの比較を以下に示す。
 > h u A 3
 クエリー： 1 D V L M T Q T P R S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q N
 I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F 6 0 40
 D + + M T Q + P S L P V + G + A S I S C R S S Q +
 + + H S N G Y L + W Y L Q K P G Q S P + L L I Y S N R
 データベース配列： 1 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S
 L L H S N G Y N Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A 6 0
 クエリー： 6 1 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D
 L G V Y Y C F Q G S H F P 1 0 0
 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D
 + G V Y Y C Q P
 データベース配列： 6 1 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D
 V G V Y Y C M Q A L Q T P 1 0 0 50

【0428】

可変重鎖は、ヒトサブグループ重3と相関し(117個のアミノ酸重複にて72%同一)、ヒトVH3-21生殖系列に最も近い(98個のアミノ酸重複にて73%同一)。LT102のVHとhuVH3-21のVHの比較を以下に示す。

> huVH3-21

クエリー: 1 EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFT
FSDYYMYWIRQTPEKRLIEWVATIGDGTSYTHY 60

EV+LVESGGGLVKPGGSL+LSCA SGFT
FS Y M W+RQ P K LEWV++I +SY +Y

データベース配列: 1 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT
FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYY 60

クエリー: 61 PDSVQGRFTISRDIATNNLYLQMTSLR
SEDTALYYCAR 98

DSV+GRFTISRDA N+LYLQM SLR
+EDTA+YYCAR

データベース配列: 61 ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR
AEDTAVYYCAR 98

10

【0429】

可変領域構造のモデリング

LT102のヒト化においてLT102可変領域モデルを、モデラー、SCWRL側鎖配置、ならびにGromos96 43b1パラメータ集合との真空における簡単な最小化を用いて、軽鎖および重鎖の結晶構造PDB ID 1CLZに基づき構築した。1CLZはCDR-H3に残基を1個余分に有する。

20

【0430】

再加工した可変領域の分析

方法: 軽鎖および重鎖のための抗体アクセプターフレームワーク配列を選別するため、我々は抗体配列データベースおよびクエリーツールを用いて、正準、接触面およびベニヤゾーン残基におけるマウスLT102配列との類似性が最も高い適切な鋳型; 同じ長さのCDR(CDR-H3を除く); 最少数の復帰変異(すなわち、ヒトアクセプターのフレームワーク残基種類からLT102成熟マウス抗体のフレームワーク残基種類への変化)、およびいずれの位置(L4、38、43、44、58、62、65~69、73、85、98およびH2、4、36、39、43、45、69、70、74、92)にも復帰変異がない鋳型を特定した(Carter and Presta, 2000を参照されたい)。FR4領域におけるヒトコンセンサス残基で埋めたヒト生殖系列配列も同様に考慮した。

30

選別したフレームワーク: (コンセンサスHUMKV2 FR4を有する)ヒト生殖系列配列huA3および(コンセンサスHUMHV3 FR4を有する)ヒト生殖系列配列huVH3-11をそれぞれ軽鎖および重鎖のアクセプターフレームワークとして複数の候補から選択した。配列を以下に記載する。

> LT102L

DVLMTQTTPRSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGNTYLEW
YLQKPGQSPKLLIYKVSNNRFS GVPDRFSGSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLGVIYCFQGSHPFWTFGGGTGLEIK

> huA3

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNLYLDW
YLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS GVPDRFSGSGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDVGVYIC

> コンセンサスヒトKV2 FR4領域

FGQGTKEIK

> LT102H

40

50

E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A V S G F T F S D Y Y M Y W I R Q T
 P E K R L E W V A T I G D G T S Y T H Y P D S V Q G R F T I S R D Y A T N N L Y
 L Q M T S L R S E D T A L Y Y C A R D D L G T G P F A Y W G Q G T L V T V S A
 > h u V H 3 - 1 1

Q V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y Y M S W I R Q A
 P G K G L E W V S Y I S S S G S T I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R

> コンセンサスヒトHV3 FR4領域

W G Q G T L V T V S S

C D R (コチア定義を含む) を下線で示す。

10

この抗体において、すべての正準残基の復帰変異を回避できたわけではなかった：生殖系列 h u A 3 は L T 1 0 2 L と 3 個の正準残基 (L 2、2 7 b、5 1) が異なり、生殖系列 h u V H 3 - 1 1 は L T 1 0 2 H と 1 個の正準残基 (H 2 4) が異なる。

【0431】

再加工した可変軽鎖の 1 つの型を設計し、軽および重 C D R グラフト配列に加えて、4 つの型の再加工した可変重鎖を示した。重鎖において、第 1 の型は、最少数の復帰変異を含み、次の型は、より多くの復帰変異を含む (すなわちそれらは最小の「ヒト化」である)。すべての型の重鎖においてマウス A 1 1 3 を (ヒトHV FR4 に存在する) S 1 1 3 に置換し、これは復帰変異として分析しなかった。番号付けはカバット体系に従う。

【0432】

20

再加工した V L における復帰変異

ヒト化 L T 1 0 2 (h u L T 1 0 2) の再加工した軽鎖は、生殖系列 h u A 3 フレームワーク、コンセンサスヒトKV2 FR4、L T 1 0 2 L C D R を含む。h u 1 0 2 の軽鎖の復帰変異は、I 2 V を含む。V 2 は、C D R - L 1 を支持する正準残基である。

【0433】

再加工した V H における復帰変異

ヒト化 L T 1 0 2 (h u L T 0 1 2) の 4 つの型の再加工した重鎖は、それぞれ生殖系列 h u V H 3 - 1 1 フレームワーク、コンセンサスヒトHV3 FR4、および L T 1 0 2 H C D R を含む。

【0434】

30

L T 1 0 2 のヒト化設計

ヒト化 L T 1 0 2 軽鎖配列は、下記である (復帰変異に関する詳細については、上記を参照されたい)。L T 1 0 2 のヒト化軽鎖は、生殖系列 h u A 3 フレームワーク / / コンセンサスヒトKV2 FR4 / / L T 1 0 2 L C D R を含む。復帰変異を小文字の太字フォントで示す。C D R (コチア定義を含む) を下線で示す。

【化14】

> L 0 = グラフト

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q N I V H S N G N T Y L E
 W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L
 K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H F P W T F G Q G T K V E I K

40

> L 1

D v V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q N I V H S N G N T Y L E
 W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L
 K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H F P W T F G Q G T K V E I K

【0435】

4 つの異なる型のヒト化 L T 1 0 2 重鎖を以下に記載する。ヒト化 L T 1 0 2 重鎖は生殖系列 h u V H 3 - 1 1 フレームワーク / / コンセンサスヒトHV3 FR4 / / L T 1 0 2 H C D R を含む。下記 H 1、H 2、H 3、および H 4 の復帰変異を小文字の太字フォントで示す。C D R (コチア定義を含む) を下線で示す。

【化 1 5】

>H0=グラフト

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMYWIRQ
 APGKGLEWVSTIGDGTSTHYPDSVQGRFTISRDNAKNS
 LYLQMNSLR AEDTAVYYCARDLGTGPFAYWGQGT LVTVS
 S

>H1

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAvSGFTFSDYYMYWIRQ
 APGKGLEWVSTIGDGTSTHYPDSVQGRFTISRDNAKNS
 LYLQMNSLR AEDTAVYYCARDLGTGPFAYWGQGT LVTVS
 S

10

>H2

eVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAvSGFTFSDYYMYWIRQ
 APGKGLEWVSTIGDGTSTHYPDSVQGRFTISRDyAKNS
 LYLQMNSLR AEDTAVYYCARDLGTGPFAYWGQGT LVTVS
 S

>H3

eVkLVESGGGLVKPGGSLRLSCAvSGFTFSDYYMYWIRQ
 APGKGLEWVSTIGDGTSTHYPDSVQGRFTISRDyAKNS
 LYLQMNSLR AEDTAVYYCARDLGTGPFAYWGQGT LVTVS
 S

20

>H4

eVkLVESGGGLVKPGGSLRLSCAvSGFTFSDYYMYWIRQ
 APGKGLEWVSTIGDGTSTHYPDSVQGRFTISRDyAtNn
 LYLQMNSLR AEDTAVYYCARDLGTGPFAYWGQGT LVTVS
 S

(実施例 6)

【 0 4 3 6 】

可溶性改善のための改変

ヒト化 1 0 5 軽鎖と重鎖の組み合わせである L 0 H 1 (1 0 5 抗体の第 0 型の軽鎖 /
 1 0 5 抗体の第 1 型の重鎖) を発現および安定性試験のために選別した。

30

L 0

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NY
 GISFMHWY QQKPGQAPRL
 51 LIYRASNL ESGIPARFSGSG SGTDFTLTIS SL
 EPEDFAVY YCQQSNKDPY
 101 TFGQGKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SG
 TASVVCLL NNFYPREAKV
 151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS ST
 LTLISKADY EKHKVYACEV
 201 THQGLSSPVT KSFNRGEC

40

(配列番号 :)

H 1

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SG
 YYWNWVRQ APGKGLEGIS
 51 YISYDGSNNY NPSLKNRFTI SRDSAKNSFY LH
 MHS LR AED TAVYYCARD A
 101 YSYGMDYW GQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PS
 SKSTSGGT AALGCLVKDY
 151 FPEPVTVSWN SGALTSQGVHT FPAVLQSSGL YS
 LSSVVTVP SSSSLGTQTYI

50

201 CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PA
 PELLGGPS VFLFPKPKD
 251 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DG
 VEVHNAKT KPREEQYNST
 301 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP AP
 IEKTISKA KGQPREPQVY
 351 TLPSPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EW
 ESNGQPEN NYKTTTPVLD
 402 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EA
 LHNHYTQK SLSLSPG

10

(配列番号：)

ヒト化105のH1/L0型の可溶性は9.9mg/mlであることが見出された。分子の自己結合(およびしたがって不溶性)に携わると考えられるいくつかの軽鎖CDR残基を変異させた。軽鎖のCDRL2のカバット54位のRがKに変異した1つの型(A型)、CDRL2のカバット57位のNがSに変異した第2型(B型)、ならびにCDRL2に両変異を有する第3の型(カバット54位のKおよびカバット57位のSを含む; C型)を作製した。A型は28.6mg/mlで沈殿物を示さず、B型は34.9mg/mlで沈殿物を示さなかった。

A型

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NY
 GISFMHWY QQKPGQAPRL
 51 LIYKASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SL
 EPEDFAVY YCQQSNKDPY
 101 TFGQGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SG
 TASVVCLL NNFYPREAKV
 151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL ST
 LTLSKADY EKHKVVYACEV
 201 THQGLSSPVT KSFNRGEC

20

B型

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NY
 GISFMHWY QQKPGQAPRL
 51 LIYRASSLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SL
 EPEDFAVY YCQQSNKDPY
 101 TFGQGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SG
 TASVVCLL NNFYPREAKV
 151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL ST
 LTLSKADY EKHKVVYACEV
 201 THQGLSSPVT KSFNRGEC

30

C型

1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NY
 GISFMHWY QQKPGQAPRL
 51 LIYKASSLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SL
 EPEDFAVY YCQQSNKDPY
 101 TFGQGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SG
 TASVVCLL NNFYPREAKV
 151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL ST
 LTLSKADY EKHKVVYACEV
 201 THQGLSSPVT KSFNRGEC

40

【0437】

可溶性をさらに改善する試みにおいて、軽鎖のC型に見られるR54KとN57S C

50

DRL2変異の両方を含み、総電荷を増大するために選択される新規フレームワークも含む軽鎖の新規型を作製し、生成配列L10を得た。

L10

```

      1  A I Q L T Q S P S S   L S A S V G D R V T   I T C R A S E S V D   N Y
G I S F M H W Y   Q Q K P G K A P K L
      5 1  L I Y K A S S L E S   G V P S R F S G S G   S G T D F T L T I S   S L
Q P E D F A T Y   Y C Q Q S N K D P Y
     101  T F G Q G T K V E I   K R T V A A P S V F   I F P P S D E Q L K   S G
T A S V V C L L   N N F Y P R E A K V
     151  Q W K V D N A L Q S   G N S Q E S V T E Q   D S K D S T Y S L S   S T
L T L S K A D Y   E K H K V Y A C E V
     201  T H Q G L S S P V T   K S F N R G E C

```

軽鎖のL10型をH1と組み合わせた場合に、100mg/ml超の可溶性を示した。

L12およびL13を含む追加型の軽鎖も作製した。

L12

```

      1  D I Q L T Q S P S S   L S A S V G D R V T   I T C R A S E S V D   N Y
G I S F M H W Y   R Q K P G K A P K L
      5 1  L I Y K A S S L E S   G V P S R F S G R G   S G T D F T L T I S   S L
Q P E D F A T Y   Y C Q Q S N K D P Y
     101  T F G Q G T K V E I   K R T V A A P S V F   I F P P S D E Q L K   S G
T A S V V C L L   N N F Y P R E A K V
     151  Q W K V D N A L Q S   G N S Q E S V T E Q   D S K D S T Y S L S   S T
L T L S K A D Y   E K H K V Y A C E V
     201  T H Q G L S S P V T   K S F N R G E C

```

L13

```

      1  D I R L T Q S P S S   L S A S V G Q R V T   I S C R A S E S V D   N Y
G I S F M H W Y   R Q K P G K A P K L
      5 1  L I Y K A S S L E S   G V P S R F S G R G   S G T D F T L T I S   S L
Q P E D F A T Y   Y C Q Q S N K D P Y
     101  T F G Q G T K V E I   K R T V A A P S V F   I F P P S D E Q L K   S G
T A S V V C L L   N N F Y P R E A K V
     151  Q W K V D N A L Q S   G N S Q E S V T E Q   D S K D S T Y S L S   S T
L T L S K A D Y   E K H K V Y A C E V
     201  T H Q G L S S P V T   K S F N R G E C

```

H1と組み合わせたL12も100mg/mlで沈殿物を示さず、H1と組み合わせたL13は48mg/mlで沈殿物を示さなかった。H11およびH14を含むさらなる重鎖型も作製した。

H11

```

      1  E V Q L V E S G G G   L V Q P R G S L R L   S C A V S G Y S I T   S G
Y Y W N W I R Q   A P G K G L E W V S
      5 1  Y I S Y D G S N N Y   N P S L K N R F T I   S R D N S K N T F Y   L Q
M N N L R A E D   T A A Y Y C A R D A
     101  Y S Y G M D Y W G Q   G T T V T V S S A S   T K G P S V F P L A   P S
S K S T S G G T   A A L G C L V K D Y
     151  F P E P V T V S W N   S G A L T S G V H T   F P A V L Q S S G L   Y S
L S S V V T V P   S S S L G T Q T Y I
     201  C N V N H K P S N T   K V D K K V E P K S   C D K T H T C P P C   P A
P E L L G G P S   V F L F P P K P K D
     251  T L M I S R T P E V   T C V V V D V S H E   D P E V K F N W Y V   D G
V E V H N A K T   K P R E E Q Y N S T

```

3 0 1 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P
 I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
 3 5 1 T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 4 0 1 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A
 L H N H Y T Q K S L S L S P G
 H 1 4
 1 E V Q L Q E S G G G L V K P R G S L R L S C A V S G Y S I T S G
 Y Y W N W I R Q A P G K G L E W V S
 5 1 Y I S Y D G S N N Y N P S L K N R F S I S R D N S K N T F Y L K 10
 M N R L R A E D S A A Y Y C A R D A
 1 0 1 Y S Y G M D Y W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S
 S K S T S G G T A A L G C L V K D Y
 1 5 1 F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S
 L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I
 2 0 1 C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A
 P E L L G G P S V F L F P P K P K D
 2 5 1 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
 V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T
 3 0 1 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P 20
 I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y
 3 5 1 T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 4 0 1 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A
 L H N H Y T Q K S L S L S P G

L 1 0 と、H 1 1 または H 1 4 との組み合わせは、H 1 との組み合わせで観察されたより低い可溶性（それぞれ 3 . 7 および 2 8 m g / m l 超）を示した。さらなる組み合わせも試験した。データを下表に提示する。

【表 1 0】

重鎖/軽鎖の組み合わせ	可溶性(mg/ml)
H1/L0	9.9
H1/A 型	>28.6
H1/B 型	>34.9
H1/L10	>100
H1/L12	>100
H1/L13	>48
H11/L10	3.7
H11/L12	11
H11/L13	4.4
H14/L10	>28
H14/L12	>15

（実施例 7）

【0 4 3 8】

L T への抗体結合

以下の方法を用いて競合物の存在下における L T R 結合部位の利用可能性を決定した。

【0 4 3 9】

B i a c o r e チップ調製。すべての実験を B i a c o r e 3 0 0 0 機器を用いて実施した。B i a c o r e アミンカップリングキットを製造業者の説明書に従って用いて、抗

30

40

50

フラグ抗体 M2 を CM5 センサーチップ上に固定化した。簡単に述べると、抗体を 10 mM 酢酸塩 (pH 5.0) で 50 µg/ml に希釈し、30 µl を 1:1 N-ヒドロキシスクシンイミドイミド (NHS): 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-塩酸カルボジイミド (EDC) の 30 µl 注射で活性化されているチップ表面上に注射した。次いで、過剰な遊離アミン基を 1 M エタノールアミンの 50 µl 注射でキャッピングした。典型的な固定化レベルは 4000 ~ 6000 RU であった。すべての試料をアッセイ緩衝液 (10 mM HEPES pH 7.0 + 150 mM NaCl + 0.05% 洗剤 p-20 + 0.05% BSA) 中で調製した。これと同じ緩衝液を、試料分析中に流れる緩衝液として使用した。固定化のため、これと同じ緩衝液から BSA を除いたものを使用した。

10

Biacore 結合アッセイ。可溶性フラグタグ化 LT₁、LT₂ をアッセイ緩衝液で 200 nM に希釈し、M2 被覆表面上、または背景対照として非被覆表面上に流速 25 µl/分で注入した。緩衝液が表面上に 25 µl/分で流しつつ、表面を 2 分間安定させた。飽和濃度の競合物 (すなわち 8 µM LT-R-Ig、2 µM 抗体 LT105、4 µM 抗体 B9、4 µM 抗体 LT102 または 2 µM 抗体 9B4; 別々の実験において決定) を 25 µl/分で 3 分間注射した。やはりこの表面を流れる緩衝液下で 3 分間安定させた。安定化後、アッセイ緩衝液中 20 µM 単量体 LT-R を表面上に 25 µl/分で 4 分間注入した。次いで、3 M 塩酸グアニジンの 0.5 M KCl 溶液を 2 回注入して表面を再生成した。

各成分の結合の親和性捕獲した LT₁、LT₂ に対する化学量論を以下のとおり決定した。

20

(1) 利用可能な競合部位 = [(競合物分子量) / (リガンド分子量)] × (リガンド反応)

(2) 競合物結合 = (正味の競合物反応) / (利用可能な競合物部位)

(3) 利用可能な LT-R 部位 = [(LT-R 分子量) / (リガンド分子量)] × (正味のリガンド反応)

(4) LT-R 結合 = (正味の LT-R 反応) / (利用可能な LT-R 部位)

【0440】

これらの方法を用いて、LT₁、LT₂ 上の 2 つの LT-R 結合部位を特定し、LT-R に対する親和性により識別した (部位 1 は約 50 nM の親和性を示し、部位 2 は約 1500 nM の親和性を示した)。

30

【0441】

被験抗体は高い顕性親和性 (0.3 nM 以上) で結合する一方、被験 Fab 断片 (LT105 および B9) はインタクト抗体と比較して低い親和性 (2 nM 以下) で結合する。したがって、各被験抗体は単一の LT₁、LT₂ 三量体に二価的に高い親和性で結合する。

【0442】

下表に例証するように、結合した LT-R-Ig、LT105、LT102、または 9B4 の存在下では利用可能な LT-R 結合部位はなく、B9 の存在下では 1 つの LT-R 結合部位が利用可能のまま残る。したがって、先行技術の B9 抗体は二価の高い親和性で LT₁、LT₂ と相互作用できる一方、1 つの受容体結合部位しかブロックできない。一方、(本明細書において、LT の LT-R への結合をより完全にブロックすることが示されている) 結合した LT105、LT102、および 9B4 抗体の存在下では、利用可能な LT-R 結合部位はない。

40

【表 1 1】

競合物	モル等量 競合物結合	競合物の存在下におけるモル等量 LT β R 結合
LT β R-Ig	1.0	0
LT105	1.0	0
LT102	0.88	0.12
9B4	1.0	0
B9	0.78	1.2
競合物なし	N/A	1.5

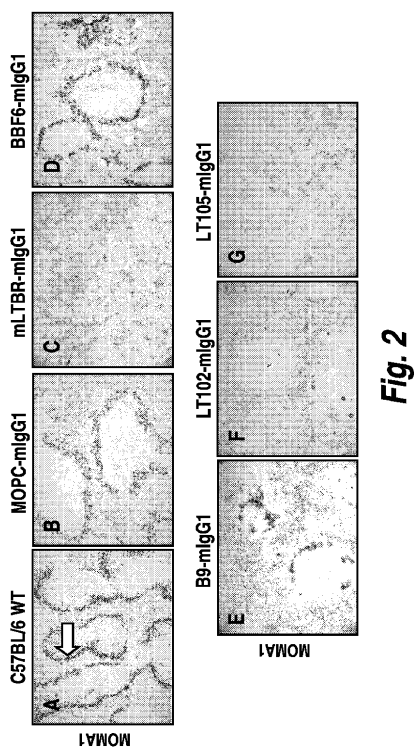
10

【0 4 4 3】

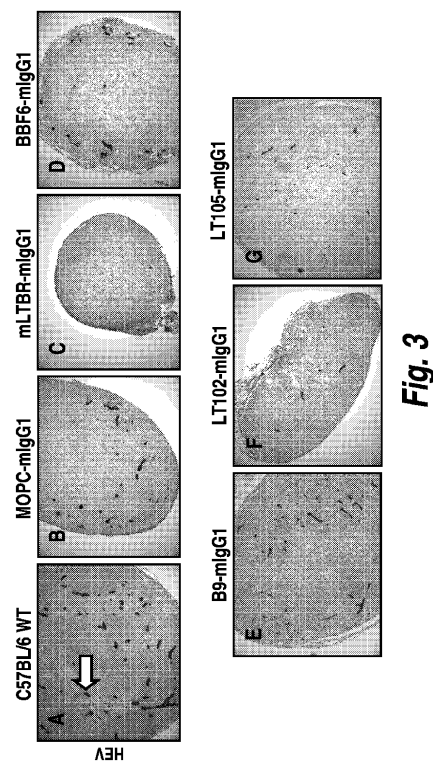
均等物

本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の多くの均等物を当業者は通例の実験のみ用いて認識するか、または確定できるであろう。かかる均等物が以下の特許請求の範囲に包含されることを意図する。

【図 2】



【図 3】



【図 1 A】

I L-8 放出アッセイにおける抗体の阻害曲線

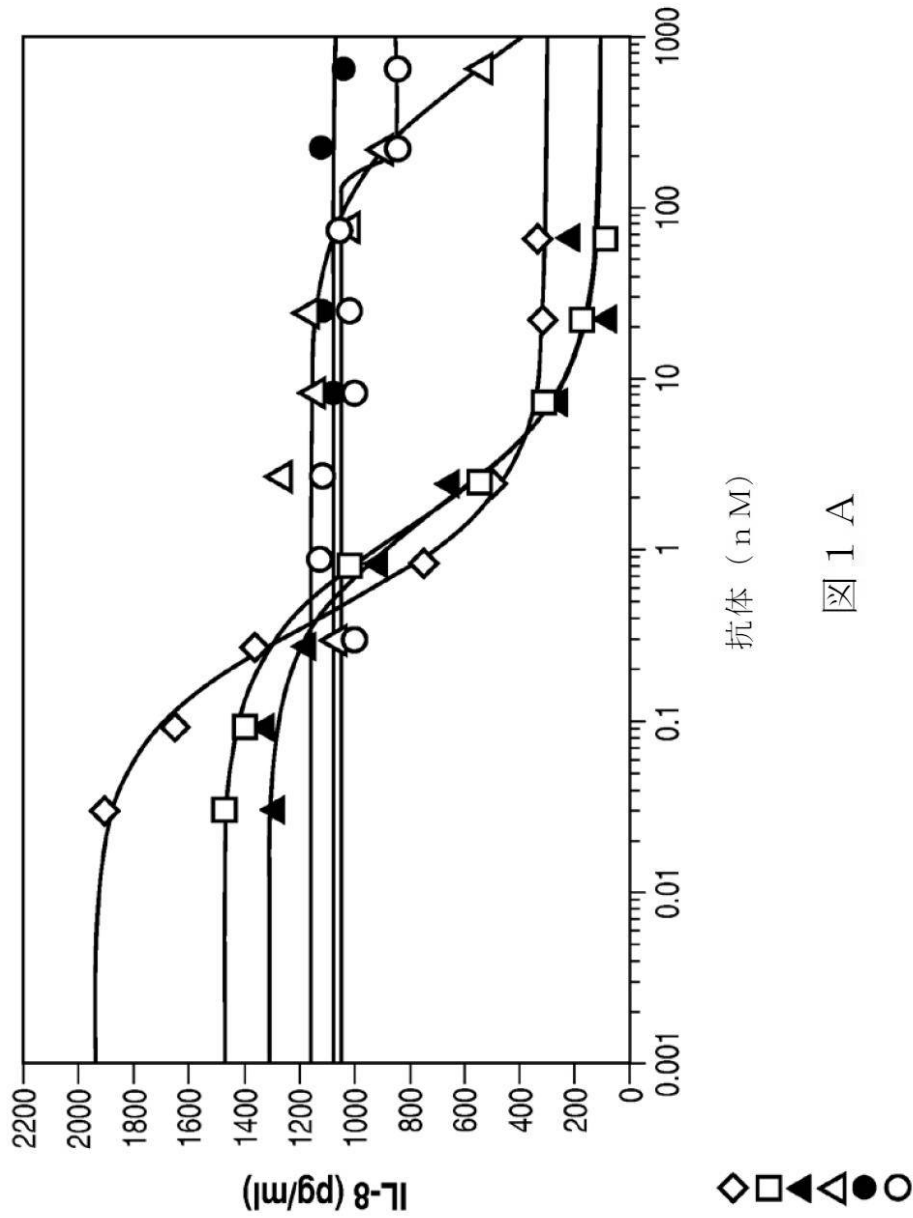


図 1 A

【図 1 B】

IL-8 放出アッセイにおける抗体の阻害曲線

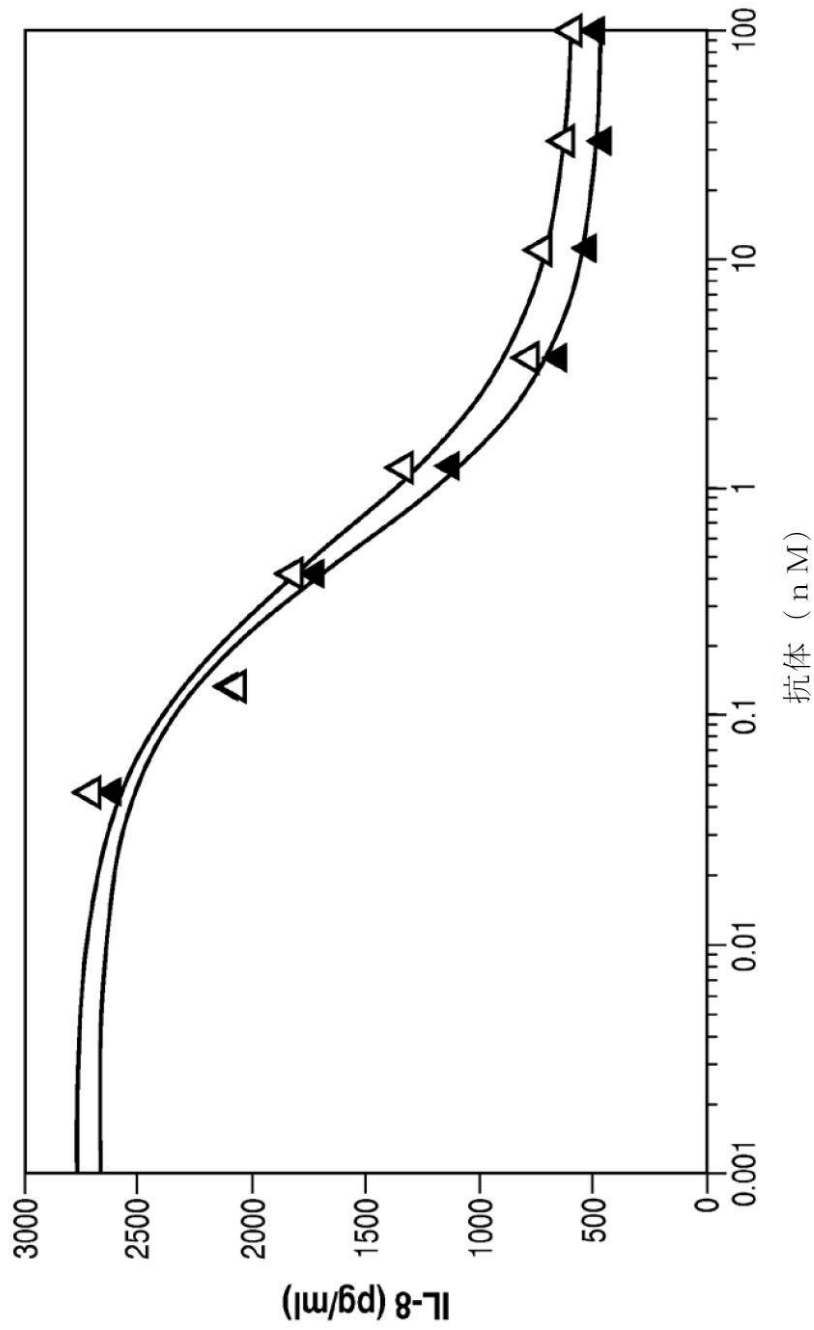


図 1 B

【図 1 C】

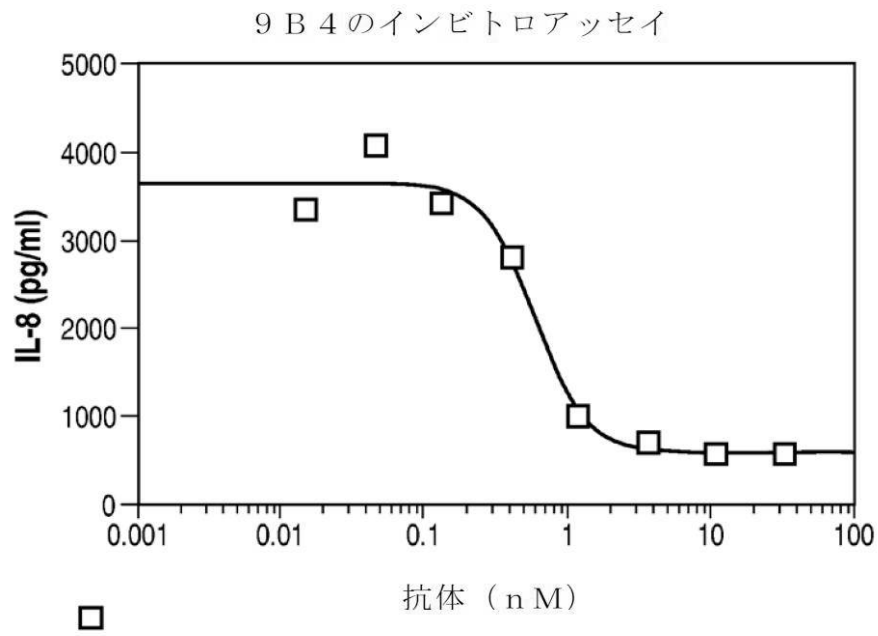


図 1 C

【図 4 A】

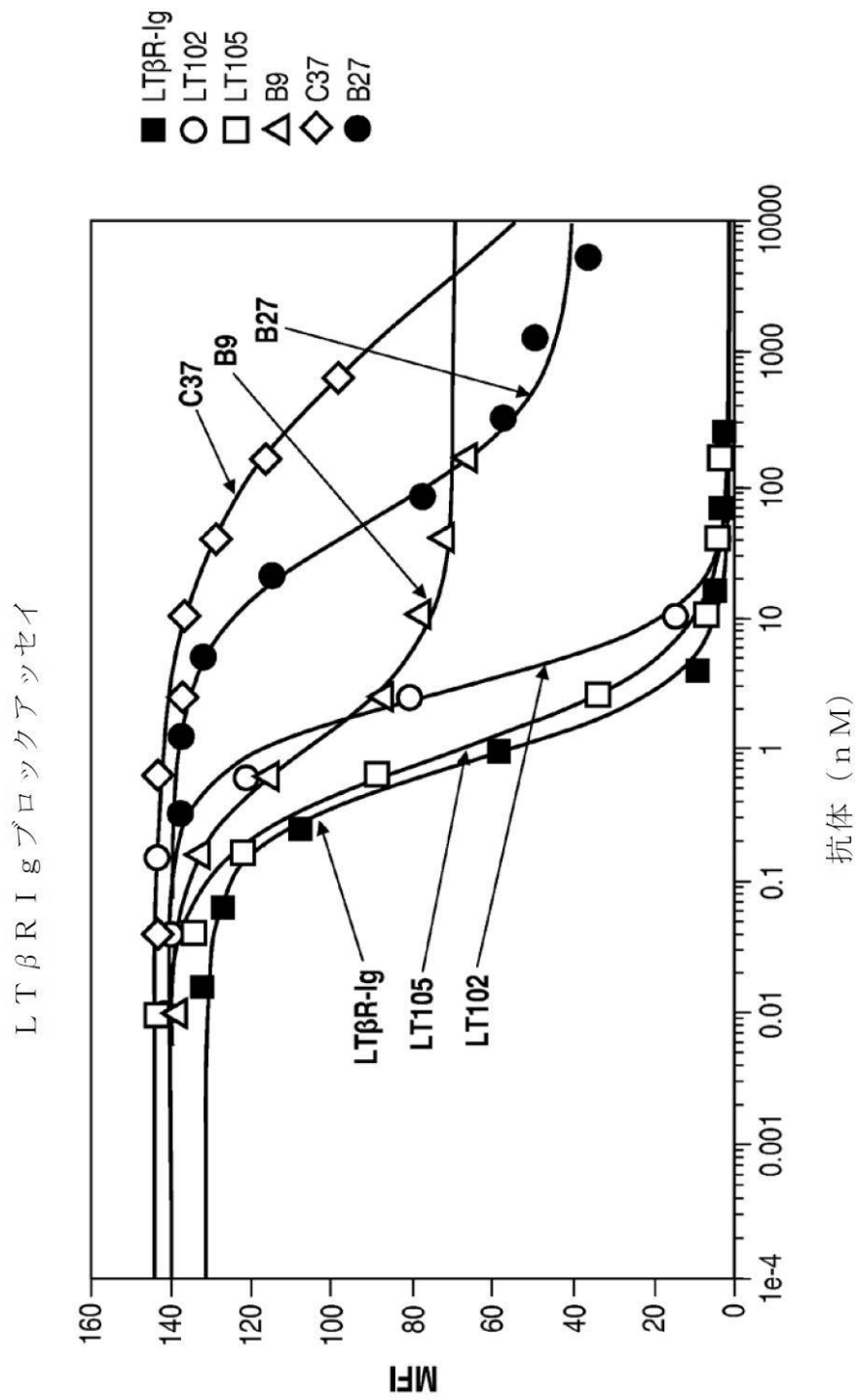


図 4

【図 4 B】

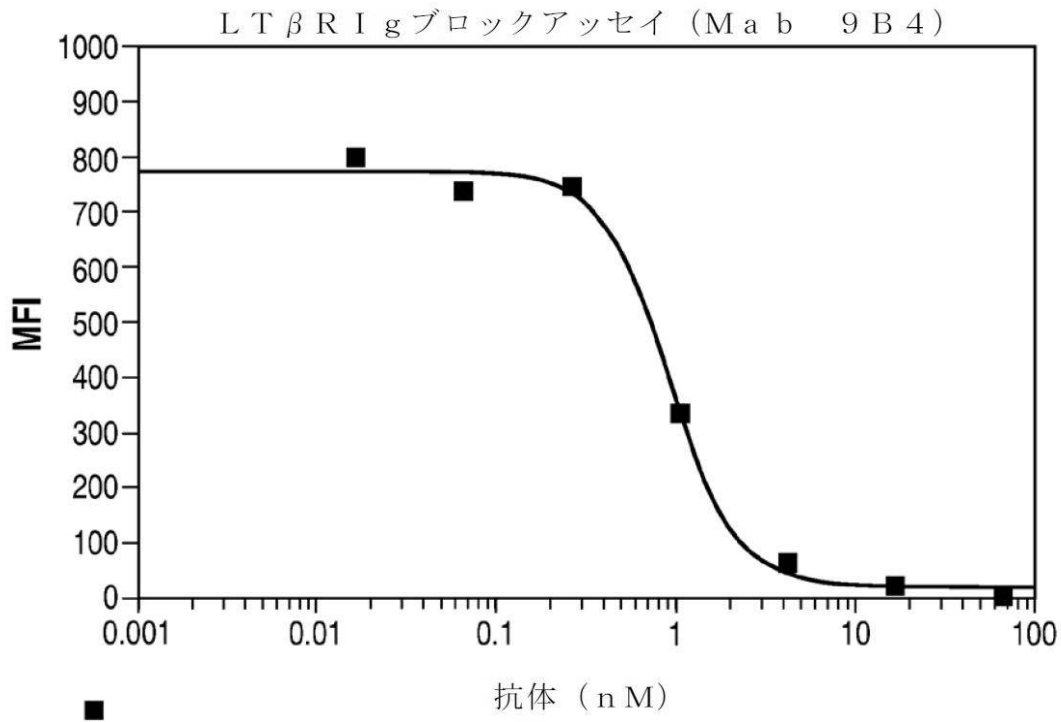


図 4 B

【 図 5 】

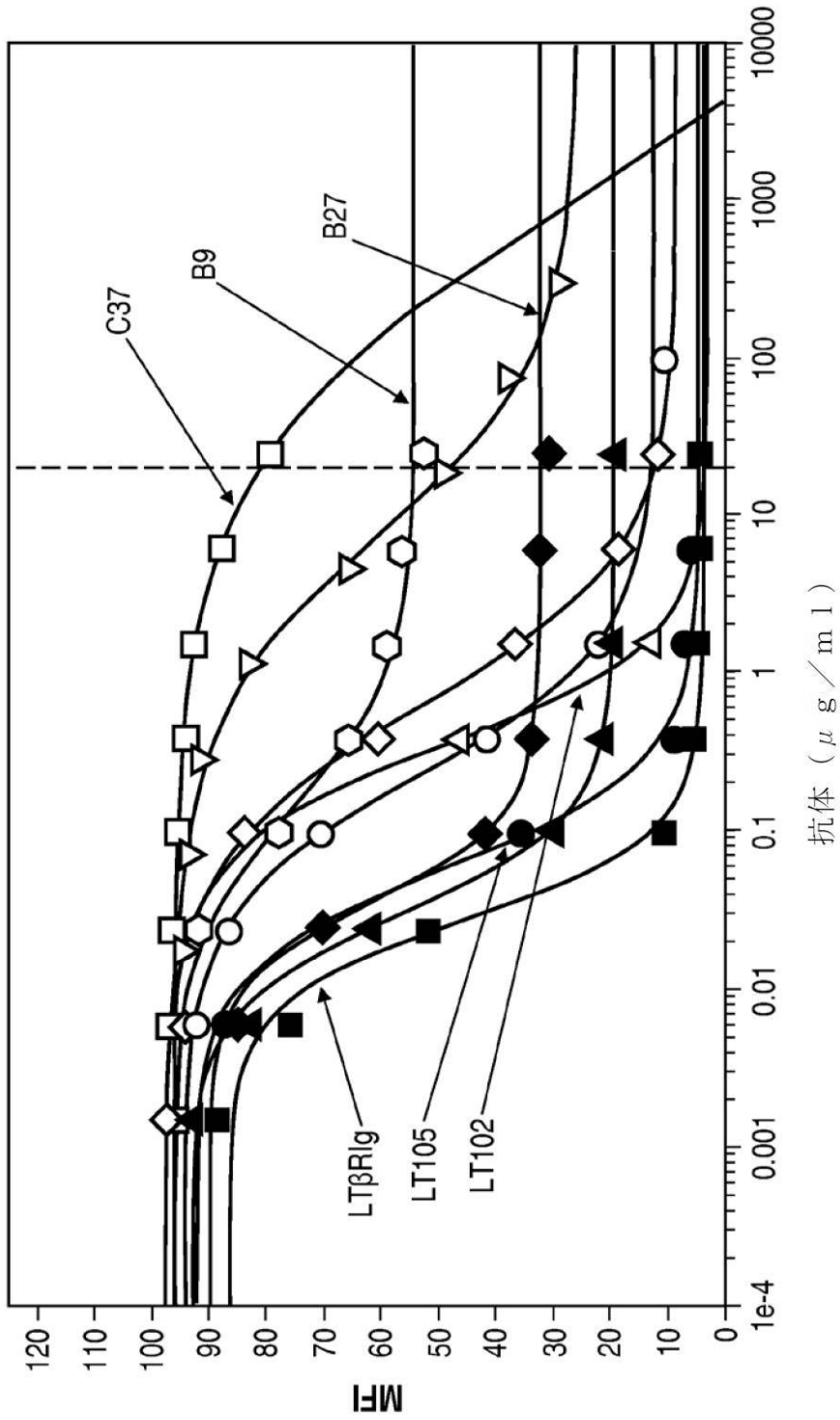


図 5

【図 6】

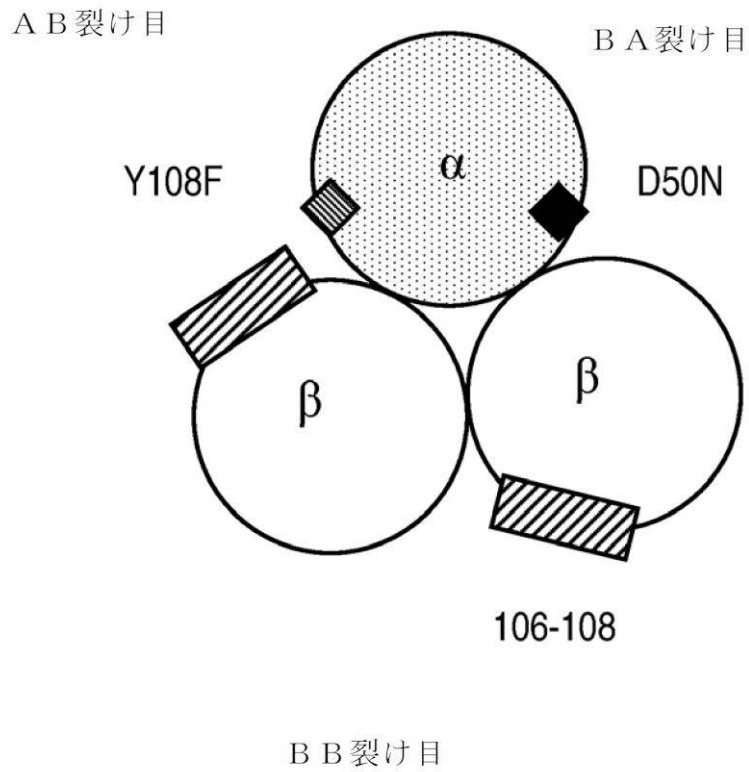


図 6

【手続補正書】

【提出日】平成23年8月30日(2011.8.30)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2012514458000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/069967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/24 A61P37/00 A61P35/00 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		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, 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	EP 1 488 799 A2 (BIOGEN INC [US]) 22 December 2004 (2004-12-22) pages 11-12, examples 6, 7, 10	1-20, 23-26, 32-35, 40, 42-46, 48, 49, 51-70
X	EP 0 335 263 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD [JP]) 4 October 1989 (1989-10-04) examples, claims	1-20, 23-26, 32-35, 40, 42-46, 48, 49, 51-70
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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 11 June 2010		Date of mailing of the international search report 21/06/2010
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 Bernhardt, Wiebke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/069967

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MACKAY F ET AL: "LYMPHOTOXIN BUT NOT TUMOR NECROSIS FACTOR FUNCTIONS TO MAINTAIN SPLENIC ARCHITECTURE AND HUMORAL RESPONSIVENESS IN ADULT MICE" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE LNKD- DOI:10.1002/EJI.1830270830, vol. 27, no. 8, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 2033-2042, XP002063546 ISSN: 0014-2980 * abstract; figure 4; table 2</p>	1-20, 23-26, 32-35, 40, 42-46, 48,49, 51-70
X	<p>WO 2004/002431 A2 (BIOGEN INC [US]; GARBER ELLEN [US]; SIMON KENNETH [US]; SALDANHA JOSE) 8 January 2004 (2004-01-08) examples, claims</p>	58,61-63
X	<p>DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL LNKD- DOI:10.1016/S1380-2933(96)00045-0, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 * abstract</p>	44-46, 48,49
A	<p>BROWNING JEFFREY L: "Inhibition of the lymphotoxin pathway as a therapy for autoimmune disease" IMMUNOLOGICAL REVIEWS, BLACKWELL PUBLISHING, MUNKSGAARD LNKD- DOI:10.1111/J.1600-065X.2008.00633.X, vol. 223, no. 1, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 202-220, XP002554450 ISSN: 0105-2896 [retrieved on 2008-07-08] the whole document</p>	1-20, 23-26, 32-35, 40, 42-46, 48,49, 51-70
A	<p>FU KAI ET AL: "Inhibition of the lymphotoxin-beta pathway is efficacious in the adenoviral-IFN alpha accelerated model of SLE" ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 58, no. 9, Suppl. S, September 2008 (2008-09), pages S314-S315, XP009132090 & 72ND ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN-COLLEGE-OF-RHEUMATOLOGY/43RD ANNUAL SCIENTIFIC MEETING; SAN FRANCISCO, CA, USA; OCTOBER 24 29, 2008 ISSN: 0004-3591 * abstract</p>	1-20, 23-26, 32-35, 40, 42-46, 48,49, 51-70

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/069967**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:

2. ☐ Claims Nos.:
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:

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).

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:

see additional sheet

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.:
19, 20, 23-26, 40, 42, 43, 51-55(completely); 1-18, 32-35, 44-46, 48, 49
56-70(partially)

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.:

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.

International Application No. PCT/US2009 /069967

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 19, 20, 40(completely); 1-18, 32-35, 49, 56-70(partially)

Antibody binding to lymphotoxin blocking lymphotoxin-induced biological activity referred to as antibody 102; antibody binding to LT epitope that is competitively blocked by said 102 antibody; lymphotoxin binding molecule with CDRs derived from said 102 antibody; composition comprising said antibody; medical use of said antibody; nucleic acid encoding said antibody; host cell comprising said nucleic acid in a vector; method of producing said antibody

2. claims: 21, 36(completely); 1-18, 32-35, 44-47, 50, 56-70(partially)

Antibody binding to lymphotoxin blocking lymphotoxin-induced biological activity referred to as antibody AOD9; antibody binding to LT epitope that is competitively blocked by said AOD9 antibody; lymphotoxin binding molecule with CDRs derived from said AOD9 antibody; composition comprising said antibody; medical use of said antibody; nucleic acid encoding said antibody; host cell comprising said nucleic acid in a vector; method of producing said antibody

3. claims: 22, 41(completely); 1-18, 32-35, 46, 50, 56-70(partially)

Antibody binding to lymphotoxin blocking lymphotoxin-induced biological activity referred to as antibody 101 or 103; antibody binding to LT epitope that is competitively blocked by said 101/103 antibody; lymphotoxin binding molecule with CDRs derived from said 101/103 antibody; composition comprising said antibody; medical use of said antibody; nucleic acid encoding said antibody; host cell comprising said nucleic acid in a vector; method of producing said antibody

4. claims: 23, 24, 42, 51-55(completely); 1-18, 32-35, 46, 48, 49, 56-70(partially)

Antibody binding to lymphotoxin blocking lymphotoxin-induced biological activity referred to as antibody 105; antibody binding to LT epitope that is competitively blocked by said 105 antibody; lymphotoxin binding molecule with CDRs derived from said 105 antibody; composition comprising said antibody; medical use of said antibody; nucleic acid encoding said antibody; host cell comprising said nucleic acid in a vector; method of producing said antibody

International Application No. PCT/US2009/069967

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA 210

5. claims: 25, 26, 43(completely); 1-18, 32-35, 44-46, 48, 49, 56-70(partially)

Antibody binding to lymphotoxin blocking lymphotoxin-induced biological activity referred to as antibody 9B4; antibody binding to LT epitope that is competitively blocked by said 9B4 antibody; lymphotoxin binding molecule with CDRs derived from said 9B4 antibody; composition comprising said antibody; medical use of said antibody; nucleic acid encoding said antibody; host cell comprising said nucleic acid in a vector; method of producing said antibody

6. claims: 27, 28, 39(completely); 1-18, 32-35, 46, 47, 49, 56-70(partially)

Antibody binding to lymphotoxin blocking lymphotoxin-induced biological activity referred to as antibody A1D5; antibody binding to LT epitope that is competitively blocked by said A1D5 antibody; lymphotoxin binding molecule with CDRs derived from said A1D5 antibody; composition comprising said antibody; medical use of said antibody; nucleic acid encoding said antibody; host cell comprising said nucleic acid in a vector; method of producing said antibody

7. claims: 29, 30, 38(completely); 1-18, 32-35, 44-47, 49, 56-70(partially)

Antibody binding to lymphotoxin blocking lymphotoxin-induced biological activity referred to as antibody 107; antibody binding to LT epitope that is competitively blocked by said 107 antibody; lymphotoxin binding molecule with CDRs derived from said 107 antibody; composition comprising said antibody; medical use of said antibody; nucleic acid encoding said antibody; host cell comprising said nucleic acid in a vector; method of producing said antibody

8. claims: 31, 37(completely); 1-18, 32-35, 44-47, 49, 56-70(partially)

Antibody binding to lymphotoxin blocking lymphotoxin-induced biological activity referred to as antibody 108; antibody binding to LT epitope that is competitively blocked by said 108 antibody; lymphotoxin binding molecule with CDRs derived from said 108 antibody; composition comprising said antibody; medical use of said antibody; nucleic acid encoding said antibody; host cell comprising said nucleic acid in a vector; method of producing said antibody

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/069967

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1488799	A2	22-12-2004 SI 840616 T1	30-04-2005
EP 0335263	A2	04-10-1989 NONE	
WO 2004002431	A2	08-01-2004 AU 2003248782 A1	19-01-2004
		CA 2491480 A1	08-01-2004
		CN 1678625 A	05-10-2005
		EP 1539793 A2	15-06-2005
		JP 2005532051 T	27-10-2005
		NZ 537965 A	30-04-2008
		US 2006222644 A1	05-10-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 14/525 (2006.01)	C 0 7 K 14/525	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	C 0 7 K 14/54	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ランガー , アン エム .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 5 , ブライトン , リッチフィールド ストリート 7

(72)発明者 ガーバー , エレン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8 - 1 3 5 2 , ケンブリッジ , ドネル ストリート 1 4

(72)発明者 ルゴフスコイ , アレクセイ アレクサンドロビッチ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 1 , ウォバーン , センター ストリート 2 4

(72)発明者 アルント , ジョセフ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 9 6 0 - 4 4 8 3 , ピーボディー , マウント パーノン ストリート 4 4

(72)発明者 カラベラ , ジャスティン エー .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 1 - 2 1 2 1 , ケンブリッジ , シャラッパ ストリート 1 2 1

(72)発明者 タイラー , フレデリック アール .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 8 6 , ミルトン , ガリバー ストリート 9 8

(72)発明者 アントネッティ , ジョバンナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 3 5 - 3 0 3 1 , フォックスボロ , サマー ストリート 7

(72)発明者 デイ , エリック
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 - 4 7 3 4 , ケンブリッジ , ヘイスティングス スクエア 5 , アpartment 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 BA61 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 EA02
EA03 EA04 GA11

4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25
CA44
4C085 AA13
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA02 DA14 DA75 DA76 EA22 EA27
EA28 FA74