

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6738348号
(P6738348)

(45) 発行日 令和2年8月12日 (2020.8.12)

(24) 登録日 令和2年7月21日 (2020.7.21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13 Z N A

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 27 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-551379 (P2017-551379)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月18日 (2015.12.18)
 (65) 公表番号 特表2018-502598 (P2018-502598A)
 (43) 公表日 平成30年2月1日 (2018.2.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/002504
 (87) 国際公開番号 W02016/097865
 (87) 国際公開日 平成28年6月23日 (2016.6.23)
 審査請求日 平成30年12月13日 (2018.12.13)
 (31) 優先権主張番号 62/094,649
 (32) 優先日 平成26年12月19日 (2014.12.19)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 517213876
 リジェネサンス ベスローテン フェンノ
 ートシャップ
 オランダ国 3723 イーイー ビル
 トホーフェン、スウェーリンクラール 2
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 バース、フランク
 オランダ国、ヒルフェルスム、スリナムラ
 ール 17アー
 (72) 発明者 ファン、ダイク、マーク、アー、
 オランダ国、ビルトホーフェン、ハーイラ
 ール 16

審査官 中野 あい

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト C 6 に結合する抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト C 6 に結合する単離された抗体であって、前記抗体が、それぞれ配列番号 6、7、および 8 に示される重鎖 C D R 1、2、および 3 配列を含み、それぞれ配列番号 11、12、および 13 に示される軽鎖 C D R 1、2、および 3 配列を含む、抗体。

【請求項 2】

配列番号 52 の残基 835 ~ 854 の全てまたは一部を含有するヒト C 6 の領域に結合する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 3】

配列番号 1、配列番号 2、および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含むエピトープに結合する、請求項 1 または 2 に記載の単離された抗体。

【請求項 4】

配列番号 1、配列番号 2、および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含むエピトープに結合し、前記エピトープが不連続である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の単離された抗体。

【請求項 5】

以下の特性のうち少なくとも 3 つを呈する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の単離された抗体：

(a) 溶血アッセイにおいて $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以下の IC_{50} を有すること、

10

20

(b) 表面プラズモン共鳴によって決定した場合に 1×10^{-8} M 以下の K_D を有すること、

(c) 表面プラズモン共鳴によって決定した場合に 40 時間以上の抗体 - C6 結合半減期を有すること、および

(d) カニクイザル C6 と交差反応すること。

【請求項 6】

ヒト化抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか に記載の単離された抗体。

【請求項 7】

(a) 配列番号 30 の重鎖可変領域と配列番号 31 の軽鎖可変領域とを含む抗体、
 (b) 配列番号 32 の重鎖可変領域と配列番号 33 の軽鎖可変領域とを含む抗体、
 (c) 配列番号 34 の重鎖可変領域と配列番号 35 の軽鎖可変領域とを含む抗体、
 (d) 配列番号 36 の重鎖可変領域と配列番号 37 の軽鎖可変領域とを含む抗体、
 (e) 配列番号 38 の重鎖可変領域と配列番号 39 の軽鎖可変領域とを含む抗体、
 (f) 配列番号 40 の重鎖可変領域と配列番号 41 の軽鎖可変領域とを含む抗体、
 (g) 配列番号 42 の重鎖可変領域と配列番号 43 の軽鎖可変領域とを含む抗体、および

10

(h) 配列番号 44 の重鎖可変領域と配列番号 45 の軽鎖可変領域とを含む抗体、からなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか に記載の単離された抗体。

【請求項 8】

(a) 前記重鎖可変領域が、配列番号 30、32、34、36、38、40、42、44、および 46 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

20

(b) 前記軽鎖可変領域が、配列番号 31、33、35、37、39、41、43、45、および 47 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか に記載の単離された抗体。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項において特許請求される、ヒト C6 に結合する抗体の軽鎖、重鎖、または軽鎖と重鎖との両方の可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む、発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の発現ベクターによって形質転換された細胞。

30

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体と、担体と、を含む、組成物。

【請求項 12】

対象において膜侵襲複合体 (MAC) 形成または活性を阻害するための医薬組成物であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を、有効な量で含む、医薬組成物。

【請求項 13】

対象において補体系の望まれない活性によって媒介される障害の症状を治療、防止、または低減するための医薬組成物であって、有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 14】

対象において神経の再生を刺激するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、医薬組成物。

40

【請求項 15】

対象において損傷または変性した神経の回復を促進するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 16】

対象において神経の変性を低減または遅延させるための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 17】

前記対象が、前記神経の物理的傷害を患っている、請求項 14、15、及び 16 のい

50

れかに記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記物理的傷害が、外傷性傷害、外科的傷害、または非外傷性傷害である、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記傷害が、末梢神経系（PNS）に対するものである、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記傷害が、中枢神経系（CNS）に対するものである、請求項 18 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 21】

前記抗体が、傷害部位にまたはその付近に投与される、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記対象が、免疫媒介性炎症性障害または進行性神経変性障害を患っている、請求項 14、15、及び 16 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記障害が後天性である、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記障害が遺伝性である、請求項 22 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 25】

前記障害が慢性脱髄性神経障害である、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記障害が神経変性障害である、請求項 22 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

神経変性障害が、絞扼性神経障害、手根管症候群、ギランバレー症候群（GBS）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害（CIDP）、多発性硬化症（MS）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、シャルコー - マリー - トゥース病（遺伝性運動感覚ニューロパチー；HMSN）又はハンチントン病（HD）である、請求項 26 に記載の医薬組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願

本出願は、2014年12月19日出願の米国仮特許出願第62/094,649号に対する優先権を主張し、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

補体系は、有機体からの病原体のクリアランスにおいて抗体および食細胞を支援または「補完」するように機能する自然免疫系の一部である。この系が活性化されると、触媒的な一連の反応および相互作用が生じ、これが、破壊のための活性化細胞、有機体、または粒子の標的化をもたらす。補体系は、調節されたカスケード系において共に作用して病原体（例えば、細菌）の細胞外形を攻撃する、30個を超える血漿および膜タンパク質のセットを含む。補体系は、膜侵襲経路として知られる共通の終末非酵素的経路で合流する、古典的経路および代替経路という2つの明確に異なる酵素的活性化カスケードを含む。

40

【0003】

古典的経路として知られる第1の酵素的に活性化されたカスケードは、いくつかの成分C1、C4、C2、C3、およびC5（経路中の順番で列挙）を含む。補体系の古典的経路の始動は、免疫活性因子および非免疫活性因子の両方による第1の補体成分（C1）の結合および活性化に続いて起こる。C1は、成分C1q、C1r、およびC1sのカルシウム依存性複合体を含み、C1q成分の結合を介して活性化される。C1qは、6つの同

50

ーサブユニットを含有し、各サブユニットは、3つの鎖（A鎖、B鎖、およびC鎖）を含む。各鎖は、コラーゲン様の尾部に接続する球状頭部領域を有する。抗原 - 抗体複合体によるC1qの結合および活性化は、C1q頭部群領域を介して起こる。タンパク質、脂質、および核酸を含む多数の非抗体C1q活性剤は、コラーゲン様の茎領域にある固有の部位を介してC1qに結合し、それを活性化する。C1qrs複合体はその後、補体成分C4およびC2の活性化を触媒し、C3転換酵素として機能するC4b2a複合体を形成する。

【0004】

代替経路として知られる第2の酵素的に活性化されたカスケードは、補体系活性化および増幅のための急速な抗体依存性経路である。代替経路は、いくつかの成分C3、B因子、およびD因子（経路中の順番で列挙）を含む。代替経路の活性化は、C3のタンパク質分解性に切断された形態であるC3bが細菌などの活性化表面媒介物に結合されるときに起こる。B因子はその後、C3bに結合され、D因子によって切断されて、活性酵素Baを生む。次に酵素Baは、より多くのC3を切断してより多くのC3bを生成し、活性化表面上にC3b - Ba複合体の広範な沈着をもたらす。

【0005】

このように、古典的補体経路と代替的補体経路との両方が、C3因子をC3aとC3bとに分割するC3転換酵素を産生する。この時点で、両C3転換酵素は更に、集合してC5転換酵素（C4b2a3bおよびC3b3bBb）となる。これらの複合体は、続いて補体成分C5を切断し、C5aポリペプチド（9kDa）およびC5bポリペプチド（170kDa）という2つの成分にする。C5aポリペプチドは、元来は白血球と関連付けられ、現在は肝細胞および神経細胞を含む様々な組織上で発現されることが知られている。7回膜貫通Gタンパク質タンパク質共役受容体に結合する。C5a分子は、ヒト補体系の主要な走化性成分であり、白血球走化性、平滑筋収縮、細胞内シグナル伝達経路の活性化、好中球 - 内皮接着、サイトカインおよび脂質メディエータ放出、ならびにオキシダント形成を含む様々な生体応答を誘発し得る。

【0006】

より大きいC5b断片は、補体カスケードのより後の成分C6、C7、C8、およびC9に順に結合して、C5b - 9膜侵襲複合体（「MAC」）を形成する。この親油性のC5b - 9MACは、赤血球を直接的に溶解させ得、より高い量では、白血球の溶解を起こし、筋、上皮細胞、および内皮細胞などの組織に有害である。溶解量を下回る量では、C5b - 9MACは、接着分子の上方調節、細胞内カルシウム増加、およびサイトカイン放出を刺激し得る。加えて、溶解濃度を下回る濃度では、C5b - 9MACは、細胞溶解を引き起こさずに内皮細胞などの細胞および血小板を刺激し得る。C5aの非溶解効果およびC5b - 9MACは、同等かつ互換的である。

【0007】

補体系は健康維持に重要な役割を有するが、疾患を引き起こすかそれに寄与する可能性を有する。例えば、研究により、補体カスケードの阻害または補体成分の枯渇が、中枢神経系の神経変性疾患において、または実験的脳傷害において損傷を低減させることが示されている（例えば、Feasby, T. E. et al. (1987) Brain Res. 419: 97 - 103、Vriesendorp, F. J. et al. (1995) J. Neuroimmunol. 58: 157 - 165、Jung, S. et al. (1995) Neurosci. Lett. 200: 167 - 170、Dailey, A. T. et al. (1998) J. Neurosci. 18: 6713 - 6722、Woodruff, T. M. et al. (2006) FASEB J. 20: 1407 - 1417、Leinhase, I. et al. (2006) BMS Neurosci. 14: 7: 55を参照）。具体的には、C6を欠乏しているために膜侵襲複合体（MAC）を形成することができないラットは、脱髄または軸索損傷のいずれも呈さず、マッチしたC6充足ラットと比較したときに多発性硬化症についての抗体媒介性実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）における有意に低減した臨床スコアを呈する（Mead, R. J.

10

20

30

40

50

et al. (2002) J. Immunol. 168: 458 - 465)。しかしながら、単核細胞浸潤のレベルは、C6充足マウスに見られるレベルと同等であった。Meadら(2002)は、脱髄および軸索損傷が、抗体の存在下で起こり、C6の欠乏によって阻害することができるMAC沈着を含む補体カスケード全体の活性化を必要とすると結論付けた。

【0008】

したがって、C6を阻害するための試薬が必要であり、様々な治療目的に望ましい。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、膜侵襲複合体(MAC)の形成がインビトロおよびインビボの両方で阻害されるようにC6の機能活性を効果的に阻害する能力、ならびに非常に低い K_D (例えば、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 5×10^{-10} M以下)、および非常に長い半減期(例えば、40時間以上)を含む、治療目的に望ましい機能特性を有する抗C6抗体を提供する。38個の抗ヒトC6抗体のパネルを、精製したヒトC6タンパク質によるラットの免疫付与によって生成した。これら38個のうち2個が、膜侵襲複合体(MAC)形成の阻害を示した。これらの所望の機能特性を有する1個の特定のラット抗ヒトC6を成長させ(本明細書では7E5と称する)、ヒト化mAbである8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、および7F02を含む、7E5のCDRを保持するヒト化抗体のパネルを調製した。これら8個のヒト化mAbの重鎖および軽鎖可変領域、ならびにヒト化mAb 7C02の重鎖可変領域およびヒト化mAb 7G08の軽鎖可変領域は、81個全ての可能性のある「ミックスアンドマッチ」コンビネーションにおいて発現され、81個全ての対が、C6機能活性を効果的に阻害することが示された。更に、7E5のエピトープをヒトC6内でマッピングした。

【0010】

したがって、一態様では、本発明は、ヒトC6に結合する単離された抗体に関連し、本抗体は、以下の特性：

- (a) 溶血アッセイにおいて $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以下の IC_{50} を有すること、
- (b) 表面プラズモン共鳴によって決定した場合に 1×10^{-8} M以下の K_D を有すること、
- (c) 表面プラズモン共鳴によって決定した場合に40時間以上の抗体-C6結合半減期を有すること、および
- (d) カニクイザルC6と交差反応すること、のうちの少なくとも3つを呈する。

【0011】

上記の特定のうちの少なくとも3つの任意の組み合わせが包含される。一実施形態では、本抗体は、特性(a)、(b)、および(c)を呈する。別の実施形態では、本抗体は、特性(a)、(b)、(c)、および(d)を呈する。他の実施形態では、本抗体は、表面プラズモン共鳴によって決定した場合に 1×10^{-9} M以下または 5×10^{-10} M以下の K_D を有する。

【0012】

別の実施形態では、本発明は、配列番号52の残基835~854の全てまたは一部を含有するヒトC6の領域に結合する単離された抗体(即ち、本抗体は残基835~854内の1つ以上の残基に結合する)に関連する。別の実施形態では、本抗体は、配列番号1、配列番号2、および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含むエピトープに結合する(即ち、本抗体は、配列番号1、配列番号2、または配列番号3内の1つ以上のアミノ酸残基に結合する)。ある特定の実施形態では、エピトープは、抗体によって認識される不連続エピトープの一部である。例えば、一実施形態では、本抗体は、配列番号1、配列番号2、および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含むエピトープに結合し、このエピトープは不連続である。

【0013】

更に別の実施形態では、本発明は、ヒトC6への結合について、配列番号5に示される重鎖可変領域および配列番号10に示される軽鎖可変領域（即ち、mAb 7E5の重鎖および軽鎖可変領域）を含む抗体と交差競合する抗体を提供する。更に他の実施形態では、本発明は、ヒトC6への結合について、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、および7F02からなる群から選択されるmAbと交差競合する抗体を提供する。

【0014】

様々な実施形態において、本発明の抗体は、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体である。

【0015】

様々な実施形態において、本発明の抗体は、それぞれ配列番号6、7、および8に示される重鎖CDR1、2、および3配列を含み、それぞれ配列番号11、12、および13に示される軽鎖CDR1、2、および3配列を含む。例えば、本抗体は、前述のCDRを含むヒト化抗体であり得る。

【0016】

別の態様では、本発明は、ヒトC6に結合する単離された抗体を提供し、本抗体は、配列番号8に示される重鎖CDR3と配列番号13に示される軽鎖CDR3とを含む。本抗体は、配列番号7に示される重鎖CDR2と配列番号12に示される軽鎖CDR2とを更に含み得る。本抗体は、配列番号6に示される重鎖CDR1と配列番号11に示される軽鎖CDR1とを更に含み得る。前述のCDRを含む抗体の代表例としては、

- (a) 配列番号30の重鎖可変領域と配列番号31の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (b) 配列番号32の重鎖可変領域と配列番号33の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (c) 配列番号34の重鎖可変領域と配列番号35の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (d) 配列番号36の重鎖可変領域と配列番号37の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (e) 配列番号38の重鎖可変領域と配列番号39の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (f) 配列番号40の重鎖可変領域と配列番号41の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (g) 配列番号42の重鎖可変領域と配列番号43の軽鎖可変領域とを含む抗体、および

(h) 配列番号44の重鎖可変領域と配列番号45の軽鎖可変領域とを含む抗体、が挙げられる。

【0017】

更に別の態様では、本発明は、

(a) 配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、および46からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

(b) 配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、および47からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、ヒトC6に結合する単離された抗体を提供する。

【0018】

他の実施形態では、この重鎖および軽鎖可変領域は、前述のアミノ酸配列と95%、96%、97%、98%、または99%同一である。別の実施形態では、単離された抗体は、

(a) 重鎖可変領域が、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、および46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(b) 軽鎖可変領域が、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、および47からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むものである。

【0019】

本発明の抗体の軽鎖、重鎖、または軽鎖と重鎖との両方の可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター、およびかかる発現ベクターによって形質転換された宿主細胞、ならびに形質転換された宿主細胞を使用する抗体の組み換えによる発現方法も、本発明に包含される。一実施形態では、本発明の抗体は、Fab断片として発現される。別

10

20

30

40

50

の実施形態では、本発明の抗体は、IgG4 (S228P) 定常領域を持つものなどのIgG4アイソタイプ抗体などの全長抗体として発現される。

【0020】

本発明の抗体および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物などの、本発明の抗体を含む組成物も包含される。

【0021】

別の態様では、本発明は、本発明の抗体を使用する方法に関連する。一実施形態では、本発明は、対象において膜侵襲複合体(MAC)形成または活性を阻害する方法を提供し、本方法は、対象に、本発明の抗体を、対象においてMAC形成または活性を阻害するのに有効な量で投与することを含む。別の実施形態では、本発明は、対象において補体系の望まれない活性によって媒介される障害の症状を治療、防止、または低減する方法を提供し、本方法は、対象に、有効量の本発明の抗体を投与することを含む。

10

【0022】

別の実施形態では、本発明は、対象において神経を再生する方法を提供し、本方法は、対象に治療有効量の本発明の抗体を投与することを含む。更に別の実施形態では、本発明は、対象において損傷または変性した神経の回復を促進する方法を提供し、本方法は、対象に治療有効量の本発明の抗体を投与することを含む。更に別の実施形態では、本発明は、対象において神経の変性を低減または遅延させる方法を提供し、本方法は、対象に治療有効量の本発明の抗体を投与することを含む。

【0023】

20

一実施形態では、対象は、外傷性傷害(例えば、事故による)、外科的傷害、または非外傷性傷害(例えば、神経圧迫)などの神経の物理的傷害を患っている。一実施形態では、傷害は、末梢神経系(PNS)に対するものである。別の実施形態では、傷害は、中枢神経系(CNS)に対するものである。一実施形態では、抗体は、傷害部位にまたはその付近に投与される。

【0024】

別の実施形態では、対象は、免疫媒介性炎症性障害または進行性神経変性障害を患っている。一実施形態では、障害は後天性である。別の実施形態では、障害は遺伝性である。一実施形態では、障害は、多発性硬化症(MS)などの慢性脱髄性神経障害である。別の実施形態では、障害は、重症筋無力症または筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性障害である。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A】ヒトC6で免疫付与した2匹の異なるラット由来の38のハイブリドーマからの上清を使用する溶血アッセイの結果を示す棒グラフであり、これは、上清11(7E5 mAbを産生する)が最も強い阻害効果を有することを示す。

【図1B】ヒトC6で免疫付与した2匹の異なるラット由来の38のハイブリドーマからの上清を使用するマンナン活性化補体ELISAの結果を示す棒グラフであり、これは、上清11(7E5 mAbを産生する)が最も強い阻害効果を有することを示す。

【図2】ヒトC6への組み換えラット7E5の結合についてのピアコア動態を示すグラフである。

40

【図3A】27B1 mAbと7E5 mAbとの間のエピトープ交差遮断実験についての結果を示すグラフであり、7E5が27B1とは異なるエピトープを占有することを示す。

【図3B】27B1 mAbと7E5 mAbとの間のエピトープ交差遮断実験についての結果を示すグラフであり、7E5が27B1とは異なるエピトープを占有することを示す。

【図3C】27B1 mAbと7E5 mAbとの間のエピトープ交差遮断実験についての結果を示すグラフであり、7E5が27B1とは異なるエピトープを占有することを示す。

50

【図3D】27B1 mAbと7E5 mAbとの間のエピトープ交差遮断実験についての結果を示すグラフであり、7E5が27B1とは異なるエピトープを占有することを示す。

【図4A】ペプチド418の場所を示す、ヒトC6部分アミノ酸配列（配列番号50）およびラットC6部分アミノ酸配列（配列番号51）の整列である。

【図4B】ペプチド418の場所を示す、ヒトC6タンパク質の模式図である。

【図5】溶血アッセイによって測定して、7E5がヒトC6を補充したC6欠乏ラットにおいてインビボでC6を遮断することを示す棒グラフである。ラットは指示量のヒトC6および抗体7E5を受けた。補体活性をY軸上にプロットし、O.D. 1.0は感作赤血球の最大溶解を示し、O.D. 0は溶解の不在を示す。

【図6A】ラット抗C5 7E5 mAbの重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号5）とヒトVH3__1生殖細胞系列（配列番号48）との整列であり、差異を示す。ヒト化を目的とするアミノ酸交換を整列の下に示す。

【図6B】ラット抗C5 7E5 mAbの軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号10）とヒトVk2__5生殖細胞系列（配列番号49）との整列であり、差異を示す。ヒト化を目的とするアミノ酸交換を整列の下に示す。

【図7A】9個のヒト化7E5変異型VH鎖および9個のヒト化7E5変異型VL鎖（それぞれ図7Aおよび7Bに示す）の81個全ての可能性のある組み合わせの阻害活性を示す、溶血アッセイの結果を示す棒グラフである。

【図7B】9個のヒト化7E5変異型VH鎖および9個のヒト化7E5変異型VL鎖（それぞれ図7Aおよび7Bに示す）の81個全ての可能性のある組み合わせの阻害活性を示す、MAC ELISAアッセイの結果を示す棒グラフである。

【図8A】7E5重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号5）と、ヒト化7E5変異型7C02（配列番号46）、7E11（配列番号42）、7E12（配列番号32）、7F02（配列番号44）、7F06（配列番号38）、7F11（配列番号40）、7G09（配列番号34）、8F07（配列番号36）、および8G09（配列番号30）の重鎖アミノ酸配列との整列である。保存されたCDR1、2、および3領域を示す。

【図8B】7E5軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号10）と、ヒト化7E5変異型7E11（配列番号43）、7E12（配列番号33）、7F02（配列番号45）、7F06（配列番号39）、7F11（配列番号41）、7G08（配列番号47）、7G09（配列番号35）、8F07（配列番号37）、および8G09（配列番号31）の軽鎖アミノ酸配列との整列である。保存されたCDR1、2、および3領域を示す。

【図9】野生型7E5ラットF'Abの親和性と比較した、ヒトC6についての8のヒト化F'Abの親和性（Biacore）を示す。

【図10】インビボの神経挫滅実験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、有益な機能特性を呈する抗C6抗体を提供する。これらの機能特性には、例えば、(a)溶血アッセイにおける $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以下の IC_{50} 、(b)表面プラズモン共鳴によって決定した場合の $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 以下の K_D 、(c)表面プラズモン共鳴によって決定した場合の40時間以上の抗体-C6結合半減期、および/または(d)カニクイザルC6との交差反応が含まれる。他の実施形態では、本抗体は、特定の重鎖および軽鎖可変領域および/またはCDR配列を含む。例えば、81個全ての可能性のある鎖の「ミックスアンドマッチ」コンビネーションにおいて有効なC6阻害活性を呈する9個のヒト化重鎖および9個のヒト化軽鎖可変領域が提供される。更に他の実施形態では、抗C6抗体は、7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、または7F02などの本明細書に開示の特定の抗C6抗体と同じエピトープに結合するか、またはC6への結合についてそれと競合する。

【0027】

本発明がより容易に理解され得るように、まずある特定の用語を定義する。追加の定義

10

20

30

40

50

は、発明を実施するための形態にわたって示す。

【0028】

用語「C6」（「C6補体」または「C6補体成分」とも称する）は、C5b、C7、C8、およびC9成分と結合してC5b-C9膜侵襲複合体（MAC）を形成する補体カスケードの成分を指す。用語「C6」は、自然に発現されるC6の任意の変異型またはアイソフォームを含む。本発明の抗体は、ヒトCD6に特異的であってもよく、他の種とのいずれの交差反応性も呈しない場合がある。あるいは、本発明の抗体は、カニクイザルなどのヒト以外の種からのC6と交差反応してもよい。あるいは、本発明の抗体は、カニクイザルなどの霊長類からのC6と交差反応するが、マウスまたはラットC6などの非霊長類C6とは交差反応しない場合がある。C6、またはその任意の変異型およびアイソフォームは、それらを自然に発現する細胞または組織から単離するか、または当該技術分野で周知の技法を使用して組み換えによって生産してもよい。Genbank（登録商標）（受諾番号NP_00110860.3）は、以下の通りヒトC6のアミノ酸を報告している（配列番号52）。

10

【化1】

```

1 marrsvlyfi llnalinkgq acfedhyawt qwtscsktcn sgtqsrhrqi vvdkyyqenf
61 ceqicskqet recnwqrcpi ncllgdfgpw sdcddpciekq skvrsvlrps qfggqpctap
121 lvafqpcips klckieeadc knkfrcdsgf ciarklecng endcgdnsde rdcgrtkavc
181 trkynpipsv qlmgngfhfl ageprgevl d nsftggickt vkssrtsnpy rvpanlenvg
241 fevqtaeddl ktdfykdlt lghnenqqgs fssqggssfs vpifysskrs eninhnsafk
301 qaiqashkdd ssfirihkvm kvlnfttkak dlhlsvflk alnhlpleyn salysrifdd
361 fgthyftsgs lggvydillyq fsseelknsg lteeeakhcv rietkkrvlf akktkvehrc
421 ttnklsekhe gsfiqgaeks islinggrse ygaalawekg ssgleektfs ewlesvkenp
481 avidfelapi vdlvrnipca vtrknnlrka lqeyaakfdp cqcacpcnng rptlsgtecl
541 cvcqsqgyge ncekqsdyk snavdgqwg c wsswstcdat ykrsrtrecn npapqrggkr
601 cegekrqeed ctfsimenng qpcinddeem kevdlpeiea dsqcpqpvpp engfirnekq
661 lylvgedvei scltgfetvg yqyfrclpdg twrqgdvecq rtecikpvvq evltitpfqr
721 lyrigesiel tckpgfvvag psrytcqgns wtppisnslt cekdtltklk ghcqlgqkqs
781 gsecicmspe edcshhsedl cvfdtdsndy ftspackfla ekclnnqqlh flhigscqdg
841 rqlewglert rlssnstkke scgydtcydw ekcsastskc vcllppqcfk ggnqlycvkm
901 gsstsektln icevgtirca nrkmeilhpg kcla

```

20

30

【0029】

「抗体」という用語は、本明細書で言及する場合、全抗体および任意の抗原結合断片（即ち、「抗原結合部分」）またはその一本鎖を含む。「抗体」は、1つの好ましい実施形態では、ジスルフィド結合によって相互接続した少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質またはその抗原結合部分を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略記）および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、CH1、CH2、およびCH3という3つのドメインから構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略記）および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、CLという1つのドメインから構成される。V_HおよびV_L領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存された領域が組み入れられた、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域に更に細分することができる。V_HおよびV_Lは各々、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列された3つのCDRおよび4つのFRから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1成分（C1q）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

40

【0030】

50

抗体の「抗原結合部分」（または単純に「抗体部分」）という用語は、本明細書で使用される場合、抗原（例えば、ヒトC6）に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。かかる「断片」は、例えば、約8～約1500アミノ酸長、好適には約8～約745アミノ酸長、好適には約8～約300、例えば、約8～約200アミノ酸、または約10～約50、若しくは100アミノ酸長である。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語内に包含される結合断片の例としては、(i) V_L 、 V_H 、 C_L 、および $CH1$ ドメインからなる一価断片であるFab断片、(ii) ヒンジ領域にてジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片である $F(ab')_2$ 断片、(iii) V_H および $CH1$ ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームの V_L および V_H ドメインからなるFv断片、(v) V_H ドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341: 544 - 546)、ならびに(vi) 単離された相補性決定領域CDR、または(vii) 任意選択で合成リンカーによって接合されてもよい2つ以上の単離されたCDRの組み合わせが挙げられる。更に、 V_L および V_H のFv断片の2つのドメインは、別個の遺伝子によってコードされるが、これらは、これらを、 V_L および V_H 領域が対形成して一価分子を形成する単一タンパク質鎖として作製することを可能にする合成リンカーによって、組み換え法を使用して接合され得る(一本鎖Fv(scFv)として知られ、これについては、例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423 - 426、およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883を参照されたい)。かかる一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることが意図される。これらの抗体断片は、当業者に既知の従来の技法を使用して得られ、断片は、完全抗体と同じ様式で可用性についてスクリーニングされる。抗原結合部分は、組み換えDNA技法によって、または完全免疫グロブリンの酵素的若しくは化学的切断によって生産され得る。

【0031】

「二重特異性」または「二官能性抗体」は、2つの異なる重ノ軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工のハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab断片の結合を含む様々な方法によって生産することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315 - 321 (1990)、Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547 - 1553 (1992)を参照されたい。

【0032】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す抗体を指す。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、単一の結合特異性を示し、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および任意選択の定常領域を有する抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合されたヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得たB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【0033】

「組み換え抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、組み換え手段によって調製、発現、作出、または単離される全てのキメラ、ヒト化、およびヒト抗体を含み、これは、(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそれから調製されたハイブリドーマについてトランスジェニックであるかまたは染色体導入した動物（例えば、マウス）から単離された抗体、(b) 抗体を発現するように形質転換した宿主細胞から、例えば、トランスフェクトマから単離した抗体、(c) 組み換えのコンビナトリアルヒトまたはヒト化抗体ライブラリから単離した抗体、ならびに(d) 他のDNA配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作出、または単離された抗体などである。

【0034】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列配列からのフレームワーク領域および非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ）からのCDRを有する抗体を指し、例えば、ヒトフレームワーク領域および/またはCDRが結合を最適化するために特定の部位指向性の突然変異生成を受けた抗体を含む。ヒト化抗C6抗体の調製の例示的な説明は、実施例8に記載する。

【0035】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列の可変領域および定常領域（存在する場合）を有する抗体を含む。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロの無作為な若しくは部位特異的な突然変異生成によって、またはインビボの体細胞突然変異によって導入される突然変異）を含み得る（Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859）、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101、Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93、およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546を参照されたい）。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列における抗体がヒトフレームワーク配列に移植された抗体（即ち、ヒト化抗体）を含まない。

【0036】

「単離された抗体」は、本明細書で使用される場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことが意図される（例えば、ヒトC6に特異的に結合する単離された抗体は、ヒトC6以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、エピトープに特異的に結合する単離された抗体は、異なる種からの他のC6タンパク質への交差反応性を有し得る。しかし、抗体は、常にヒトC6に結合することが好ましい。加えて、単離された抗体は、典型的には、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まない。本発明の一実施形態では、異なるC6特異性を有する「単離された」抗体の組み合わせは、明確に定義された組成で組み合わせられる。

【0037】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原の部位を指す。エピトープは、タンパク質の3次の折り畳みによって並列された連続アミノ酸または非連続アミノ酸の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒への露出の際に保持されるが、3次の折り畳みによって形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒による処理の際に失われる。エピトープは、典型的には、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のアミノ酸を固有の空間的配座で含む。どのエピトープが所与の抗体によって結合されるのかを決定するための方法（即ち、エピトープマッピング）は、当該技術分野で周知であり、例えば、免疫プロットおよび免疫沈降アッセイを含み、これにおいては、C6からの重複または連続ペプチドを所与の抗C6抗体との反応性について試験する。エピトープの空間的配座を決定する方法には、当該技術分野における技法および本明細書に記載の技法、例えば、X線結晶学および2次元核磁気共鳴が含まれる（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照）。

【0038】

「不連続エピトープ」という用語は、不連続アミノ酸で構成されるエピトープを指す。例えば、このエピトープは、配座的に折り畳まれるときに、抗体が各領域内で1つ以上の残基に結合するように（近接して）まとめられるヒトC6の複数の領域からの残基を含んでもよい。

【0039】

「エピトープマッピング」という用語は、抗体 - 抗原認識のための分子決定基の特定の過程を指す。

【0040】

2つ以上の抗体に関する「同じエピトープに結合する」という用語は、抗体が抗原への結合について競合し、アミノ酸の同じ重複または包括する連続または不連続セグメントに結合することを意味する。当業者であれば、「同じエピトープに結合する」という語句が、必ずしも抗体が全く同じアミノ酸に結合することを意味するものではないことを理解する。抗体が結合する正確なアミノ酸は異なり得る。例えば、第1の抗体は、第2の抗体によって結合されるアミノ酸のセグメントによって完全に包括されるアミノ酸のセグメントに結合し得る。別の例では、第1の抗体は、その第2の抗体によって結合されるその1つ以上のセグメントと大きく重複するアミノ酸の1つ以上のセグメントに結合する。本明細書の目的では、かかる抗体は、「同じエピトープに結合する」と見なされる。

10

【0041】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」、および「特異的に結合する」という用語は、所定の抗原上のエピトープへの抗体結合を指す。典型的には、本抗体は、組み換えヒトC6を分析物として、本抗体をリガンドとして使用して、B I A C O R E 2000計器における表面プラズモン共鳴 (S P R) 技術によって決定した場合、約 10^{-7} M 未満、例えば、約 10^{-8} M、 10^{-9} M、若しくは 10^{-10} M 未満、または更にそれ未満の平衡解離定数 (K D) で結合し、所定の抗原または近縁の抗原以外の非特異的抗原 (例えば、B S A、カゼイン) への結合についてのその親和性を少なくとも2倍上回る親和性で所定の抗原に結合する。「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」という語句は、本明細書では「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に使用される。

20

【0042】

「K_D」という用語は、本明細書で使用される場合、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離平衡定数を指すことが意図される。典型的には、本発明の抗体は、組み換えヒトC6を分析物として、本抗体をリガンドとして使用して、B I A C O R E 2000計器における表面プラズモン共鳴 (S P R) 技術によって決定した場合、解離平衡定数 (K_D) が約 10^{-8} M 以下、若しくは 10^{-9} M 以下、若しくは 10^{-10} M 以下、または更にそれ以下でC6に結合する。

30

【0043】

「k_d」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体 / 抗原複合体からの抗体の解離についての解離速度定数を指すことが意図される。

【0044】

「k_a」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体の抗原との会合についての会合速度定数を指すことが意図される。

【0045】

「I C₅₀」という用語は、本明細書で使用される場合、所与の生体応答を半分に阻害するために、インビトロアッセイにおいてもインビボアッセイにおいても必要とされる、抗体またはその抗原結合部分の濃度を指す。つまり、これは、抗体またはその抗原結合部分の半抑制 (h a l f m i n i m a l) (50%) 阻害濃度 (I C) である。

40

【0046】

本明細書で使用される場合、「i s o t y p e」アイソタイプは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス (例えば、I g M または I g G 1) を指す。一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、I g G 1 アイソタイプである。別の実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、I g G 2 アイソタイプである。別の実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、I g G 4 アイソタイプである。別の実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、I g G 4 (S 2 2 8 P) アイソタイプ (即ち、アミノ酸位置228にて野生型セリン残基のプロリン置換を有するI g G 4 アイソタイ

50

プ)である。

【0047】

「固定化C6に結合する」という用語は、本発明のヒト抗体が、C6、例えば、細胞の表面に発現されるかまたは固体支持体に付着するC6に結合する能力を指す。

【0048】

「交差反応する」という用語は、本明細書で使用される場合、本発明の抗体が異なる種からのC6に結合する能力を指す。例えば、ヒトC6に結合する本発明の抗体はまた、カニクイザルなどのC6の別の種に結合してもよい。本明細書で使用される場合、交差反応性は、結合アッセイ(例えば、SPR、ELISA)において精製された抗原との特異的反応を検出すること、あるいはC6を生理学的に発現している細胞への結合、またはそれとの機能的な相互作用によって測定される。交差反応性を決定するための方法としては、例えば、Biacore(商標)2000 SPR計器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用するBiacore(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)分析による本明細書に記載の標準的な結合アッセイ、またはフローサイトメトリー技法が挙げられる。

10

【0049】

本明細書で使用される場合、「グリコシル化パターン」は、タンパク質、より具体的には免疫グロブリンタンパク質に共有結合される炭水化物単位のパターンとして定義される。異種抗体のグリコシル化パターンは、当業者が、異種抗体のグリコシル化パターンを、導入遺伝子のCH遺伝子が由来した種よりも非ヒトトランスジェニック動物の種における該グリコシル化パターンにより類似していると認識し得る場合に、非ヒトトランスジェニック動物の種によって産生される抗体上に天然に存在するグリコシル化パターンに実質的に類似していることを特徴とし得る。

20

【0050】

「天然に存在する」という用語は、物体に適用され、本明細書で使用される場合、物体が天然に見出され得ることを指す。例えば、天然にある源から単離され得、かつ研究所で人間によって意図的に修飾されていない、有機物(ウィルスを含む)中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

【0051】

「再配列された」という用語は、本明細書で使用される場合、Vセグメントが、D-JまたはJセグメントに直接隣接して、それぞれ完全V_HまたはV_Lドメインを本質的にコードする配座で位置付けられる、重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の構成を指す。再配列された免疫グロブリン遺伝子は、生殖細胞系列DNAとの比較によって特定することができ、再配列された遺伝子座は、少なくとも1つの組み換えられた7量体/9量体相同性要素を有することになる。

30

【0052】

「再配列されていない」または「殖細胞系列構成」という用語は、Vセグメントに関して本明細書で使用される場合、VセグメントがDまたはJセグメントに直接隣接するように組み換えられていない構成を指す。

【0053】

「核酸分子」という用語は、本明細書で使用される場合、DNA分子およびRNA分子を含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよいが、二本鎖DNAであることが好ましい。

40

【0054】

「単離された核酸分子」という用語は、C6に結合する抗体または抗体部分(例えば、V_H、V_L、CDR3)をコードする核酸に関して本明細書で使用される場合、抗体または抗体部分をコードするヌクレオチド配列が、C6以外の抗原に結合する抗体または抗体部分をコードする他のヌクレオチド配列を含まず、他の配列がヒトゲノムDNAにおいて核酸の両側部に位置し得る、核酸分子を指すことが意図される。例えば、配列番号14、16、18、20、22、24、26、および28は、それぞれ、抗C6モノクローナル

50

抗体 8 G 0 9、7 E 1 2、7 G 0 9、8 F 0 7、7 F 0 6、7 F 1 1、7 E 1 1、および 7 F 0 2 の重鎖 (V_H) 可変領域をコードするヌクレオチド配列に対応する。配列番号 1 5、1 7、1 9、2 1、2 3、2 5、2 7、および 2 9 は、それぞれ、抗 C 6 モノクローナル抗体 8 G 0 9、7 E 1 2、7 G 0 9、8 F 0 7、7 F 0 6、7 F 1 1、7 E 1 1、および 7 F 0 2 の軽鎖 (V_H) 可変領域をコードするヌクレオチド配列に対応する。

【 0 0 5 5 】

本発明はまた、配列番号 4 ~ 4 7 に示される配列の「保存的配列修飾」、即ち、ヌクレオチド配列によってコードされるかまたはアミノ酸配列を含有する抗体の抗原への結合を廃さないヌクレオチドおよびアミノ酸配列修飾を包含する。かかる保存的配列修飾には、保存的ヌクレオチドおよびアミノ酸置換、ならびにヌクレオチドおよびアミノ酸付加および欠失が含まれる。例えば、修飾は、部位指向性突然変異および P C R 媒介性突然変異などの当該技術分野で既知の標準的な技法によって、配列番号 4 ~ 4 7 に導入することができる。保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基を、類似した側鎖を有するアミノ酸残基で代置するものが含まれる。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ - 分枝側鎖（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（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）を有するアミノ酸が含まれる。このため、ヒト抗 C 6 抗体中の予測非必須アミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で代置することが好ましい。抗原結合を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸保存的置換を特定する方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Brummell et al., Biochem. 32: 1180 - 1187 (1993)、Kobayashi et al. Protein Eng. 12 (10): 879 - 884 (1999)、および Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412 - 417 (1997) を参照）。

【 0 0 5 6 】

あるいは、別の実施形態では、突然変異は、飽和突然変異などによって抗 C 6 抗体コード化配列の全てまたは一部にかけて無作為に導入することができ、結果として得られる修飾された抗 C 6 抗体を結合活性についてスクリーニングし得る。

【 0 0 5 7 】

核酸について、「実質的な相同性」という用語は、2 つの核酸またはその指定の配列が、最適に整列し比較されるときに、ヌクレオチドの少なくとも約 8 0 %、通常は少なくとも約 9 0 % ~ 9 5 %、およびより好ましくはヌクレオチドの少なくとも約 9 8 % ~ 9 9 . 5 % において、適切なヌクレオチド挿入または欠失を伴って同一であることを示す。あるいは、実質的な相同性は、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下で鎖の補体にハイブリダイズするときに存在する。

【 0 0 5 8 】

2 つの配列間の同一性パーセントは、2 つの配列の最適な整列のために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れた、その配列が共有する同一の位置の数の関数である（即ち、相同性 % = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 1 0 0）。配列の比較および 2 つの配列間の同一性パーセントの決定は、以下の非限定的な例に記載するように、数学アルゴリズムを使用して獲得することができる。

【 0 0 5 9 】

2 つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、N W S g a p d n a . C M P 行列、および 4 0、5 0、6 0、7 0、または 8 0 のギャップ重み、および 1、2、3、4、5、または 6 の長さ重み (l e n g t h w e i g h t) を使用する、G C G ソフトウェアパッケージ (h t t p : / / w w w . g c g . c o m にて入手可能) 中の G A P プログラ

ムを使用して決定することができる。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性パーセントは、PAM120重量残基テーブル、12のギャップ長ペナルティ、および4のギャップペナルティを使用する、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているE. MeyersおよびW. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989))のアルゴリズムを使用して決定することもできる。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossum 62行列またはPAM250行列のいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重み、および1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用する、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>にて入手可能)中のGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970))アルゴリズムを使用して決定することができる。

10

【0060】

本発明の核酸およびタンパク質配列を更に「クエリ配列」として使用して、例えば関連する配列を特定するために、公的なデータベースに検索を行うことができる。かかる検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して行うことができる。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム(スコア=100、語調=12)を用いて行って、本発明の核酸分子と相同であるヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム(スコア=50、語調=3)を用いて行って、本発明のタンパク質分子と相同であるアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップのある整列を得るために、Gapped BLASTを、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載されているように利用し得る。BLASTおよびGapped BLASTプログラムの利用時には、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)の初期設定パラメータを使用し得る。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

20

【0061】

本発明の核酸またはタンパク質は、全細胞において、細胞溶解物において、または部分的に精製されているか若しくは実質的に純粋な形態において存在してもよい。核酸またはタンパク質は、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、および当該技術分野で周知の他のものを含む標準的な技法によって、他の細胞成分または他の汚染物質、例えば、他の細胞核酸またはタンパク質から精製されるときに、「単離される」または「実質的に純粋にされる」。F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照されたい。

30

【0062】

cDNA、ゲノム、またはその混合物のいずれかに由来するが、多くの場合天然配列(修飾された制限部位などを除く)中にある本発明の核酸組成物は、遺伝子配列を提供するための標準的な技法に従って突然変異され得る。コード化配列に対して、これらの突然変異は、所望のようにアミノ酸配列に影響し得る。具体的には、天然のV、D、J、定常、スイッチ、および本明細書に記載の他のかかる配列と実質的に相同であるかまたはそれらに由来するDNA配列が企図される(ここでは、「由来する」は、ある配列が別の配列と同一であるかまたはそれから修飾されることを示す)。

40

【0063】

核酸は、それが別の核酸配列との機能的な関係に置かれるときに「動作可能に連結」される。例えば、ポロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合にコード化配列に動作可能に連結される。転写調節配列に関して、動作可能に連結されるとは、連結されるDNA配列が隣接し、また2つのタンパク質コード化領域を接合する必要がある場合には、隣接し、かつリーディングフレーム中にあることを意味する。スイッチ

50

配列については、動作可能に連結することは、その配列がスイッチ組み換えに影響可能であることを示す。

【 0 0 6 4 】

「ベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、それが結合された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すことが意図される。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これは、追加のDNAセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖DNAループを指す。ベクターの別の型はウイルスベクターであり、ここでは、追加のDNAセグメントは、ウイルスゲノムにライゲーションされ得る。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞における自己複製が可能である（例えば、細菌性の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに統合され得、その結果、宿主ゲノムと併せて複製される。更に、ある特定のベクターは、それらが動作可能に結合する遺伝子の発現を指示することができる。かかるベクターは、「組み換え発現ベクター」（または単純に「発現ベクター」と）と本明細書では称される。一般に、組み換えDNA技法において利用される発現ベクターは、プラスミドの形態にある場合が多い。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが最も一般的に使用される形態のベクターであるため、互換的に使用され得る。しかしながら、本発明は、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス）などのかかる他の形態の発現ベクターを含むことが意図されている。

【 0 0 6 5 】

「組み換え宿主細胞」（または単純に「宿主細胞」と）という用語は、本明細書で 사용되는場合、組み換え発現ベクターが導入された細胞を指すことが意図される。かかる用語は、特定の対象細胞だけでなくかかる細胞の子孫も指すことが意図されることを理解されたい。ある特定の修飾が突然変異または環境の影響のいずれかに起因して後継世代で生じ得るため、係る子孫は、実際には親細胞と同一ではない場合があるが、それでも本明細書で 사용되는場合「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される場合、「結合した（linked）」という用語は、2つ以上の分子の会合を指す。結合は、共有的または非共有的であり得る。結合はまた、遺伝的であり得る（即ち、組み換えによって融合されたもの）であり得る。かかる結合は、化学的共役および組み換えタンパク質生産などの当該技術分野で認識されている多種多様な技法を使用して達成することができる。

【 0 0 6 7 】

本明細書で使用される場合、「阻害する」または「遮断する」（例えば、抗C6抗体によるMACの形成の阻害／遮断を指して）という用語は、互換的に使用され、部分および完全阻害／遮断の両方を包含する。C6の阻害／遮断は、好ましくは、C6が遮断または阻害されないときに起こる活性の通常のレベルを低減させるかまたはその種類を改変する。阻害および遮断はまた、抗C6抗体と接触していないC6と比較して、抗C6抗体と接触しているときのC6の結合または活性における測定可能ないずれの減少も含むことが意図され、例えば、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%、C6の結合または活性を阻害する。一実施形態では、本抗C6抗体は、少なくとも約70%、C6の結合または活性を阻害する。別の実施形態では、本抗C6抗体は、少なくとも80%、C6の結合または活性を阻害する。

【 0 0 6 8 】

「治療する」、「治療すること」、および「治療」という用語は、本明細書で 사용되는場合、本明細書に記載の治療または予防手段を指す。「治療」の方法は、かかる治療、本発明の抗体を必要とする対象、例えば、かかる治療を必要とする対象への投与を用いる

。

【0069】

「有効用量 (effective dose)」または「有効薬量 (effective dosage)」という用語は、所望の効果を達成するかまたは少なくとも部分的に達成するのに十分な量として定義される。「治療有効用量」という用語は、疾患を既に患っている患者において疾患およびその合併症を治癒させるかまたは少なくとも部分的に阻止するのに十分な量として定義される。この使用に有効な量は、治療する障害の重症度、および患者自身の免疫系の全般的状態に依ることになる。

【0070】

「患者」という用語は、予防処置または治療処置のいずれかを受けるヒトおよび他の哺乳動物対象を含む。

10

【0071】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。例えば、本発明の方法および組成物は、免疫障害を有する対象を治療するために使用することができる。「非ヒト動物」という用語は、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを含む。

【0072】

本発明の様々な態様を以下の小節で更に詳述する。

【0073】

20

I. C6に対する抗体の生産

本発明は、C6、例えば、ヒトC6に結合する抗体、例えばヒト化抗体を包含する。C6に結合する例示的なモノクローナル抗体には、7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、および7F02が含まれ、これらの重鎖可変領域は、それぞれ、配列番号5、30、32、34、36、38、40、42、および44に示され、これらの軽鎖可変領域は、それぞれ、配列番号10、31、33、35、37、39、41、43、および45に示される。これらの抗体の重鎖CDR1、2、および3は、それぞれ、配列番号6、7、および8に示され、一方でこれらの抗体の軽鎖CDR1、2、および3は、それぞれ、配列番号11、12、および13に示される。

【0074】

30

本発明のモノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)によって説明されている標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技法などの様々な既知の技法を使用して生産することができる。体細胞ハイブリダイゼーション処置が好ましいが、原理上は、モノクローナル抗体を生産するための他の技法、例えば、Bリンパ球のウイルスまたは発癌性形質転換、ヒト抗体遺伝子のライブラリを使用するファージディスプレイ技法、および実施例6に記載のものなどのヒト化技法を用いることもできる。

【0075】

したがって、一実施形態では、ハイブリドーマ法が、ヒトC6に結合する抗体を生産するために使用される。この方法では、ラット、マウス、または他の適切な宿主動物を好適な抗原で免疫付与して、免疫付与に使用される抗原に特異的に結合することになる抗体を産生するかまたは産生することができるリンパ球を引き出す。実施例1に記載の通り、抗ヒトC6抗体の生育に特に好適な宿主動物は、ヒトC6による免疫付与が完全に「異質」とであると見なされるように、C6を欠損しているラット(C6-/-ラット)である。免疫付与した宿主動物からの上清を、実施例1で詳述する溶血アッセイまたはMAC ELISAなどの抗C6活性を検出するための好適なアッセイにおいて試験して、C6阻害性を有する抗体を発現している宿主動物を特定することができる。

40

【0076】

その後、選択された宿主動物からのリンパ球を、ポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を使用して骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させることができる

50

(Goding , Monoclonal Antibodies : Principles and Practice , pp . 59 - 103 (Academic Press , 1986)) 。 例示的な融合パートナーは Y3 - Ag1 . 2 . 3 細胞であるが、SP2 / 0 - Ag8 . 653 細胞 (ATCC、CRL 1580) などの当該技術分野で既知の他の骨髓腫細胞も好適である。ハイブリドーマ細胞が成長している培地を、抗原に向けられたモノクローナル抗体の産生について、溶血アッセイおよび / または MAC ELISA などを用いてアッセイする。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した後、クローンを、限界希釈手順によってサブクローニングし、標準的な方法によって成長させ得る (Goding , Monoclonal Antibodies : Principles and Practice , pp . 59 - 103 (Academic Press , 1986)) 。 この目的に好適な培地としては、例えば、D - MEM または RPMI - 1640 培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞を動物における腹水腫瘍としてインビボで成長させてもよい。サブクローニングによって分泌されるモノクローナル抗体は、培地、腹水、または血清から、例えば、タンパク質 A - セファロース、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、透析法、または親和性クロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって分離することができる。抗 C6 抗体を分泌するハイブリドーマの調製の例示的かつ非限定的な例は、実施例 1 で詳述する。

【0077】

ラットまたはマウス抗体などの非ヒトモノクローナル抗体は、当該技術分野で既知の方法を使用してヒト化することができる。例えば、実施例 6 で詳述するように、ラット抗ヒト C6 mAb は、Hwang , W . Y et al . (2205) Methods 36 : 35 - 42 に記載されている手法を使用してヒト化することができる。この手法は、非ヒトおよびヒト抗体が類似して構築された CDR を有する場合、ヒトフレームワークは親和性を良好に保持しながら非ヒト CDR も支持することになるという原理に基づく。このため、この方法において、ヒトフレームワーク配列は、ヒト化される抗体の CDR に対するヒト CDR の構造的類似性 (同じ Chothia 正準構造) に基づいて、ヒト生殖細胞系列遺伝子のセットから選択される。偏位した FR 残基を含む Fab 変異型配列のファージディスプレイライブラリを生成する。親和性主導による選択の後、個々のクローンを結合および解離速度についてスクリーニングし、配列ヒト同一性および相同性を決定する。当該技術分野で定着している CDR 移植およびヒト化のための他の手法および方法も、本発明のヒト化抗 C6 抗体を生成するために使用することができる。

【0078】

別の実施形態では、ヒト C6 に結合する抗体および抗体部分は、例えば、McCafferty et al . , Nature , 348 : 552 - 554 (1990) 、 Clackson et al . , Nature , 352 : 624 - 628 (1991) 、 Marks et al . , J . Mol . Biol . , 222 : 581 - 597 (1991) 、および Hoet et al (2005) Nature Biotechnology 23 , 344 - 348 ; Ladner らの米国特許第 5 , 223 , 409 号、同第 5 , 403 , 484 号、および同第 5 , 571 , 698 号 ; Dower らの米国特許第 5 , 427 , 908 号および同第 5 , 580 , 717 号 ; McCafferty らの米国特許第 5 , 969 , 108 号および同第 6 , 172 , 197 号 ; ならびに Griffiths らの米国特許第 5 , 885 , 793 号、同第 6 , 521 , 404 号、同第 6 , 544 , 731 号、同第 6 , 555 , 313 号、同第 6 , 582 , 915 号、および同第 6 , 593 , 081 号に記載されている技法を使用して生成される抗体ファージライブラリから単離することができる。加えて、鎖シャフリングによる高親和性 (nM 範囲) ヒト抗体の生産 (Marks et al . , Bio / Technology , 10 : 779 - 783 (1992)) 、 ならびに極めて大規模なファージライブラリを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびインビボの組み換え (Waterhouse et al . , Nuc . Acids . Res . , 21 : 2265 - 2266 (1993)) を使用して

もよい。

【 0 0 7 9 】

一実施形態では、ヒトC6に結合する抗体は、前出のHoeftらによって説明されているファージディスプレイ技法を使用して生産される。この技法は、ヒトドナーから単離した免疫グロブリン配列の固有の組み合わせを有し、重鎖CDR中に合成による多様性を有するヒトFabライブラリが生成されることを伴う。その後、ライブラリをヒトC6に結合するFabについてスクリーニングする。

【 0 0 8 0 】

一実施形態では、C6に向けられた抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を保持するトランスジェニックまたは染色体導入マウスを使用して生成される。一実施形態では、本発明は、本明細書では「HuMAbマウス」と称されるトランスジェニックマウスを用い、これは、内因性 μ および鎖遺伝子座を不活化する標的突然変異と共に、再配列されていないヒト重鎖(μ および)および 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座(miniloci)を含む(Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859)。したがって、これらのマウスは、マウスIgMまたは の減少した発現を呈し、免疫に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて高親和性のヒトIgG モノクローナル抗体を生成する(前出のLonberg, N. et al. (1994); Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93、およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536-546中で論評されている)。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295、Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656、Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 3720-3724、Choi et al. (1993) Nature Genetics 4: 117-123、Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830、Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920、Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474): 856-859、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101、Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591、Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93、Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536-546、Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851に記載されている。更に、全てLonberg およびKayならびにGenPharm Internationalの米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,789,650号、同第5,877,397号、同第5,661,016号、同第5,814,318号、同第5,874,299号、および同第5,770,429; Suraniらの米国特許第5,545,807号; 1998年6月11日公開国際公開第WO 98/24884号; 1994年11月10日公開の同第WO 94/25585号; 1993年6月24日公開の同第WO 93/1227号; 1992年12月23日公開の同第WO 92/22645号; 1992年3月19日公開の同第WO 92/03918号を参照されたい。

【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、本発明のヒト抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を保持するマウスなどの、導入遺伝子および導入染色体にヒト免疫グロブリン配列を保持するマウスを使用して生育することができる。当該技術分野では「KMマウス」と称されるかかるマウスは、IshidaらのPCT公開第WO 02/43478号で詳述されている。

【0082】

また更に、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現している代替的なトランスジェニック動物系が当該技術分野で利用可能であり、本発明の抗C6抗体を生育するために使用することができる。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と称される代替的なトランスジェニック系を使用することができ、かかるマウスは、例えば、Kucherlapatiらの米国特許第5,939,598号、同第6,075,181号、6,114,598号、同第6,150,584号、および同第6,162,963号に記載されている。

10

【0083】

更に、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現している代替的な染色体導入動物系が当該技術分野で利用可能であり、本発明の抗C6抗体を生育するために使用することができる。例えば、当該技術分野では「TCマウス」と称されるヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の両方を保持するマウスを使用することができ、かかるマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。更に、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体を保持するウシが当該技術分野で説明されており (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)、本発明の抗C6抗体を生育するために使用することができる。

20

【0084】

ヒト抗体を育てるための当該技術分野で説明されている追加のマウス系を本発明の抗C6抗体の生育に適用することもでき、かかるマウス系としては、(i)キメラ抗体(ヒトV/マウスC)がマウス中で生育されるように、内因性マウス重鎖および軽鎖可変領域が、相同的組み換えによって、内因性マウス定常領域に動作可能に連結したヒト重鎖および軽鎖可変領域で置き換えられ、その後続いて、標準的な組み換えDNA技法を使用して完全ヒト抗体に変換される、VelocImmune (登録商標) マウス (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)、ならびに(ii)マウスが、単一の再配列されたヒト共通軽鎖可変領域ではなく、再配列されていないヒト重鎖可変領域を含む、MeMo (登録商標) マウス (Merus Biopharmaceuticals, Inc.) が挙げられるが、これらに限定されない。かかるマウス、および抗体を生育するためのその使用は、例えば、WO 2009/15777、US 2010/0069614、WO 2011/072204、WO 2011/097603、WO 2011/163311、WO 2011/163314、WO 2012/148873、US 2012/0070861、およびUS 2012/0073004に記載されている。

30

【0085】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、免疫付与時にヒト抗体の応答が生成され得るように中でヒト免疫細胞を再構成したSCIDマウスを使用して調製することもできる。かかるマウスは、例えば、Wilsonらの米国特許第5,476,996号および第5,698,767号に記載されている。

40

【0086】

C6に対するモノクローナル抗体を産生するトランスフェクターマの生成

本発明の抗体はまた、例えば、当該技術分野で周知のように組み換えDNA技法および遺伝子トランスフェクション法の組み合わせを使用して、宿主細胞トランスフェクターマ中で産生させることができる (Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。抗C6抗体の組み換え発現のための例示的な実施形態は、実施例5 (

50

これにおいては、p M Q R 発現ベクターを H E K - 2 9 3 宿主細胞中で使用する)、実施例 6 (大腸菌宿主細胞中で p C B 4 発現ベクターを使用する F a b 発現)、および実施例 7 (C H O 細胞発現)において更に説明する。

【 0 0 8 7 】

更に、一実施形態では、目的の遺伝子(複数可)、例えば、抗体遺伝子は、W O 8 7 / 0 4 4 6 2、W O 8 9 / 0 1 0 3 6、および E P 3 3 8 8 4 1 に開示されている G S 遺伝子発現系、または当該技術分野で周知の他の発現系によって使用されるものなどの真核生物発現プラスミドなどの発現ベクターへとライゲーションされ得る。クローン化した抗体遺伝子を持つ精製されたプラスミドは、C H O 細胞または N S O 細胞などの真核宿主細胞、または代替的に植物由来の細胞、菌類、または酵母細胞のような他の真核細胞中に導入され得る。これらの遺伝子を導入するために使用される方法は、電気穿孔、リポフェクチン、リポフェクタミン、または他のものなどの当該技術分野で説明されている方法であり得る。これらの抗体遺伝子を宿主細胞中に導入した後で、抗体を発現している細胞を特定し、選択することができる。これらの細胞は、続いてその発現レベルについて増幅させ、規模を増大させて抗体を産生することができるトランスフェクトーマを表す。組み換え抗体は、これらの培養上清および/または細胞から単離および精製することができる。

10

【 0 0 8 8 】

あるいは、これらのクローン化抗体遺伝子は、大腸菌などの他の発現系において若しくは完全な有機体において発現させるか、または合成によって発現させ得る。

20

【 0 0 8 9 】

交差競合および同じエピトープに結合する抗体

実施例 3 で詳述するように、7 E 5 抗体が結合するエピトープを、配列番号 5 2 のアミノ酸 8 3 5 ~ 8 5 4 (ヒト C 6) に対応するヒト C 6 の領域内の残基に、アラニンへの系統の変異導入法によってマッピングした。配列番号 1、2、および 3 に示される特定のペプチドも、7 E 5 が結合するエピトープの一部を形成する残基を含有することが示された。したがって、一実施形態では、本発明は、配列番号 5 2 の残基 8 3 5 ~ 8 5 4 の全てまたは一部を含むヒト C 6 のエピトープに結合する抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、エピトープが不連続である、配列番号 5 2 の残基 8 3 5 ~ 8 5 4 の全てまたは一部を含むヒト C 6 のエピトープに結合する抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、配列番号 1、2、および 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含むヒト C 6 のエピトープに結合する抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、エピトープが不連続である、配列番号 1、2、および 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含むヒト C 6 のエピトープに結合する抗体を提供する。更に別の実施形態では、本発明は、ヒト C 6 への結合について、配列番号 5 に示される重鎖可変領域および配列番号 1 0 に示される軽鎖可変領域(7 E 5 の V H および V L 配列)を含む抗体と交差競合する抗体を提供する。更に他の実施形態では、本発明の抗体は、C 6 への結合について、8 G 0 9、7 E 1 2、7 G 0 9、8 F 0 7、7 F 0 6、7 F 1 1、7 E 1 1、または 7 F 0 2 などの本明細書に記載の他の抗 C 6 抗体と交差競合する。

30

【 0 0 9 0 】

かかる競合的抗体は、標準的な C 6 結合アッセイにおいて、m A b s 7 E 5、8 G 0 9、7 E 1 2、7 G 0 9、8 F 0 7、7 F 0 6、7 F 1 1、7 E 1 1、7 F 0 2 のうちの 1 つ以上の C 6 への結合を競合的に阻害するその能力に基づいて特定することができる。C 6 への結合についての交差競合を検査するための例示的なアッセイは、実施例 3 で詳述するエピトープサンドイッチ E L I S A である。更に、同じエピトープを認識するかまたは結合について競合する抗体は、他の慣習的な技法を使用して特定することができる。かかる技法としては、例えば、ある抗体が、別の抗体の標的抗原への結合を遮断する能力を示す免疫アッセイ、即ち、競合的結合アッセイが挙げられる。競合的結合は、試験下の免疫グロブリンが参照抗体の C 6 などの共通抗原への特異的結合を阻害するアッセイにおいて決定される。多数の種類の競合的結合アッセイが既知であり、これには、例えば、固相

40

50

直接または間接放射免疫測定 (RIA)、固相直接または間接酵素免疫測定 (EIA)、サンドイッチ競合アッセイ (Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983) 参照)、固相直接ビオチン - アビジン EIA (Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986) 参照)、固相直接標識化アッセイ、固相直接標識化サンドイッチアッセイ (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988))、I-125 標識を使用する固相直接標識 RIA (Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988) 参照)、固相直接ビオチン - アビジン EIA (Cheung et al., Virology 176:546 (1990))、および直接標識化 RIA (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)) が挙げられる。典型的には、かかるアッセイは、標識されていない免疫グロブリンおよび標識されている参照免疫グロブリンのいずれかを担持する固体表面または細胞に結合した精製された抗原の使用を伴う。競合的阻害は、試験免疫グロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することによって測定される。通常、試験免疫グロブリンは過剰に存在する。通常、競合する抗体が過剰に存在する場合、これは、参照抗体の共通抗原への特異的結合を、少なくとも 50 ~ 55 %、55 ~ 60 %、60 ~ 65 %、65 ~ 70 %、70 ~ 75 %、またはそれ以上阻害することになる。

【0091】

したがって、本明細書に記載の特定の抗体によって認識されるエピトープの全てまたは一部を含む C6 上のエピトープ (例えば、同じか若しくは重複している領域、または領域間にある領域若しくは領域間をまたぐ領域) に結合する抗体も、本発明に包含される。

【0092】

一実施形態では、C6 への結合について競合し、かつ/またはヒト C6 上の同じエピトープに結合する抗体は、ヒト化抗体である。かかるヒト化モノクローナル抗体は、例えば、実施例 6 に記載のように調製し単離することができる。

【0093】

抗体が結合するエピトープを決定するための他の技法としては、例えば、エピトープの原子分解を提供する抗原: 抗体複合体の結晶の X 線分析などのエピトープマッピング法が挙げられる。他の方法は、抗原配列内のアミノ酸残基の修飾に起因する結合の損失がエピトープ成分の指標と見なされることが多い、抗原断片または抗原の突然変異した変型への抗体の結合を監視する。加えて、エピトープマッピングのためのコンピュータによるコンビナトリアル方法も使用し得る。これらの方法は、目的の抗体がコンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリから特定の短ペプチドを親和性単離する能力に依存する。ペプチドはこうして、ペプチドライブラリをスクリーニングするために使用される抗体に対応するエピトープの定義のためのリーダーと見なされる。エピトープマッピングのために、配座的に不連続エピトープをマッピングすることが示されているコンピュータによるアルゴリズムが開発されている。

【0094】

本明細書に記載の所望の特性を有する単一の原型的な抗 C6 mAb を単離した後は、当該技術分野で既知の方法を使用することによって、類似した特性を有する、例えば、同じエピトープを有する他の mAbs を生成することは簡単である。例えば、マウスまたはラットを本明細書に記載のように C6 で免疫付与し、ハイブリドーマを生産し、結果として得られる mAb を、C6 への結合について原型 mAb と競合する能力についてスクリーニングし得る。ラットまたはマウスを、原型的な mAb が結合するエピトープを含有する C6 のより小さい断片によって免疫付与することもできる。エピトープは、例えば、C6 にわたる一連の重複ペプチドへの結合についてスクリーニングすることによって位置を特定し得る。あるいは、Jespersen et al., Biotechnology 12:899, 1994 の方法を使用して、原型 mAb と同じエピトープ、故にそれに類似

した特性を有するmAbの選択を誘導してもよい。ファージディスプレイを使用して、まず、原型抗体の重鎖を（好ましくはヒト）軽鎖のレパートリーと対形成させてC6に結合するmAbを選択し、次に、新たな軽鎖を（好ましくはヒト）重鎖のレパートリーと対形成させて原型mAbと同じエピトープを有する（好ましくはヒト）C6を結合するmAbを選択する。あるいは、原型mAbの変異型を、本抗体の重鎖および軽鎖をコードするcDNAの突然変異生成によって得てもよい。

【0095】

エピトープマッピング、例えば、Champe et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:1388-1394に記載されているエピトープマッピングを行って、抗体が目的のエピトープに結合するかどうかを決定することができる。また、Cunningham and Wells (1989) Science 244:1081-1085によって説明されている「アラニン系統の変異導入法」またはヒトC6中のアミノ酸残基の点突然変異の何らかの他の形態を使用して、本発明の抗C6抗体のための機能的エピトープを決定してもよい。しかしながら、突然変異研究は、C6の全体的な3次元構造に不可欠であるが、抗体-抗原接触に直接的に関与しないアミノ酸残基も明らかにし得るため、この方法を使用して決定した機能的エピトープを確認するために他の方法が必要となり得る。

【0096】

特定の抗体によって結合されるエピトープも、ヒトC6の断片を含むペプチドへの抗体の結合を評定することによって決定し得る。C6の配列を含む一連の重複ペプチドを合成し、例えば、直接的ELISA、競合的ELISA（ペプチドを、抗体がマイクロタイタープレートのウェルに結合したC6に結合することを防止するその能力について評定するもの）において、またはチップ上で結合についてスクリーニングしてもよい。かかるペプチドスクリーニング方法は、一部の不連続の機能的エピトープ、即ち、C6ポリペプチド鎖の一次配列に沿って連続していないアミノ酸残基を伴う機能的エピトープを検出することができない場合がある。

【0097】

本発明の抗体によって結合されるエピトープはまた、X線結晶構造決定（例えば、WO 2005/044853）、分子モデリング、ならびに遊離している場合、および目的の抗体と複合体中で結合している場合の、C6中の不安定アミド水素のH-D交換速度のNMR決定を含む核磁気共鳴（NMR）分光法などの構造的な方法によって決定してもよい（Zinn-Justin et al. (1992) Biochemistry 31, 11335-11347、Zinn-Justin et al. (1993) Biochemistry 32, 6884-6891）。

【0098】

X線結晶学に関して、結晶化は、当該技術分野で既知の方法のいずれか（例えば、Giege et al. (1994) Acta Crystallogr. D 50:339-350、McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189:1-23）を使用して獲得してもよく、これらの方法には、マイクロバッチ（例えば、Chayen (1997) Structure 5:1269-1274）、懸滴蒸気拡散（例えば、McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251:6300-6303）、播種および透析が含まれる。少なくとも約1mg/mL、好ましくは約10mg/mL～約20mg/mLの濃度を有するタンパク質調製物を使用することが望ましい。結晶化は、濃度が約10%～約30%（w/v）の1000～20,000（PEG、約1000～約20,000Daの範囲の平均分子量）、好ましくは約5000～約7000Da、より好ましくは約6000Daのポリエチレングリコールを含有する沈殿剤溶液において最良に達成され得る。タンパク質安定剤、例えば、グリセロールを約0.5%～約20%の範囲の濃度で含むことも望ましい場合がある。好ましくは約1mM～約1000mMの濃度の好適な塩、例えば、塩化ナトリウム、塩化リチウム、またはクエン酸ナトリウムも、沈殿剤溶液中で望ましいことがある。沈殿剤を、約3.0～約5.0、好ま

しくは約4.0のpHに中和することが好ましい。沈殿剤溶液中で有用な特定の緩衝液は様々であり、当該技術分野で周知である(Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York)。有用な緩衝液の例としては、HEPES、Tris、MES、および酢酸が挙げられるが、これらに限定されない。結晶は、2、4、8、および26を含む幅広い範囲の温度で成長させ得る。

【0099】

抗体：抗原結晶は、周知のX線回折技法を使用して研究してもよく、コンピュータソフトウェア、例えば、X-PLOR (Yale University, 1992、Molecular Simulations, Inc. により配布；例えば、Blundell & Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114 & 115, H.W. Wyckoff et al., eds., Academic Press、米国特許出願公開第2004/0014194号を参照)、およびBUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60、Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, eds., Roversi et al. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323) (開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる)を使用して精緻化してもよい。

【0100】

完全抗体を発現させるための部分的抗体配列の使用

ある特定の実施形態では、本発明の抗C6抗体は、配列番号8に示される重鎖CDR3と配列番号13に示される軽鎖CDR3とを含む。本抗体は、配列番号7に示される重鎖CDR2と配列番号12に示される軽鎖CDR2とを更に含み得る。本抗体は、配列番号6に示される重鎖CDR1と配列番号11に示される軽鎖CDR1とをまた更に含み得る。前述のCDRを利用する本発明の例示的な抗体としては、

- (a) 配列番号30の重鎖可変領域と配列番号31の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (b) 配列番号32の重鎖可変領域と配列番号33の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (c) 配列番号34の重鎖可変領域と配列番号35の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (d) 配列番号36の重鎖可変領域と配列番号37の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (e) 配列番号38の重鎖可変領域と配列番号39の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (f) 配列番号40の重鎖可変領域と配列番号41の軽鎖可変領域とを含む抗体、
- (g) 配列番号42の重鎖可変領域と配列番号43の軽鎖可変領域とを含む抗体、および

(h) 配列番号44の重鎖可変領域と配列番号45の軽鎖可変領域とを含む抗体が挙げられる。

【0101】

抗体は、6個の重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)中に位置するアミノ酸残基を主に通して標的抗原と相互作用する。この理由により、CDR内のアミノ酸配列は、CDR外の配列よりも個々の抗体間でより多様である。CDR配列は大部分の抗体-抗原相互作用に貢献するため、特定の天然に存在する抗体の特性を模倣する組み換え抗体を、異なる特性を有する異なる抗体からのフレームワーク配列に移植した特定の天然に存在するからのCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって発現させることが可能である(例えば、Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332:323-327、Jones, P. et al., 1986, Nature 321:522-525、およびQueen, C. et al., 1989, Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033を参照)。かかるフレームワーク配列は、生殖細胞系抗体遺伝子配列を含む公的なDNAデータベースから得ることができる。これらの生殖細胞系配列は、それらが、B細胞突然変異の間にV(D)J接合によって形成される完全に組み立てられた可変遺伝子を含まないため、成熟抗体遺伝

子配列とは異なる。生殖細胞系列配列は、可変領域にわたって均一に個々で高親和性二次レパートリー抗体の配列とも異なることになる。例えば、体細胞突然変異は、フレームワーク領域のアミノ末端部分において比較的頻度が低い。例えば、体細胞突然変異は、フレームワーク領域1のアミノ末端部分およびフレームワーク領域4のカルボキシ末端部分において比較的頻度が低い。更に、多くの体細胞突然変異は、抗体の結合特性を大幅に改変しない。この理由により、元の抗体のものに類似した結合特性を有する完全な組み換え抗体を再度作出するために、特定の抗体のDNA配列全体を得る必要はない(PCT/US99/05535を参照)。CDR領域にわたる部分的重鎖および軽鎖配列が、典型的にはこの目的に十分である。部分的配列を使用して、どの生殖細胞系列可変および接合遺伝子セグメントが組み換え抗体可変遺伝子に寄与したかを決定する。次に、生殖細胞系列配列を使用して、可変領域の欠損している部分を埋める。重鎖および軽鎖リーダー配列は、タンパク質突然変の間に切断され、最終抗体の特性に寄与しない。欠損している配列を加えるために、クローニングしたcDNA配列を、ライゲーションまたはPCR増幅によって合成オリゴヌクレオチドと組み合わせることができる。あるいは、可変領域全体を、短く重複したオリゴヌクレオチドのセットとして合成し、PCR増幅によって組み合わせ、完全に合成の可変領域クローンを作成し得る。このプロセスは、特定の制限部位の排除若しくは組み入れ、または特定のコドンの最適化などのある特定の利点を有する。

【0102】

ハイブリドーマからの重鎖および軽鎖転写産物のヌクレオチド配列を使用して、合成オリゴヌクレオチドの重複しているセットを設計し、天然配列と同一のアミノ酸コード化能力を有する合成V配列を作成する。合成の重鎖およびカッパ鎖配列は、オリゴヌクレオチド合成およびPCR増幅を促進するために一続きの反復ヌクレオチド塩基が妨害されること、最適な翻訳開始部位がKozakのルールに従って組み込まれること(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)、ならびにHindIII部位が翻訳開始部位の上流で操作されること、という3つの点で天然配列とは異なり得る。

【0103】

重鎖および軽鎖可変領域の両方について、最適化されたコード化および対応する非コード化鎖配列は、対応する非コード化オリゴヌクレオチドのほぼ中点、30~50ヌクレオチドに分けられる。このため、各鎖について、オリゴヌクレオチドは、150~400ヌクレオチドのセグメントにわたる重複した二本鎖セットに組み立てることができる。その後、プールを鋳型として使用して、150~400ヌクレオチドのPCR増幅産物を生産する。典型的には、単一の可変領域オリゴヌクレオチドセットは2つのプールに分けられ、これを別個に増幅して2つの重複したPCR産物を生成する。次に、これらの重複した産物をPCR増幅によって組み合わせ、完全な可変領域を形成する。また、重鎖または軽鎖定常領域(カッパ軽鎖のBbsI部位、またはガンマ重鎖の場合にはAgeI部位を含む)の重複断片をPCR増幅に含めて、発現ベクター構築物に容易にクローニングできる断片を生成することが望ましい場合がある。

【0104】

その後、再構築した重鎖および軽鎖可変領域を、クローニングしたプロモーター、リーダー配列、翻訳開始、リーダー配列、定常領域、3'非翻訳、ポリアデニル化、および転写終了の配列と組み合わせ、発現ベクター構築物を形成する。重鎖および軽鎖発現構築物を単一のベクターに組み込み、宿主細胞に同時トランスフェクト、連続トランスフェクト、または個別トランスフェクトし、これを後に両方の鎖を発現している宿主細胞を形成するために融合させ得る。

【0105】

発現ベクターの構築に使用するためのプラスミドを、PCR増幅したV重鎖およびVカッパ軽鎖cDNA配列を重鎖および軽鎖ミニ遺伝子の再構築に使用し得るように構築した。これらのプラスミドを使用して、完全ヒトIgG₁またはIgG₄抗体を発現させることができる。本発明の完全ヒト抗体およびキメラ抗体はまた、IgG₂、IgG₃、

10

20

30

40

50

I g E、I g A、I g M、およびI g D抗体を含む。類似のプラスミドを、他の重鎖アイソタイプのため、またはラムダ軽鎖を含む抗体の発現のために構築し得る。

【0106】

このように、本発明の別の態様では、本発明の抗C6抗体の構造的特徴を使用して、本発明の抗体の少なくとも1つの機能的特性を保持する構造的に関連した抗C6抗体を作出する。これらの機能的特性は、例えば、

(a) 7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、または7F02などの本発明の抗C6抗体と同じエピトープに結合すること、

(b) 溶血アッセイにおいて $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の IC_{50} を有すること、

(c) 表面プラズモン共鳴によって決定した場合に $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 以下（あるいは $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 以下、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以下、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以下、または $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 以下）の K_D を有すること、

(d) 表面プラズモン共鳴によって決定した場合に40時間以上の抗体-C6結合半減期を有すること、または

(e) カニクイザルC6と交差反応すること、などである。

【0107】

一実施形態では、本発明の抗体の1つ以上のCDR領域は、既知のフレームワーク領域およびCDRと組み換えによって組み合わせ、追加の組み換え操作された本発明の抗C6抗体を作出することができる。重鎖および軽鎖可変フレームワーク領域は、同じ抗体配列または異なる抗体配列に由来し得る。抗体配列は、天然に発生する抗体の配列であり得るか、またはいくつかの抗体のコンセンサス配列であり得る。KettleboroughらのProtein Engineering 4:773(1991)、KolbingerらのProtein Engineering 6:971(1993)、およびCarterらのWO 92/22653を参照されたい。

【0108】

したがって、別の実施形態では、本発明は、抗C6抗体を調製するための方法を提供し、本方法は、(1)重鎖CDRの少なくとも1つが配列番号6、7、および8に示されるCDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖フレームワーク領域および重鎖CDRと、(2)軽鎖CDRの少なくとも1つが配列番号11、12、および13に示されるCDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖フレームワーク領域および軽鎖CDRとを含む抗体を調製することを含み、本抗体はC6に結合する能力を保持する。C6に結合する抗体の能力は、実施例に示すものなどの標準的な結合および/または機能アッセイを使用して決定することができる。好ましくは、抗体は、(a)~(e)として上で列挙した機能特性のうちの少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも3つ、または少なくとも4つ、または5つ全てを呈する。本明細書に開示のかかる抗体の例としては、7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、および7F02抗体が挙げられる(実施例6に記載の通り)。

【0109】

抗体の重鎖および軽鎖CDR3ドメインが抗体の抗原に対する結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たすことは当該技術分野で周知である(Hallet al., J. Immunol., 149:1605-1612(1992)、Polymenis et al., J. Immunol., 152:5318-5329(1994)、Jahn et al., Immunobiol., 193:400-419(1995)、Klimka et al., Brit. J. Cancer, 83:252-260(2000)、Beiboer et al., J. Mol. Biol., 296:833-849(2000)、Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8910-8915(1998)、Barbas et al., J. Am. Chem. Soc., 116:2161-2162(1994)、Ditzel et al., J. Immunol., 157:739-749(1996)を参照)

。したがって、上に示した通りに調製した本発明の組み換え抗体は、好ましくは、それぞれ配列番号 8 および 13 に示される 7 E 5 抗体の重鎖および / または軽鎖 C D R 3 を含む。本明細書に開示のかかる抗体の例としては、7 E 5、8 G 0 9、7 E 1 2、7 G 0 9、8 F 0 7、7 F 0 6、7 F 1 1、7 E 1 1、および 7 F 0 2 抗体が挙げられる（実施例 6 に記載の通り）。

【 0 1 1 0 】

更に、別の実施形態では、本発明は、(1) 重鎖フレームワーク領域、重鎖 C D R 1 領域、重鎖 C D R 2 領域、および重鎖 C D R 3 領域（重鎖 C D R 3 領域が配列番号 8 の配列を含む）、ならびに (2) 軽鎖フレームワーク領域、軽鎖 C D R 1 領域、軽鎖 C D R 2 領域、および軽鎖 C D R 3 領域（軽鎖 C D R 3 領域が配列番号 13 の配列を含む）を含む抗 C 6 抗体を更に提供し、本抗体は C 6 に結合する。本抗体は、それぞれ配列番号 7 および 12 に示される 7 E 5 抗体の重鎖 C D R 2 および / または軽鎖 C D R 2 を更に含み得る。本抗体は、それぞれ配列番号 6 および 11 に示される 7 E 5 抗体の重鎖 C D R 1 および / または軽鎖 C D R 1 を更に含んでもよい。本明細書に開示のかかる抗体の例としては、7 E 5、8 G 0 9、7 E 1 2、7 G 0 9、8 F 0 7、7 F 0 6、7 F 1 1、7 E 1 1、および 7 F 0 2 抗体が挙げられる（実施例 6 に記載の通り）。

【 0 1 1 1 】

修飾された配列を有する抗体の生成

別の実施形態では、本発明の抗 C 6 抗体の可変領域配列またはその一部を修飾して、結合（即ち、非修飾抗体と同じエピトープへの）を保持し、故に機能的に同等である、構造的に関連した抗 C 6 抗体を作出する。抗原結合を除去することなく改変することができる残基を特定するための方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Marks et al. (Biotechnology (1992) 10 (7): 779 - 83 (monoclonal antibodies diversification by shuffling light chain variable regions, the n heavy chain variable regions with fixed CDR3 sequence changes)、Jespers et al. (1994) Biotechnology 12 (9): 899 - 903 (selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen)、Sharon et al. (1986) PNAS USA 83 (8): 2628 - 31 (site-directed mutagenesis of an invariant amino acid residue at the variable-diversity segments junction of an antibody)、Casson et al. (1995) J. Immunol. 155 (12): 5647 - 54 (evolution of loss and change of specificity resulting from random mutagenesis of an antibody heavy chain variable region) を参照）。

【 0 1 1 2 】

したがって、本発明の一態様では、上記の操作した抗体の C D R 1、2、および / または 3 領域は、本明細書に開示の配列番号 6 ~ 7 および 11 ~ 13 (7 E 5 C D R) に示されるまさにそのアミノ酸配列（複数可）を含み得る。しかしながら、本発明の他の態様では、本抗体は、7 E 5 のまさにその C D R 配列からの誘導体を含むが、依然として C 6 に効果的に結合する能力を保持する。かかる配列修飾は、1 つ以上のアミノ酸付加、欠失、または置換、例えば、上記のような保存的配列修飾を含んでもよい。配列修飾はまた、7 E 5 抗体の特定の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列についての上記のコンセンサス配列に基づいてもよい。

【 0 1 1 3 】

したがって、別の実施形態では、操作した抗体は、7 E 5 抗体の 1 つ以上の C D R (配

10

20

30

40

50

列番号 6 ~ 8 および 11 ~ 13 に示される) と、例えば、90%、95%、98%、または 99.5% 同一である 1 つ以上の CDR で構成され得る。上で引用した値の中間の範囲、例えば、上の配列のうちの 1 つ以上に対して、90 ~ 95%、95 ~ 98%、または 98 ~ 100% 同一の同一性である CDR も、本発明に包含されることが意図される。

【0114】

更に別の実施形態では、本発明は、

(a) 配列番号 30、32、34、36、38、40、42、44、および 46 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% (または 90 ~ 95%、95% ~ 98%、98% ~ 100%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99%) 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

10

(b) 配列番号 31、33、35、37、39、41、43、45、および 47 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% (または 90 ~ 95%、95% ~ 98%、98% ~ 100%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99%) 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、ヒト C6 に結合する単離された抗体を提供する。

【0115】

更に別の実施形態では、単離された抗体は、

(a) 重鎖可変領域が、配列番号 30、32、34、36、38、40、42、44、および 46 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(b) 軽鎖可変領域が、配列番号 31、33、35、37、39、41、43、45、および 47 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むものである。

20

実施例 7 は、「ミックスアンドマッチ」実験を詳述し、この実験では、これらの重鎖および軽鎖可変領域の各々を、互いに 81 個全ての可能性のある組み合わせで対にし、C6 活性の阻害における 81 個全ての組み合わせの機能活性を実証した。

【0116】

更に、別の実施形態では、CDR の 1 つ以上の残基を、結合を修飾するように改変して、理想的な結合定数が達成されるように、より好適な結合の会合速度、より好適な結合の解離速度、またはその両方を達成してもよい。この戦略を使用して、例えば、 10^{10} M^{-1} 以上の超高結合親和性を有する抗体を達成することができる。当該技術分野で周知であり、本明細書に記載する親和性成熟技法を使用して、CDR 領域 (複数可) を改変した後、結果として得られる結合分子を、結合の所望の変化についてスクリーニングし得る。このため、CDR (複数可) の改変時に、最良の組み合わせの結合および低い免疫原性に最適化された抗体が達成されるように、結合親和性の変化および免疫原性を監視し採点する。

30

【0117】

このように、VH および / または VL CDR 1、CDR 2、および / または CDR 3 領域内の可変領域修飾について、部位指向性突然変異生成または PCR 媒介性突然変異生成を行って、突然変異 (複数可) を導入し、抗体結合に与える影響、または他の目的の機能特性を、本明細書に記載し実施例で提供するように、インビトロまたはインビボアッセイにおいて評価することができる。保存的修飾 (本明細書で考察する通り) を導入することが好ましい。突然変異は、アミノ酸置換、付加、または欠失であり得るが、置換が好ましい。更に、典型的には、CDR 領域内の 1 個、2 個、3 個、4 個、または 5 個以下の残基を改変する。

40

【0118】

このように、別の実施形態では、本発明は、(a) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列、または配列番号 6 と比較して、1 個、2 個、3 個、4 個、若しくは 5 個のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加を有するアミノ酸配列を含む、VH CDR 1 領域、(b) 配列番号 7 に示されるアミノ酸配列、または配列番号 7 と比較して、1 個、2 個、3 個、4 個、若しくは 5 個のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加を有するアミノ酸配列を含む、VH CDR 2 領域、(c) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列、または配列番号 8 と比較して

50

、1個、2個、3個、4個、若しくは5個のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加を有するアミノ酸配列を含む、VH CDR3領域、(d)配列番号11に示されるアミノ酸配列、または配列番号11と比較して、1個、2個、3個、4個、若しくは5個のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加を有するアミノ酸配列を含む、VL CDR1領域、(e)配列番号12に示されるアミノ酸配列、または配列番号11と比較して、1個、2個、3個、4個、若しくは5個のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加を有するアミノ酸配列を含む、VL CDR2領域、および(f)配列番号12に示されるアミノ酸配列、または配列番号12と比較して、1個、2個、3個、4個、若しくは5個のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加を有するアミノ酸配列を含む、VL CDR3領域、を含む、単離された抗C6モノクローナル抗体、またはその抗原結合部分を提供する。

10

【0119】

更に別の実施形態では、本発明は、(a)配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、および46からなる群から選択されるアミノ酸配列、または配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、および46と比較して、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、若しくは10個のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加を有するアミノ酸配列を含む、重鎖可変領域、ならびに(b)配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、および47からなる群から選択されるアミノ酸配列、または配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、および47と比較して、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、若しくは10個のアミノ酸置換、欠失、若しくは付加を有するアミノ酸配列を含む、軽鎖可変領域、を含む、単離された抗C6モノクローナル抗体、またはその抗原結合部分を提供する。

20

【0120】

CDR内の修飾に加えて、またはその代わりに、修飾は、これらの修飾が抗体の結合親和性を排除しない限り、抗体の重鎖および/または軽鎖可変領域のフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、およびFR4のうちの一つ以上の中で行われ得る。例えば、本発明の抗体の重鎖および/または軽鎖可変領域のフレームワーク領域における一つ以上の非生殖細胞系列アミノ酸残基は、生殖細胞系列アミノ酸残基、即ち、抗体が顕著な配列同一性を有する、重鎖または軽鎖可変領域についてのヒト生殖細胞系列配列における対応するアミノ酸残基で置換される。例えば、抗体鎖は、それが共に顕著な配列同一性を共有する生殖細胞系列抗体鎖と整列され得、抗体フレームワーク配列と生殖細胞系列鎖フレームワークとの間で一致しないアミノ酸残基は、生殖細胞系列配列からの対応する残基で置換され得る。アミノ酸が抗体可変フレームワーク領域と同等のヒト生殖細胞系列配列可変フレームワーク領域との間で異なる場合、抗体フレームワークアミノ酸は、通常、アミノ酸が以下のカテゴリーのうちの一つに入ることが合理的に予測される場合には、同等のヒト生殖細胞系列配列アミノ酸によって置換されるはずである：

30

- (1) . 抗原に直接的に非共有結合するアミノ酸残基、
- (2) . CDR領域に隣接するアミノ酸残基、
- (3) . 別のやり方でCDR領域と相互作用する(例えば、コンピュータモデリングによって決定してCDR領域の約3~6内にある)アミノ酸残基、または
- (4) . VL-VH相互作用に関与するアミノ酸残基。

40

【0121】

「抗原に直接的に非共有結合する」残基には、確立されている化学力に従って、例えば、水素結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用などによって、抗原上のアミノ酸と直接的に相互作用する可能性が良好であるフレームワーク領域における位置にあるアミノ酸が含まれる。このように、一実施形態では、本発明の抗体のフレームワーク領域におけるアミノ酸残基は、抗原に直接的に非共有結合する対応する生殖細胞系列アミノ酸残基で置換される。

【0122】

「CDR領域に隣接する」残基には、抗体の一次配列におけるCDRのうちの一つ以上に直接隣接する位置にある、例えば、Kabatによって定義されるCDR、またはCh

50

othiaによって定義されるCDR（例えば、Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901 (1987)）に直接隣接する位置にある、アミノ酸が含まれる。したがって、一実施形態では、本発明の抗体のフレームワーク領域内にあるアミノ酸残基は、CDR領域に隣接する対応する生殖細胞系列アミノ酸残基で置換される。

【0123】

「別のやり方でCDR領域と相互作用する」残基には、二次構造分析によって、CDR領域に影響するのに十分な空間定位にあることが決定されるものが含まれる。かかるアミノ酸は、一般に、CDR中のなんらかの原子の約3オングストローム単位（ ）内に側鎖原子を有することになり、上に列挙したものなどの確立されている化学力に従って、CDR原子と相互作用し得る原子を含有する必要がある。したがって、一実施形態では、本発明の抗体のフレームワーク領域内にあるアミノ酸残基は、別のやり方でCDR領域と相互作用する対応する生殖細胞系列アミノ酸残基で置換される。

【0124】

フレームワーク中のいくつかの位置でのアミノ酸は、多くの抗体においてCDR構造に重要であることが知られている（例えば、CDRと相互作用することができる）ことが知られている（全て参照により本明細書に組み込まれる、前出のChothia and Lesk、前出のChothia et al.、およびTramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)）。これらの著者は、いくつかの既知の抗体の構造の分析によって、CDR配座に重要な保存されたフレームワーク残基を特定した。分析された抗体は、CDRの配座に基づいて、限られた数の構造または「正準」クラスに分類された。正準クラスのメンバー内の保存されたフレームワーク残基を「正準」残基と称する。正準残基には、軽鎖の残基2、25、29、30、33、48、64、71、90、94、および95、ならびに重鎖の残基24、26、29、34、54、55、71、および94が含まれる。追加の残基（例えば、CDR構造決定残基）は、Martin and Thornton (1996) J. Mol. Biol. 263:800の方法に従って特定することができる。注目すべきことに、軽鎖の2、48、64、および71位のアミノ酸、ならびに重鎖の26～30、71、および94位（Kabataに従う付番）は、多くの抗体においてCDRと相互作用することができると知られている。軽鎖における35位、ならびに重鎖における93および103位のアミノ酸もまた、CDRと相互作用する可能性が高い。CDRの配座に影響し得る追加の残基は、Foot and Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487の方法に従って特定することができる。かかる残基は、「バーニヤ」残基と呼ばれ、CDRの密接な基礎となっている（即ち、その下に「プラットフォーム」を形成している）フレームワーク領域における残基である。

【0125】

「VL-VH相互作用に関与する」残基または「パッキング残基」には、例えば、Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985)または前出のChothiaらによって定義されている、VLとVHとの間の界面にある残基を含む。

【0126】

特定のアミノ酸が上述のカテゴリのうちの1つ以上に中に入るかどうかについては、多少曖昧であることがある。かかる場合には、代替的な変異型抗体が生産され、このうち1つは特定の置換を有し、もう1つは有しない。このように生産された代替的な変異型抗体は、所望の活性のための本明細書に記載のアッセイのうちのいずれか、および選択された好ましい抗体において試験することができる。

【0127】

フレームワーク領域内の置換のための追加の候補は、その位置のアミノ酸には異常または「希少」であるアミノ酸である。これらのアミノ酸は、ヒト生殖細胞系列配列の同等の位置、またはより典型的な抗体の同等の位置からのアミノ酸で置換され得る。例えば、抗

体のフレームワーク領域におけるアミノ酸がその位置には希少であり、かつ生殖細胞系列配列における対応するアミノ酸が免疫グロブリン配列においてその位置に一般的である場合、または抗体におけるアミノ酸がその位置には希少であり、かつ生殖細胞系列配列における対応するアミノ酸も、他の配列と比較して希少である場合に、置換が望ましくてもよい。異常アミノ酸を、偶然にも抗体に典型的である生殖細胞系列配列からのアミノ酸で置き換えることによって、抗体の免疫原性をより低くし得ることが企図される。

【0128】

「希少」という用語は、本明細書で使用される場合、配列の代表試料中、配列の約20%未満、好ましくは約10%未満、より好ましくは約5%未満、更により好ましくは約3%未満、更により好ましくは約2%未満、および更により好ましくは約1%未満においてその位置で生じるアミノ酸を示し、「一般」という用語は、本明細書で使用される場合、代表試料中、配列の約25%超であるが、通常は約50%超において生じるアミノ酸を示す。例えば、全ての軽鎖および重鎖可変領域配列は、それぞれ、互いに特に相同であり、ある特定の重要な位置で同じアミノ酸を有する配列の「サブグループ」にグループ分けされる（前出のKabatra）。抗体配列におけるアミノ酸が配列間で「希少」であるか「一般」であるかを決定するときには、その抗体配列と同じサブグループにおける配列のみを考慮することが好ましい場合が多い。

【0129】

一般に、抗体のフレームワーク領域は、通常は実質的に同一であり、更に通常は、それらが由来するヒト生殖細胞系列配列のフレームワーク領域と同一である。言うまでもなく、フレームワーク領域におけるアミノ酸の多くは、抗体の特異性または親和性にほとんどまたは全く寄与しない。このため、フレームワーク残基の多くの個々の保存的置換は、結果として得られる免疫グロブリンの特異性または親和性の感知できる変化なく許容される。よって、一実施形態では、可変抗体のフレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系列可変フレームワーク領域配列またはかかる配列のコンセンサスとの少なくとも85%の配列同一性を共有する。別の実施形態では、抗体の可変フレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系列可変フレームワーク領域配列またはかかる配列のコンセンサスとの少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を共有する。

【0130】

フレームワーク修飾を行って、例えば、US2003/0153043においてCarraによって記載されているように、抗体の免疫原性を低減するか、またはその中に存在するT細胞エピトープを低減若しくは除去することもできる。

【0131】

本発明の操作した抗体には、例えば抗体の特性を改善するために、 V_H および/または V_L 内のフレームワーク残基に修飾を行ったものが含まれる。典型的には、かかるフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を減少させるために行われる。例えば、1つの手法は、1つ以上のフレームワーク残基に対応する生殖細胞系列配列に逆突然変異させることである。より具体的には、体細胞突然変異を受けた抗体は、その抗体が由来する生殖細胞系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有し得る。かかる残基は、抗体フレームワーク配列を、その抗体が由来する生殖細胞系列配列と比較することによって特定することができる。

【0132】

フレームワーク修飾の別の種類は、フレームワーク領域内、または更には1つ以上のCDR領域内の1つ以上の残基を突然変異させてT細胞エピトープを除去し、それにより抗体の可能性のある免疫原性を低減させることを伴う。この手法は、「脱免疫化」とも称され、米国特許公開第20030153043号で更に詳述されている。

【0133】

単純なC6への結合に加えて、抗体は、その本発明の抗体の他の機能特性の保持について選択されてもよく、これらの機能特性とは、例えば、

(a) 7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E

10

20

30

40

50

- 11、または7F02などの本発明の抗C6抗体と同じエピトープに結合すること、
 (b) 溶血アッセイにおいて0.5 μg/ml以下のIC₅₀を有すること、
 (c) 表面プラズモン共鳴によって決定した場合に5 × 10⁻¹⁰ M以下のK_Dを有すること、
 (d) 表面プラズモン共鳴によって決定した場合に40時間以上の抗体 - C6結合半減期を有すること、または
 (e) カニクイザルC6と交差反応すること、などである。

【0134】

追加の抗体修飾

本開示の抗体は、軽鎖または重鎖可変領域のいずれかにおいて1つ以上のグリコシル化部位を含有し得る。かかるグリコシル化部位は、改変された抗原結合に起因する抗体の増加した免疫原性または抗体のpKの改変をもたらし得る(Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41: 673-702、Gala and Morrison (2004) J Immunol 172: 5489-94、Wallick et al (1988) J Exp Med 168: 1099-109、Spiro (2002) Glycobiology 12: 43R-56R、Parekh et al (1985) Nature 316: 452-7、Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37: 697-706)。グリコシル化は、N-X-S/T配列を含有するモチーフにて生じることが知られている。一部の場合には、可変領域グリコシル化を含有しない抗C6抗体を有することが好ましい。これは、可変領域にグリコシル化モチーフを含有しない抗体を選択することか、またはグリコシル化領域内の残基を突然変異させることのいずれかによって達成することができる。

【0135】

例えば、一実施形態では、抗体のグリコシル化を修飾する。例えば、可変領域を改変して、可変領域に存在する1つ以上のグリコシル化部位を除去する。より具体的には、グリコシル化を生じやすい部位を除去することが本抗体の配列において望ましい。これは、特にN残基および/またはS若しくはT残基の置換によって、親可変領域で生じる1つ以上のN-X-(S/T)配列(Xは任意のアミノ酸残基である)の発生を改変することによって達成することができる。一実施形態では、T95をK95に突然変異させる。別の実施形態では、N47をR47に突然変異させる。

【0136】

例えば、非グリコシル化(即ち、グリコシル化を欠く)抗体を作製し得る。グリコシル化を改変して、例えば、抗体の抗原に対する親和性を増加させることができる。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の1つ以上のグリコシル化部位を改変することによって獲得することができる。例えば、1つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の排除をもたらし、それによりその部位でのグリコシル化を排除する、1つ以上のアミノ酸置換を行い得る。かかる非グリコシル化は、抗体の抗原に対する親和性を増加させ得る。例えば、米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号を参照されたい。

【0137】

加えてまたはあるいは、本抗体は、減少した量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体または増加した二分GlcNAc構造を有する抗体などの改変された種類のグリコシル化を有し得る。かかる改変されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが示されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって獲得することができる。改変されたグリコシル化機構を有する細胞は、当該技術分野で説明されており、本発明の組み換え抗体を発現することにより改変されたグリコシル化を有する抗体を産生する宿主細胞として使用することができる。例えば、Ms704、Ms705、およびMs709細胞株は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子であるFUT8((1,6)-フコシルトランスフェラーゼ)を欠き、その結果、Ms704、Ms705、およびMs709細胞株に

10

20

30

40

50

において発現された抗体がその炭水化物上でフコースを欠くようにする。Ms704、Ms705、およびMs709 FUT8^{-/-}細胞株を、2つの代置ベクターを使用するCHO/DG44細胞におけるFUT8遺伝子の標的化した断絶によって作出した(米国特許公開第20040110704号、およびYamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22を参照)。別の例として、EP 1,176,195は、細胞株中で発現される抗体が、-1,6結合関連酵素を低減させるかまたは排除することによって低フコシル化を呈するように、フコシルトランスフェラーゼをコードする機能的に断絶したFUT8遺伝子を有する細胞株を説明している。EP 1,176,195はまた、フコースを抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンに添加するための低い酵素活性を有するか、または酵素活性を有しない細胞株、例えば、ラット骨髄腫細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)を説明している。PCT公開第WO 03/035835号は、フコースをAsn(297)結合炭水化物に結合させる能力が低減し、同様にその宿主細胞中で発現される抗体の低フコシル化をもたらす変異型CHO細胞株であるLec13細胞を説明している(Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照)。修飾グリコシル化プロファイルを有する抗体は、PCT公開第WO 06/089231号に記載されているように鶏卵中で産生させることもできる。あるいは、修飾グリコシル化プロファイルを有する抗体は、アオウキクサ属などの植物細胞中で産生させることができる。植物系における抗体の産生方法は、2006年8月11日出願のAlston & Bird LLP弁理士整理番号040989/314911に対応する米国特許出願に開示されている。PCT公開第WO 99/54342号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように操作され、その結果、操作された細胞株中で発現される抗体が抗体の増加したADCC活性をもたらす増加した二分GlcNaC構造を呈するようになる細胞株を記載している(Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180も参照)。あるいは、抗体のフコース残基は、フコシダーゼ酵素を使用して切断することができ、例えば、フコシダーゼ-L-フコシダーゼは、フコシル残基を抗体から除去する(Tarentino et al. (1975) Biochem. 14:5516-23)。

【0138】

本発明の抗体の可変領域を改変して、1つ以上のグリコシル化部位を排除し、かつ/または抗体の物理的安定性を改善することができる。例えば、一実施形態では、抗体の物理的安定性は、セリンを可変領域の228位にてプロリン残基で置換することによって改善される(即ち、抗体は、S228P突然変異を含む可変領域を有する)。S228P改変は、抗体構造を鎖内ジスルフィド結合の形成に対して顕著に安定させる。一実施形態では、本発明の全長抗体は、S228P改変を有するIgG4アイソタイプ(IgG4 S228P)である。

【0139】

別の実施形態では、可変領域を改変して、可変領域に存在する1つ以上のグリコシル化部位を排除する。より具体的には、グリコシル化を生じやすい部位を除去することが本抗体の配列において望ましい。上記のように、これは、特にN残基および/またはS若しくはT残基の置換によって、親可変領域で生じる1つ以上のN-X-(S/T)配列(Xは任意のアミノ酸残基である)の発生を改変することによって達成することができる。一実施形態では、T95をK95に突然変異させる。別の実施形態では、N47をR47に突然変異させる。

【0140】

フレームワークまたはCDR領域内で行われた修飾に加えて、またはその代わりに、本発明の抗体は、典型的には、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または抗原依存性細胞毒性などの抗体の1つ以上の機能特性を改変するために、Fc領域内に修飾

10

20

30

40

50

を含むように操作することができる。本抗体はまた、ここでも抗体の1つ以上の機能特性を改変するために、そのグリコシル化を改変するように化学修飾（例えば、1つ以上の化学部分を抗体に結合させ得る）または修飾することができる。これらの実施形態の各々は、以下で更に詳述する。Fc領域における残基の付番は、KabatのEUインデックスのものである。

【0141】

ある特定の実施形態では、本発明は、全てではないが一部のエフェクター機能を保有することで、インビボの抗体の半減期は重要であるが、ある特定のエフェクター機能（補体およびADCCなど）は不要または有害である用途に望ましい候補となる抗体変異体を企図する。インビトロおよび/またはインビボの細胞毒性アッセイを実施して、CDCおよび/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを実施して、抗体がFcγR結合を欠く（このため、ADCC活性を欠く可能性が高い）が、FcRn結合能力を保持することを確実にし得る。ADCCを媒介するための一次細胞、NK細胞は、FcγRIIIのみを発現し、一方で探求は、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch, J. V. and Kinet, J. P., *Annu Rev. Immunol.* 9 (1991) 457 - 492の464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評定するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7059 - 7063、およびHellstrom, I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1499 - 1502を参照）、米国特許第5,821,337（Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351 - 1361を参照）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いてもよい（例えば、ACTI.TM.フローサイトメリー用非放射性細胞毒性アッセイ（non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry）（Cell Technology, Inc. Mountain View, Calif., およびCytotox 96.RTM.非放射性細胞毒性アッセイ（Promega, Madison, Wis.を参照）。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。あるいはまたは加えて、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652 - 656に開示されているものなどの動物モデルにおいて評定してもよい。またC1q結合アッセイを実行して、抗体がC1qに結合することができないためにCDC活性を欠くことを確認してもよい。例えば、WO 2006/029879およびWO 2005/100402中のC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評定するために、CDCアッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro, H. et al., *J. Immunol. Methods* 202 (1996) 163 - 171、Cragg, M. S. et al., *Blood* 101 (2003) 1045 - 1052、およびCragg, M. S. and M. J. Glennie, *Blood* 103 (2004) 2738 - 2743を参照）。FcRn結合およびインビボクリアランス/半減期の決定も、当該技術分野で既知の方法を使用して行うことができる（例えば、Petkova, S. B. et al., *Int. Immunol.* 18 (2006) 1759 - 1769を参照）。

【0142】

特定の実施形態では、本抗体は、抗体の物理的安定性を改善するように突然変異される可変領域を含む。一実施形態では、本抗体は、重鎖定常領域のヒンジ領域における228位に対応する位置でのセリンからプロリンへの突然変異（S228P、EUインデックス）を含むIgG4アイソタイプ抗体である。この突然変異は、ヒンジ領域における重鎖間ジスルフィド架橋の不均一性を排することが報告されている（前出のAngalら；24

10

20

30

40

50

1 位は K a b a t 付番システムに基づく)。例えば、様々な実施形態では、本発明の抗 C 6 抗体は、前出の A n g a l らに記載の 2 4 1 位に対応する位置でのセリンがプロリンに突然変異した、ヒト I g G 4 定常領域に結合した本明細書に記載の抗体のいずれかの重鎖可変領域を含み得る。このように、ヒト I g G 4 定常領域に結合した重鎖可変領域について、この突然変異は、E U インデックスによる S 2 2 8 P 突然変異に対応する。

【 0 1 4 3 】

別の実施形態では、C H 1 のヒンジ領域は、ヒンジ領域におけるシステイン残基の数が改変される、例えば、増加または減少するように修飾される。この手法は、米国特許第 5 , 6 7 7 , 4 2 5 号で更に説明されている。C H 1 のヒンジ領域におけるシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の組み立てを促進するように、または抗体の安定性を増加または減少させるように改変される。

10

【 0 1 4 4 】

別の実施形態では、抗体の F c ヒンジ領域は、抗体の生物学的半減期を減少させるように突然変異される。より具体的には、1 つ以上のアミノ酸突然変異は、抗体が、天然 F c - ヒンジドメイン S p A 結合に対する障害のあるスタフィロコッカス (S t a p h y l o c o c c y l) タンパク質 A (S p A) 結合を有するように、F c - ヒンジ断片の C H 2 - C H 3 ドメイン界面領域に導入される。この手法は、米国特許第 6 , 1 6 5 , 7 4 5 号で更に説明されている。

【 0 1 4 5 】

別の実施形態では、本抗体は、その生物学的半減期を増加させるように修飾される。様々な手法が可能である。例えば、米国特許第 6 , 2 7 7 , 3 7 5 号に記載のように、T 2 5 2 L、T 2 5 4 S、T 2 5 6 F の突然変異のうちの 1 つ以上を導入することができる。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、本抗体を、I g G の F c 領域の C H 2 ドメインの 2 つのループから採取したサルベージ受容体結合エピトープを含むように、C H 1 または C L 領域内で改変し得、これは、米国特許第 5 , 8 6 9 , 0 4 6 号および同第 6 , 1 2 1 , 0 2 2 号に記載の通りである。更に別の手法においては、本抗体は、2 つの突然変異、4 3 4 位のセリンでの 1 つと、3 1 1 位のイソロイシン、3 1 1 位のバリン、4 3 6 位のイソロイシン、および 4 3 6 位のバリンからなる群から選択される第 2 の突然変異とを導入することによって、その生物学的半減期を増加させるように修飾する。この手法は、米国特許公開第 2 0 1 2 / 6 1 2 8 6 6 3 号で説明されている。

20

30

【 0 1 4 6 】

更に他の実施形態では、F c 領域は、少なくとも 1 つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えて、抗体のエフェクター機能 (複数可) を改変することによって改変される。例えば、アミノ酸残基 2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 9 7、3 1 8、3 2 0、および 3 2 2 から選択される 1 つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えて、その結果、抗体が、エフェクターリガンドへの改変された親和性を有するが、親抗体への抗原結合能力を保持するようにし得る。親和性が改変されるエフェクターリガンドは、例えば、F c 受容体または補体の C 1 成分であり得る。この手法は、米国特許第 5 , 6 2 4 , 8 2 1 号および同第 5 , 6 4 8 , 2 6 0 号で更に詳述されている。

40

【 0 1 4 7 】

別の実施形態では、アミノ酸残基 3 2 9、3 3 1、および 3 2 2 から選択される 1 つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えて、その結果、抗体が、改変された C 1 q 結合および / または低減した若しくは無効となった補体依存性細胞毒性 (C D C) を有するようにし得る。この手法は、米国特許第 6 , 1 9 4 , 5 5 1 号で更に詳述されている。

【 0 1 4 8 】

別の実施形態では、アミノ酸 2 3 1 位および 2 3 9 位内の 1 つ以上のアミノ酸残基を改変して、それにより抗体が補体を結合させる能力を改変する。この手法は、P C T 公開第 W O 9 4 / 2 9 3 5 1 号で更に説明されている。

【 0 1 4 9 】

更に別の実施形態では、F c 領域を修飾して、抗体が抗体依存性細胞毒性 (A D C C)

50

を媒介する能力を増加させ、かつ／または1つ以上のアミノ酸を、238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438、若しくは439位にて修飾することによって抗体のFc受容体への親和性を増加させる。この手法は、PCT公開第WO 00/42072号で更に説明されている。更に、Fc R1、Fc RI I、Fc RI I I、およびFc RnについてのヒトIg G1上の結合部位がマッピングされ、結合が改善した変異型が説明されている(Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照)。256、290、298、333、334、および339位での特異的突然変異は、Fc RI I Iへの結合を改善することが示された。加えて、以下の組み合わせの突然変異は、Fc RI I I結合を改善することが示された: T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A、およびS298A/E333A/K334A。

【0150】

更に別の実施形態では、Fc領域を修飾して、抗体依存性細胞毒性(ADCC)を媒介する能力を低減し、かつ／またはPro329位でのアミノ酸置換、ならびに好ましくはS228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D、およびP331Sから選択される少なくとも1つの追加のアミノ酸置換を導入することによって、抗体のFc受容体への親和性を低減する。この手法は、米国特許公開第2012/0251531号で説明されている。

【0151】

低減したエフェクター機能が低減した抗体には、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、および329のうちの1つ以上の置換を伴うものが含まれる(米国特許第6,737,056号)。かかるFc突然変異には、残基265および297のアラニンへの置換を伴ういわゆる「DANA」Fc突然変異を含む、アミノ酸265、269、270、297、および327位のうちの2つ以上での置換を伴うFc突然変異が含まれる(米国特許第7,332,581)。

【0152】

FcRsへの結合が改善または衰退したある特定の抗体変異型が説明されている(例えば、米国特許第6,737,056号、WO 2004/056312、およびShields, R. L. et al., J. Biol. Chem. 276(2001)6591-6604を参照)。

【0153】

ある特定の実施形態では、抗体変異型は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、および／または334位での置換(残基のEU付番)を伴うFc領域を含む。

【0154】

一部の実施形態では、例えば、米国特許第6,194,551号、WO 99/51642、およびIdusogie, E. E. et al., J. Immunol. 164(2000)4178-4184に記載されているように、改変された(即ち、改善したかまたは衰退した)C1q結合、および／または補体依存性細胞毒性(CDC)をもたらす改変が、Fc領域において行われる。

【0155】

母体Ig Gの胎児への移送に貢献する、半減期が増加し、新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善した抗体は(Guyer, R. L. et al., J. Immunol. 117(1976)587-593、およびKim, J. K. et al., J. I

10

20

30

40

50

mmunol. 24 (1994) 2429-2434) は、US 2005/0014934 に記載されている。これらの抗体は、Fc 領域の FcRn への結合を改善する、中に 1 つ以上の置換を伴う Fc 領域を含む。かかる Fc 変異型には、Fc 領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または 434 のうちの 1 つ以上での置換、例えば、Fc 領域残基 434 の置換を伴うものが含まれる（米国特許第 7,371,826 号）。Fc 領域変異型の他の例については、Duncan, A. R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740、米国特許第 5,648,260 号、米国特許第 5,624,821 号、および WO 94/29351 号も参照されたい。

10

【0156】

加えて、本抗体は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させるためにペグ化することができる。抗体をペグ化するために、典型的には、本抗体またはその断片を、ポリエチレングリコール（PEG）、例えば、PEG の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体と、1 つ以上の PEG 群が抗体または抗体断片に結合した状態となる条件下で反応させる。好ましくは、ペグ化は、反応性 PEG 分子（または類似した反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化によって実行する。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、他のタンパク質を誘導体化するために使用されてきた PEG の形態の任意のもの、例えば、モノ（C1-C10）アルコキシ若しくはアリアルコキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドを包含することが意図される。ある特定の実施形態では、ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は、当該技術分野で既知であり、本発明の抗体に適用することができる。例えば、EP 0 154 316 および EP 0 401 384 を参照されたい。

20

【0157】

C6 に対するモノクローナル抗体の特性評価

本発明のモノクローナル抗体は、様々な既知の技法を使用して、C6 への結合および/または C6 の機能的阻害について特性評価することができる。典型的には、抗体のその標的抗原への結合は、まず ELISA によって特性評価する。端的には、マイクロタイタープレートを PBS 中の精製した C6 でコーティングした後、PBS 中で希釈したウシ血清アルブミン（BSA）などの無関係のタンパク質で遮断し得る。C6 で免疫付与したマウスからの血漿の希釈物を各ウェルに加え、37 で 1~2 時間インキュベートした。プレートを PBS/Tween 20 で洗浄した後、アルカリホスファターゼと複合体化させたヤギ抗ヒト IgG Fc 特異的ポリクローナル試薬と共に、37 で 1 時間インキュベートした。洗浄後、プレートを、ABTS 基質を用いて現像し、405 の OD にて分析した。好ましくは、最も高い結合および/または機能的阻害活性を呈する抗体の最も高い力価を発現するマウスを融合に使用する。

30

【0158】

上記の ELISA アッセイを使用して、抗体、故に C6 免疫原性との陽性の反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマについてスクリーニングすることができる。次に、C6 と好ましくは高い親和性で結合するハイブリドーマをサブクローニングし、更に特性評価し得る。次に、親細胞の反応性を保持する（ELISA により）各ハイブリドーマから 1 つのクローンを、細胞バンクを作製するため、および抗体精製のために選択し得る。

40

【0159】

加えてまたはあるいは、抗体が C6 活性を阻害または遮断する能力を決定した機能アッセイを、目的の抗体のスクリーニングおよび選択に使用し得る。好適なインビトロ機能アッセイには、実施例 1 で詳述するように、溶血アッセイおよび MAC-ELISA アッセイが含まれる。インビボで機能活性を決定するための好適なアッセイは、実施例 4 で詳述する。

【0160】

50

抗C6抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマを、ローラーボトル、2リットルのスピナーフラスコまたは他の培養系において成長させ得る。上清を濾過し濃縮した後、タンパク質A-セファロース(Pharmacia, Piscataway, NJ)を用いた親和性クロマトグラフィーを行い、タンパク質を精製し得る。PBSへの緩衝液交換後、濃度を、1.43の吸光係数を使用するOD₂₈₀によって、または好ましくは比濁分析によって決定し得る。IgGは、ゲル電気泳動によって、または抗原特異的方法によって確認し得る。

【0161】

選択された抗C6モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを決定するために、各抗体を、市販の試薬(Pierce, Rockford, IL)を使用してビオチン化し得る。ビオチン化MAb結合は、ストレプトアビジンで標識したプローブを用いて検出し得る。精製した抗体のアイソタイプを決定するために、アイソタイプELISAを、当該技術分野で認識されている技法を使用して行い得る。例えば、マイクロタイタープレートのウェルを4で一晩10μg/mlの抗Igでコーティングし得る。5%のBSAでブロッキングした後、プレートを、2時間周囲温度で10μg/mlのモノクローナル抗体または精製したアイソタイプ対照と反応させる。次に、ウェルを他のアイソタイプ特異的複合体化プローブのいずれかと反応させ得る。プレートを現像し、上記のように分析する。

【0162】

様々な抗C6抗体の結合親和性、交差反応性、および結合動態を分析するための方法としては、当該技術分野で既知の標準的なアッセイ、例えば、本明細書の実施例2に記載するBiacore(商標)2000 SPR計器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用するBiacore(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)分析が挙げられる。

【0163】

好ましくは、本発明の抗体は、K_Dが5×10⁻⁸M以下でC6に結合し、K_Dが2×10⁻⁸M以下でC6に結合し、K_Dが5×10⁻⁹M以下でC6に結合し、K_Dが4×10⁻⁹M以下でC6に結合し、K_Dが3×10⁻⁹M以下でC6に結合し、K_Dが2×10⁻⁹M以下でC6に結合し、K_Dが1×10⁻⁹M以下でC6に結合し、K_Dが5×10⁻¹⁰M以下でC6に結合し、またはK_Dが2.5×10⁻¹⁰M以下でC6に結合する。

【0164】

好ましくは、本発明の抗体は、少なくとも24時間、または少なくとも30時間、または少なくとも36時間、または少なくとも40時間、または少なくとも45時間のT_{1/2}(表面プラズモン共鳴によって決定した場合)を有する。

【0165】

抗体の物理的特性

本開示の抗体は、その様々な物理的特性によって特性評価して、その異なるクラスを検出および/または区別することができる。

【0166】

好ましい実施形態では、本開示の抗体は、アスパラギン異性部位を含有しない。アスパラギンの脱アミド化は、N-GまたはD-G配列上で生じ、ポリペプチド鎖にキックを導入しその安定性を減少させる(イソアスパラギン酸効果)イソアスパラギン酸残基の作出をもたらす得る。

【0167】

各抗体は、一般に6~9.5のpH範囲に入る固有の等電点(pI)を有することになる。IgG1抗体についてのpIは、典型的には、7~9.5のpH範囲に入り、IgG4抗体についてpIは、6~8のpH範囲に入る。pIが正常範囲を外れている抗体は、インビボ条件下で何らかのアンフォールディングおよび不安定性を有し得ると推測される。このため、正常範囲に入るpI値を含む抗C6抗体を有することが好ましい。これは、

pI が正常範囲内である抗体を選択するか、または荷電表面残基を突然変異させることによって達成することができる。

【0168】

好ましい実施形態では、急速に分解しない抗体を選択する。抗体の分解は、キャピラリー電気泳動 (CE) および MALDI-MS を使用して測定することができる (Alexander AJ and Hughes DE (1995) Anal Chem 67: 3626 - 32)。

【0169】

別の好ましい実施形態では、抗体は、望ましくない免疫応答および/または改変された若しくは好ましくない薬物動態特性の誘発に繋がり得る凝集が最小限である抗体を選択する。一般的に、凝集が 25 % 以下、好ましくは 20 % 以下、更により好ましくは 15 % 以下、更により好ましくは 10 % 以下、および更により好ましくは 5 % 以下の抗体が許容可能である。凝集は、サイズ排除カラム (SEC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、および光散乱を含む、いくつかの技法によって測定することができる。

【0170】

各抗体は、特有の融解温度を有することになり、より高い融解温度は、インビボでのより優れた全体的安定性を示す (Krishnamurthy R and Mannin MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3: 361 - 71)。一般的に、 T_{M1} (初期アンフォールディングの温度) は、60 超、好ましくは 65 超、更により好ましくは 70 超であることが好ましい。抗体の融点は、示差走査熱量測定 (Chen et al (2003) Pharm Res 20: 1952 - 60、Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68: 47 - 52) または円偏光二色性 (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40: 343 - 9) を使用して測定することができる。

【0171】

一実施形態では、本発明の抗体は、高い融解温度を有する。一実施形態では、抗体は、少なくとも 65 、より好ましくは少なくとも 66 、更により好ましくは少なくとも 67 、および更により好ましくは少なくとも 68 の融点を有する。好ましくは、本発明の抗体は、67 ~ 72 、より好ましくは 68 ~ 72 、または 69 ~ 72 、または 70 ~ 72 、または 69 ~ 71.43 の範囲の融点を有する。

【0172】

II. 免疫毒素、免疫抱合体、および抗体誘導体

別の実施形態では、本発明の抗体は、細胞毒素、薬物、または放射性同位体などの治療部分に連結される。細胞毒素に抱合されるとき、これらの抗体抱合体は「免疫毒素」と称される。細胞毒素または細胞毒性薬には、細胞に有害な (例えば、殺滅する) 任意の薬剤が含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド (tenoposide)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシンならびにこれらの類似体または相同体が挙げられる。治療薬としては、代謝拮抗物質薬 (例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤 (例えば、メクロレタミン、チオエパ (thioepa) クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロソスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、およびシス-ジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン (例えば、ダウノルピシン (元ダウノマイシン) およびドキシソルピシン)、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン (元アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (AMC))、お

よび抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、放射性同位体、例えば、放射性ヨウ素に抱合させて、細胞毒性放射性医薬品を生成することができる。

【0173】

本発明の抗体抱合体は、所与の生体応答を修飾するために使用することができ、薬物部分は、伝統的な化学治療薬に限定されるものと解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。かかるタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、若しくはジフテリア毒素などの酵素的に活性な毒素若しくはその活性断片；腫瘍壊死因子若しくはインターフェロン - などのタンパク質；または例えば、リンフォカイン、インターロイキン - 1 (「IL - 1」)、インターロイキン - 2 (「IL - 2」)、インターロイキン - 6 (「IL - 6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM - CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G - CSF」)、若しくは他の成長因子などの生体応答修飾物質が含まれ得る。

【0174】

かかる治療部分を抗体に抱合させるための技法は周知であり、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.), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Thorpe, "Antibody Carriers 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.), pp. 303 - 16 (Academic Press 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。

【0175】

抗体および細胞毒素の抱合体は、様々な二官能性タンパク質結合剤、例えば、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール)プロピオン酸塩、イミノチオラン、アジプイミド酸ジメチルHCLなどのイミドエステルの二官能性誘導体、スベリン酸ジスクシンイミジルなどの活性エステル、グルタルアルデヒドなどのアルデヒド、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミンなどのビス - アジド化合物、トルエン2, 6 - ジイソシアネートなどのジイソシアネート、およびビス - 活性フッ素化合物 (1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼンなど)を使用して作製し得る。C¹⁴ 標識化1 - イソチオシアノベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX - DTPA) は、放射性核種の抗体への抱合に好適なキレート剤である。

【0176】

免疫毒素の毒素成分は、例えば、化学療法剤、細菌、真菌、植物、若しくは動物起源の酵素的に活性な毒素若しくはその断片などの毒素、または小分子毒素、または²¹²Bi

10

20

30

40

50

、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re などの放射性アイソトープであり得る。

【0177】

かかる免疫抱合体の生成に有用な化学療法剤としては、DM-1およびDM-4を含むメイタンシノイド、オーリスタチン、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド(「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、シトキシン、タキソイド、例えば、バクリタキセル、およびドセタキセル、タキソテール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イフォサミド(ifosamide)、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン、5-FU、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アクチノマイシンD、VP-16、クロラムブシル、メルファラン、ならびに他の関連するナイトロジェンマスタードが挙げられる。タモキシフェンおよびオナプリストンなどの、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用するホルモン剤も含まれる。使用することができる毒素およびその断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、コレラ毒素、ボツリヌス毒素、外毒素A鎖(緑膿菌由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファサルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンシン(dianthin)タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(phytolacca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ツルレイシ(momordica charantia)阻害剤、クルシン、クロチン、サバオナリアオフィシナリス(sapaonarialis)阻害剤、ゲロニン、サボリン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)、およびトリコセン(tricothene)が挙げられる。小分子毒素としては、例えば、カリケアマイシン、メイタンシノイド、パリトキシン、およびCC1065が挙げられる。

【0178】

抗体を抱合させて免疫毒素を形成し得る追加の治療薬としては、代謝拮抗物質薬、アルキル化剤、DNA小溝結合剤、DNA挿入剤、DNA架橋剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害薬、核外輸送阻害剤、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼIまたはII阻害剤、熱ショックタンパク質阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、抗生物質、および抗有糸分裂剤が挙げられる。抱合体において、抗体および治療薬は、好ましくは、ペプチジル、ジスルフィド、またはヒドラゾンリンカーなどの切断可能なリンカーによって抱合される。より好ましくは、リンカーは、Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val(配列番号15)、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser、またはGluなどのペプチジルリンカーである。複合体は、米国特許第7,087,600号、同第6,989,452号、および同第7,129,261号、PCT公開第WO 02/096910号、同第WO 07/038658号、同第WO 07/051081号、同第WO 07/059404号、同第WO 08/083312号、および同第WO 08/103693号、米国特許公開第20060024317号、同第20060004081号、および同第20060247295号に記載されているように調製することができ、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0179】

本発明の抗体はまた、試料試験およびインビボの撮像を含む診断目的に使用することもでき、この目的のために、抗体(またはその結合断片)を適切な検出可能な薬剤に抱合させて、免疫抱合体を形成し得る。診断目的で、適切な薬剤は、全身撮像については放射性同位体を含む検出可能な標識、試料試験については、放射性同位体、酵素、蛍光標識、および他の好適な抗体タグである。

【0180】

C6検出には、検出可能な標識は、インビトロ診断の分野で現在使用されている様々な型のうちのいずれかであることができ、これには、コロイド金などの金属ゾルを含む微粒子標識、例えば N_2S_2 、 N_3S 、若しくは N_4 型のペプチドキレート剤によって提示される I^{125} または Tc^{99} などのアイソトープ、蛍光マーカー、発光マーカー、リン光マーカーなどを含む発色団、ならびに所与の基質を検出可能なマーカーに変換する酵素標識、およびポリメラーゼ連鎖反応などによる増幅後に明らかとなるポリヌクレオチドタグが含まれる。好適な酵素標識には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどが含まれる。例えば、標識は、1,2ジオキセタン基質、例えば、アダマンチルメトキシホスホリルオキシフェニルジオキセタン(AMPPD)、二ナトリウム3-(4-(メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ{3.3.1.1^{3,7}}デカン}-4-イル)フェニルホスフェート(CSPD)、ならびにCDPおよびCDP-star(登録商標)または当業者に周知の他の発光基質、例えば、テルビウム(III)およびユウロピウム(III)などの好適なランタニドのキレートの変換後の化学発光の存在または形成を測定することによって検出される酵素アルカリホスファターゼであり得る。検出手段は、選択した標識によって決定される。標識またはその反応産物の外観は、標識が微粒子であり適切なレベルで蓄積する場合には裸眼を使用するか、分光光度計、照度計、蛍光光度計、および同様のものなどの計器を全て標準的な慣行に従って使用して、獲得し得る。

【0181】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供する抗体を更に修飾して、当該技術分野で既知であり、容易に利用可能である追加の非タンパク質性部分を含有させてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分としては水溶性ポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレン(propylene)グリコールホモポリマー、プロリプロピレン(prolypropylene)オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して製造において利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであり得、分枝または非分枝であってもよい。抗体に結合したポリマーの数は異なってもよく、1つ超のポリマーが結合する場合には、それらは同じ分子または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数および/または種類は、改善させる抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が定義された条件下で療法において使用されることになるかなどを含むがこれらに限定されない考慮すべき事柄に基づいて決定し得る。

【0182】

別の実施形態では、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る抗体と非タンパク質性部分との複合体が提供される。一実施形態では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである(Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(2005)11600-11605)。放射線は、いずれの波長であってもよく、通常の細胞を害さず、非タンパク質性部分を抗体-非タンパク質性部分の近位にある細胞が殺滅される温度に加熱する波長を含むが、これに限定されない。

【0183】

実質的に(またはほぼ)非免疫原性である連結をもたらず複合体化が特に好適である。したがって、ペプチド-(即ち、アミド-)、スルフィド-(立体障害)、ジスルフィド-、ヒドラゾン-、またはエーテル連結が特に好適である。これらの連結は、ほぼ非免

疫原性であり、血清中で適度な安定性を示す（例えば、Senter, P. D., Curr. Opin. Chem. Biol. 13 (2009) 235 - 244、WO 2009/059278、WO 95/17886を参照）。

【0184】

部分および抗体の生化学的性質に応じて、異なる複合体化戦略が利用可能である。この部分が天然に存在するかまたは50～500個のアミノ酸の組み換えである場合、当業者であれば容易に理解できるタンパク質複合体の合成についての化学を説明しているテキスト中の標準的な手順がある（例えば、Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47 (2008) 10030 - 10074を参照）。一実施形態では、抗体または部分内のシステイン残基とのマレイミド部分の反応を使用する。これは、例えば、抗体のFabまたはFab'断片を使用する場合に特に好適な結合化学である。あるいは、一実施形態では、抗体または部分のC末端部への結合を行う。例えばFab断片のタンパク質のC末端修飾は、例えば、説明されているように行い得る（Sunbul, M. and Yin, J., Org. Biomol. Chem. 7 (2009) 3361 - 3371）。

10

【0185】

一般に、部位特異的反応および共有結合は、天然アミノ酸を、存在する他の官能基の反応性と直交である反応性を有するアミノ酸に形質転換することに基づく。例えば、希少配列構成内の特異的システインをアルデヒド中で酵素的に転換させ得る（Frese, M. A., and Dierks, T., ChemBioChem. 10 (2009) 425 - 427を参照）。ある特定の酵素の所与の配列構成にある天然アミノ酸との特異的酵素反応性を利用して所望のアミノ酸修飾を得ることも可能である（例えば、Taki, M. et al., Prot. Eng. Des. Sel. 17 (2004) 119 - 126、Gautier, A. et al. Chem. Biol. 15 (2008) 128 - 136；およびC - N結合のプロテアーゼ触媒形成がBordusa, F., Highlights in Bioorganic Chemistry (2004) 389 - 403によって使用されている）。

20

【0186】

部位特異的反応および共有結合も、適切な修飾試薬を用いて末端アミノ酸の選択的反応によって達成することができる。

30

【0187】

N末端システインのベンゾニトリルとの反応性（Ren, H. et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48 (2009) 9658 - 9662）を使用して、部位特異的共有結合を達成し得る。

【0188】

天然の化学的ライゲーションも、C末端システイン残基に依存し得る（Taylor, E. Vogel; Imperiali, B., Nucleic Acids and Molecular Biology (2009), 22 (Protein Engineering), 65 - 96）。

40

【0189】

EP 1 074 563は、負に荷電したアミノ酸の範囲内のシステインの、正に荷電したアミノ酸の範囲に位置するシステインとのより速い反応に基づく複合体化方法を説明している。

【0190】

この部分はまた、合成ペプチドまたはペプチド模倣体であってもよい。ポリペプチドが化学合成される場合、直交化学反応性を有するアミノ酸をかける合成中に組み込み得る（例えば、de Graaf, A. J. et al., Bioconj. Chem. 20 (2009) 1281 - 1295を参照）。多種多様な直交官能基が問題となり、合成ペプチドに導入され得るため、かかるペプチドのリンカーへの複合体化は、標準的な化学である。

50

【0191】

単標識されたポリペプチドを得るために、1:1の化学量論の複合体を、他の複合体化副生物からクロマトグラフィーによって分離し得る。この手順は、染料で標識した結合対メンバーおよび荷電したリンカーを使用することによって促進することができる。この種の標識され高度に負に荷電した結合対メンバーを使用することによって、電荷および分子量の差異を分離に使用できるため、単一複合体化ポリペプチドは、非標識ポリペプチド、および1つ超のリンカーを担持するポリペプチドから容易に分離される。蛍光染料は、複合体を標識した一価結合剤のような非結合成分から精製するのに有用であり得る。

【0192】

一実施形態では、エフェクター部分は、結合部分、標識化部分、および生物学的に活性な部分からなる群から選択される。

10

【0193】

III. 組成物

別の実施形態では、本発明は、組成物、例えば、担体（例えば、薬学的に許容される担体）と共に製剤化した1つの本発明のモノクローナル抗体またはその組み合わせを含有する組成物を提供する。本発明の抗体を含む二重特異性分子を含有する組成物も提供される。一実施形態では、本組成物は、複数（例えば、2つ以上）の本発明の単離された抗体の組み合わせを含む。好ましくは、本組成物の抗体の各々は、明確に異なる事前に選択されたC6のエピトープに結合する。

【0194】

20

本発明の薬学的組成物は、併用療法において、即ち、他の薬剤と組み合わせて投与することもできる。例えば、併用療法は、抗炎症薬、DMARD（疾患修飾性抗リウマチ薬）、免疫抑制剤、および化学療法薬などの少なくとも1つ以上の追加の治療薬を伴う本発明の組成物を含み得る。本発明の薬学的組成物は、放射線療法と組み合わせて投与することもできる。他の抗体との同時投与も本発明に包含される。

【0195】

本明細書で使用される場合、「担体」および「薬学的に許容される担体」という用語は、生理学的に適合性であるありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または表皮投与（例えば、注射または注入による）に好適である。投与経路に応じて、活性化化合物、即ち、抗体、二重特異性および多特異性分子は、酸の作用および化合物を不活性化し得る他の自然条件から化合物を保護するために物質でコーティングしてもよい。

30

【0196】

本発明の抗体および構築物と共に使用し得るアジュバントの例としては、完全および不完全フロイトアジュバント（Difco Laboratories, Detroit, Mich.）；Merck Adjuvant 65（Merck and Company, Inc., Rahway, N. J.）；AS-2（SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.）；水酸化アルミニウムゲル（alum）またはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩；カルシウム、鉄、または亜鉛の塩；アシル化チロシンの不溶性懸濁液；アシル化糖；カチオンまたはアニオン誘導体化多糖；ポリホスファゼン；生分解性ミクロスフェア；GM-CSF、インターロイキン-2、-7、-12、および他の同様の因子などのサイトカイン；3D-MPL；CpGオリゴヌクレオチド；ならびにモノホスホリルリピドA、例えば、3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドAが挙げられる。

40

【0197】

MPLアジュバントは、Corixa Corporationから入手可能である（Seattle, Wash、例えば、米国特許第4,436,727号、同第4,877,611号、同第4,866,034号、および同第4,912,094号を参照されたい）。CpG含有オリゴヌクレオチド（CpGジヌクレオチドがメチル化されていない）

50

が周知であり、例えば、WO 96/02555、WO 99/33488、および米国特許第6,008,200号および同第5,856,462号に記載されている。免疫刺激DNA配列も、例えば、Sato et al., Science 273:352, 1996によって説明されている。

【0198】

更なる代替的なアジュバントとしては、例えば、QS21およびQS7、エスチン、ジギトニン、またはカスミソウ (*Gypsophila*) 若しくはキヌア (*Chenopodium quinoa*) サポニンを含む、Quil Aなどのサポニン若しくはその誘導体 (*Aquila Biopharmaceuticals Inc.*, Framingham, Mass.); Montanide ISA 720 (Seppic, France); SAF (*Chiron, California, United States*); ISCOMS (CSL)、MF-59 (*Chiron*); SBASシリーズのアジュバント (例えば、*SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium* から入手可能な SBAS-2 または SBAS-4); Detox (Enhanceyn (商標)) (*Corixa, Hamilton, Mont.*); RC-529 (*Corixa, Hamilton, Mont.*) および他のアミノアルキルグルコサミニド4-リン酸塩 (AGP); WO 99/52549A1 に記載されているものなどのポリオキシエチレンエーテルアジュバント; イミキモド [S-26308、R-837] (*Harrison, et al.*, Vaccine 19:1820-1826, 2001、およびレシキモド [S-28463, R-848] (*Vasilakos, et al.*, Cellular immunology 204:64-74, 2000) などの合成イミダゾキノリン; ツカレソール (*tucaresol*) (*Rhodes, J. et al.*, Nature 377:71-75, 1995) などの抗原提示細胞およびT細胞表面に恒常的に発現するカルボニルおよびアミンのシッフ塩基; 例えば、インターフェロン、GM-CSF、IL-1アルファ、IL-1ベータ、TGF-アルファ、およびTGF-ベータなどの炎症誘発性サイトカイン、インターフェロンガンマ、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、およびIL-21などのTh1誘導因子、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、およびIL-13などのTh2誘導因子、ならびにMCP-1、MIP-1アルファ、MIP-1ベータ、RANTES、TCA-3、CD80、CD86、およびCD40Lなどの他のケモカインおよび共刺激遺伝子を含む、タンパク質またはペプチドのいずれかとしてのサイトカイン、ケモカイン、および共刺激分子; CTLA-4およびL-セレクチンなどのリガンドを標的とする免疫刺激剤、Fasなどのアポトーシス刺激性タンパク質およびペプチド; バクスフェクチン (*vaxfectin*) (*Reyes et al.*, Vaccine 19:3778-3786, 2001) スクアレノ、アルファ-トコフェロール、ポリソルベート80、DOPC、およびコレステロールなどの合成脂質系アジュバント; 内毒素 [LPS] (*Beutler, B.*, Current Opinion in Microbiology 3:23-30, 2000); 合成マイコバクテリアリポタンパク質、マイコバクテリアタンパク質p19ペプチドグリカン、テイコ酸、およびリピドAなどのToll受容体にTh1誘導性サイトカインを産生させるリガンド; ならびにCT (コレラ毒素、サブユニットAおよびB) およびLT (大腸菌からの易熱性腸毒素、サブユニットAおよびB)、熱ショックタンパク質ファミリー (HSP)、およびLLO (リステリオリシンO; WO 01/72329) が挙げられる。これらおよび様々な更なるToll様受容体 (TLR) アゴニストは、例えば、Kanzler et al., Nature Medicine, May 2007, Vol 13, No 5 に記載されている。

【0199】

「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、いずれの望まれない毒性効果も与えない塩を指す (例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19 を参照)。かかる塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩には、塩化水素、窒素、リン、硫黄、

10

20

30

40

50

臭化水素、ヨウ化水素、亜リン、および同様のものなどの非毒性無機酸に由来するもの、ならびに脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香酸、脂肪族および芳香族スルホン酸、および同様のものなどの非毒性有機酸が含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、および同様のものなどのアルカリ土類金属に由来するもの、ならびにN, N' - ジベンジルエチレンジアミン、N - メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン、および同様のものなどの非毒性有機アミンが含まれる。

【0200】

本発明の組成物は、当該技術分野で既知の様々な方法によって投与され得る。当業者には理解されるように、投与経路および/または様式は、所望の結果に応じて異なることになる。活性成分は、化合物を急速な放出から保護する担体、例えば、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む放出制御製剤と共に調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性のポリマーを使用することもできる。かかる製剤の調製のための多くの方法が特許取得され、当業者に一般に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0201】

本発明の化合物をある特定の投与経路によって投与するためには、その不活性化を防止するための物質によって化合物をコーティングするか、またはこの物質を同時投与することが必要となる場合がある。例えば、本化合物は、適切な担体、例えば、リボソーム、または希釈剤中で対象に投与してもよい。許容される希釈剤としては、生理食塩水および緩衝水溶液が挙げられる。リボソームとしては、水中油中水型CGFエマルジョン、および従来のリボソームが挙げられる(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

【0202】

担体としては、無菌水溶液または分散液、および無菌注射溶液または分散液の即時調製のための無菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質に対するかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で既知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と適合性でない限り、本発明の薬学的組成物におけるその使用が企図される。追加の活性化合物も本組成物に組み込むことができる。

【0203】

治療用化合物は、典型的には、製造および保管条件下で無菌および安定である必要がある。本組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リボソーム、または高い薬物濃度に好適な他の秩序構造として製剤化し得る。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)、およびこれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適当な流動性を、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散剤の場合には求められる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持し得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましくなる。注射組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによって引き起こすことができる。

【0204】

無菌注射溶液は、必要量の活性化合物を、上で列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒中に組み込んだ後、無菌精密濾過を行うことによって調製し得る。一般に、分散液は、活性化合物を、塩基性分散媒および上で列挙したものからの求められる他の成分を含有する無菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。無菌注射溶液用の無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分の粉末、それに加えてその事前に無

菌濾過した溶液からの任意の更なる所望の成分を生む、真空乾燥および凍結乾燥 (freeze-drying) (凍結乾燥 (lyophilization)) である。

【0205】

投薬レジメンは、最適な所望の応答 (例えば、治療応答) を提供するように調整する。例えば、単回ボラスを投与してもよく、いくつかに分割した用量を、時間をかけて投与してもよく、あるいは用量を、治療状況の危急によって示される通りに比例的に低減するかまたは増加させてもよい。例えば、本発明の抗体は、皮下若しくは筋肉内注射によって週に1回若しくは2回、または皮下若しくは筋肉内注射によって月に1回または2回、投与してもよい。

【0206】

親組成物は、投与の簡便性及製剤均一性のために投与単位で製剤化することが特に有利である。本明細書で使用される投与単位は、治療される対象への単位剤形として適した物理的に別々の単位を指し、各単位は、求められる薬学的担体と併せて所望の治療効果を生むように計算された所定の量の活性化化合物を含有する。本発明の投与単位の明細は、活性化化合物の固有の特性、および達成すべき特定の治療効果、ならびに (b) 個人における過敏症の治療のためのかかる活性化化合物を調合する技法に内在する限界に決定付けられるか、またはそれに直接的に依存する。

【0207】

薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、(1) アスコルビン酸、システイン、塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、および同様のものなどの水溶性抗酸化剤；(2) パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール (BHA)、レシチン、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロール、および同様のものなどの油溶性抗酸化剤、ならびに (3) クエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸、および同様のものなどの金属キレート剤が挙げられる。

【0208】

本治療組成物に対して、本発明の製剤には、静脈内、腹腔内、経口、経鼻、局所 (口腔および舌下を含む)、直腸、経膈、および/または非経口投与に好適なものが含まれる。製剤は、単位剤形において簡便に提示され得、調剤学の分野で既知の任意の方法によって調製され得る。担体材料と組み合わせて単一の剤形を生産し得る活性成分の量は、治療される対象および特定の投与様式に応じて個異なることになる。担体材料と組み合わせて単一の剤形を生産し得る活性成分の量は、一般に、治療効果を生む組成物の量となる。一般に、100パーセント中、この量は、活性成分の約0.001パーセント~約90パーセント、好ましくは約0.005パーセント~約70パーセント、最も好ましくは約0.01パーセント~約30パーセントの範囲となる。

【0209】

経膈投与に好適な本発明の製剤には、当該技術分野で適切であることが知られている担体を含有する、ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、泡剤も含まれる。本発明の組成物の局所または経皮投与用剤形には、粉末剤、噴霧剤、軟膏、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、液剤、パッチ、および吸入剤が挙げられる。本活性化化合物は、薬学的に許容される担体、および必要な場合がある任意の保存剤、緩衝剤、または推進剤と無菌条件下で混合し得る。

【0210】

「非経口投与」および「非経口で投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、通常は注射による、腸内および局所投与以外の投与様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、および内部胸骨注射および注入を非限定的に含む。

【0211】

本発明の薬学的組成物中で用いてもよい好適な水性および非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール (グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコ

10

20

30

40

50

ール、および同様のものなど)およびそれらの好適な混合物、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適当な流動性を、例えば、レシチンなどのコーティング物質の使用によって、分散剤の場合には求められる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持し得る。

【0212】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントを含んでもよい。微生物の存在の防止を、前出の無菌処理と、様々な抗菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、ソルビン酸フェノール、および同様のものを含めることとの両方によって確実にし得る。糖、塩化ナトリウム、および同様のものなどの等張剤を組成物に含めることも望ましい場合がある。加えて、注射用の医薬品形態の持続的

10

【0213】

本発明の化合物をヒトおよび動物に医薬品として投与するとき、これらは、単独で、または例えば、0.001~90% (より好ましくは0.005~70%、例えば0.01~30%など)の活性成分を薬学的に許容される担体と組み合わせて含有する薬学的組成物として付与し得る。

【0214】

選択する投与経路に関わらず、好適な水和形態で使用され得る本発明の化合物および/または本発明の薬学的組成物は、当業者に既知の従来のな方法によって、薬学的に許容される剤形に製剤化される。

20

【0215】

本発明の薬学的組成物における活性成分の実際の用量レベルは、患者にとって毒となることなく、特定の患者、組成物、および投与様式のために所望される治療応答を達成するのに有効である活性成分の量を得るように、変化させ得る。選択された用量レベルは様々な薬物動態因子に依存することになり、これらの因子には、用いられる本発明の特定の組成物、またはそれらエステル、塩、若しくはアミドの活性、投与経路、投与時間、用いられる特定の化合物の排出速度、治療期間、用いられる特定の組成物と併用される他の薬物、化合物、および/または治療される患者の物質、年齢、性別、体重、状態、一般的な健康、および既往歴、ならびに医学分野で周知の同様の因子を含む。当該技術分野の医師または獣医師であれば、有効量の必要とされる薬学的組成物を容易に決定し処方することができる。例えば、医師および獣医師は、薬学的組成物中で用いられる本発明の化合物の投薬を、所望の治療効果を達成するために必要なレベルよりも低いレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで徐々に増加させ得る。一般に、好適な本発明の組成物の日用量は、治療効果を生むのに有効な最低用量である化合物の量となる。かかる有効用量は、一般に、上記の因子に依存することになる。静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下投与が好ましく、好ましくは標的の部位の近くに投与する。所望の場合、有効日用量の治療組成物は、1日を通して適切な間隔を空けて別個に投与される2、3、4、5、6、またはそれ以上の副用量として、任意選択で単位剤形で、投与してもよい。本発明の化合物を単独で投与することは可能であるが、本化合物を薬学的製剤(組成物)として投与することが好ましい。

30

40

【0216】

治療組成物は、当該技術分野で既知の医療器具を用いて投与することができる。例えば、好ましい実施形態では、本発明の治療組成物は、無針皮下注射器、例えば、米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、または同第4,596,556に開示されている器具によって投与することができる。本発明において有用な周知のインプラントおよびモジュールの例としては、医薬品を制御された速度で分注するための移植型マイクロ注入ポンプを開示している米国特許第4,487,603号;薬剤を、皮膚を通して投与するための治療器具を開示している米国特許第4,48

50

6, 194号; 医薬品を正確な注入速度で送達するための医薬品注入ポンプを開示している米国特許第4, 447, 233号; 継続的な薬物送達のための変流量移植型注入装置を開示している米国特許第4, 447, 224号; マルチチャンバコンパートメントを有する浸透圧薬物送達系を開示している米国特許第4, 439, 196号; および浸透圧薬物送達系を開示している米国特許第4, 475, 196号が挙げられる。多くの他のかかるインプラント、送達系、およびモジュールが当業者に既知である。

【0217】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、適当なインビボでの分布を確実にするように製剤化し得る。例えば、血液脳関門(BBB)は、多くの親水性が高い化合物を排除する。本発明の治療化合物がBBBをわたることを確実にするために(所望の場合)、これら例えばリポソーム中で製剤化し得る。リポソームの製造方法については、例えば、米国特許第4, 522, 811号、同第5, 374, 548号、および同第5, 399, 331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送される1つ以上の部分を含むことにより、標的化した薬物送達を強化し得る(例えば、V. V. Rana *et al.* (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685を参照)。例となる標的化部分としては、葉酸またはピオチン(例えば、Lowらの米国特許第5, 416, 016号); マンノシド(Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); 抗体(P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140、M. O. Wais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); サーフアクタントタンパク質A受容体(Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134)(これらの異なる種が本発明の製剤および発明の分子の成分を含んでもよい); p120(Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090)が挙げられ、併せてK. Keinanen、M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123、J. J. Killion、I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273も参照されたい。本発明の一実施形態では、本発明の治療化合物はリポソーム中で製剤化され、より好ましい実施形態では、このリポソームは標的化部分を含む。本組成物は、容易な注射器使用性が存在する程度に流動性である必要がある。これは製造および保管条件下で安定である必要があり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。

【0218】

本組成物は、無菌であり、本組成物を注射器によって送達できる程度に流動性である必要がある。水に加えて、担体は、等張性緩衝生理食塩溶液、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)、およびこれらの好適な混合物であり得る。適当な流動性は、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散剤の場合には求められる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持し得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトール、および塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましい。注射組成物の長期的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩またはゼラチンを組成物中に含めることによって引き起こすことができる。

【0219】

上記のように活性化合物が好適に保護されている場合、本化合物は、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な可食担体を用いて経口投与してもよい。

【0220】

IV. 本発明の使用および方法

本発明の抗C6抗体は、C6を必要とする膜侵襲複合体の形成が阻害されるように、C6をインビトロおよびインビボの両方で機能的に阻害することができる。したがって、別の態様では、本発明は、対象において膜侵襲複合体(MAC)形成または活性を阻害する方法に関し、本方法は、対象に、本発明の抗体を、対象においてMAC形成または活性を

阻害するのに有効な量で投与することを含む。別の実施形態では、本発明は、対象において補体系の望まれない活性によって媒介される障害の症状を治療、防止、または低減する方法を提供し、本方法は、対象に、有効量の本発明の抗体を投与することを含む。かかる障害の例は、以下で更に記載する。

【0221】

米国特許第8,703,136号に詳述するように(その内容全体が参照により本明細書に具体的に組み込まれる)、補体系の阻害によって軸索の再生が強化され得ることが認められている。このため、補体系の阻害、特にMAC形成の阻害のための抗C6抗体の使用は、例えば、中枢または末梢神経系の傷害または疾患による影響を受けた哺乳動物において、軸索再生が求められる状態の治療に使用することができる。本発明に従って治療され得る軸索再生を必要とする状態には、末梢または中枢神経系の物理的傷害および神経変性障害が含まれる。

10

【0222】

一実施形態では、本発明の抗体は、軸索再生を促進する。本明細書で使用される場合、「軸索再生を促進する」または「神経再生を促進する」という用語は、軸索または神経変性を低減または防止することとは区別される。軸索または神経再生の促進(または助長)は、本明細書では、軸索または神経の再生が、治療されていない対象と比較して治療される対象において改善することを意味すると理解される。軸索の改善した再生は、好ましくは、治療されていない対象と比較して治療される対象において(軸索若しくは神経傷害の後、または治療開始の後)より早い時点で生じる再生である。軸索または神経の改善した再生はまた、治療されていない対象と比較して治療される対象においてより高速におよび/またはより大きい程度に生じる再生を含む。本発明に従う抗体は、このため、感覚機能または運動機能の増大を生むことが好ましい。

20

【0223】

したがって、一実施形態では、本発明は、対象において神経を再生する方法を提供し、本方法は、対象に治療有効量の本発明の抗体を投与することを含む。別の実施形態では、本発明は、対象において損傷または変性した神経の回復を促進する方法を提供し、本方法は、対象に治療有効量の本発明の抗体を投与することを含む。更に別の実施形態では、本発明は、対象において神経の変性を低減または遅延させる方法を提供し、本方法は、対象に治療有効量の本発明の抗体を投与することを含む。

30

【0224】

対象は、末梢神経系(PNS)または中枢神経系(CNS)の傷害などの神経の物理的傷害、例えば、物理的傷害からの神経外傷を思い得る(以下で更に考察する)。物理的傷害は、例えば、外傷性傷害(例えば、事故)、外科的傷害、または非外傷性傷害(神経圧迫など)に由来し得る。一実施形態では、抗体は、傷害部位にまたはその付近に投与される。あるいは、対象は、後天性および/若しくは先天性であり得る免疫媒介性炎症性障害および/若しくは進行性神経変性障害、例えば、多発性硬化症(MS)などの慢性脱髄性神経障害、または重症筋無力症若しくは筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの他の神経変性障害といった疾患を患っている(以下で更に考察する)。

【0225】

40

軸索再生の改善は、好ましくは、ヒト対象において比較的容易に実施される機能試験によって決定され、例えば、感覚機能または運動機能の回復が、当該技術分野で利用可能な標準試験において決定されることが好ましい(例えば、Wong, K. H. et al. (2006) Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. 40: 219-224、Jerrosch-Herold (2005) Hand Surg. 30: 252-264を参照されたい)。好適な試験は、好ましくは、定量的で標準化されたものであり、より好ましくは、その精神測定学的特性を評価および定量したものである。かかる試験としては、例えば、Weinstein Enhanced Sensory Test (WEST)またはSemmes-Weinstein Monofilament Test (SWMT)、および触知認識のための形状感触識別(

50

STI) 試験が挙げられる。改善した軸索再生は、Hare, G. M. T. et al. (1992) Plastic and Reconstr. Surg. 89: 251 - 258 および De Koning, P. et al. (1986) J. Neurol. Sci. 74: 237 - 246 によって説明されているように、感覚機能または運動機能の回復についての機能試験によって、試験動物において実験的に決定し得る。抗体は、例えば、上で示した試験において決定し得るように、感覚機能または運動機能の増大を生むことが好ましい。

【0226】

実施例 8 は、本発明の抗 C6 抗体が感覚機能に与える影響を試験するために使用することができる動物モデルを詳述する。この神経挫滅モデル（坐骨神経の挫滅）を使用して、抗ヒト C6 モノクローナル抗体がヒト C6 を補充した C6 ノックアウトラット（PVC）における感覚機能の回復に与える影響を試験する。神経挫滅は、末梢神経傷害のモデルである。WO 2010/005310 (PCT/NL2009/050418)、および de Jonge et al (2004) Hum Mol Genet. 13(3): 295 - 302 を参照されたい。

【0227】

改善した軸索再生はまた、組織学的検査によって試験動物において実験的に決定してもよく、例えば、改善した再ミエリン化を、治療されていない動物および治療された動物における軸索周辺のみエリン鞘の測定値を比較することによって決定してもよく、ここでは、より厚いミエリン鞘が改善した再ミエリン化を示す。より効率的な軸索再生は、治療されていない動物におけるより小さい軸索の群と比較した場合の、治療された動物における直径が大きい単一の軸索芽の生産として決定し得る。

【0228】

抗体の適切な用量は、上記の感覚機能または運動機能の改善によって見られ得るような軸索再生を助長するのに有効な量である。「有効量」、「治療量」、または「有効用量」とは、所望の薬理効果または治療効果を引き出し、それにより傷害または障害の有効な治療をもたらすのに十分な量を意味する。

【0229】

神経傷害を最低限に抑えるためおよび/または軸索再生をできるだけ早く促進するために、本発明の方法では、抗体は、神経傷害の発生の直後に、即ち、神経傷害の発生後、24、12、6、3、2、または1時間以内、より好ましくは45、30、20、または10分以内に投与することが好ましい。本発明の一実施形態では、本抗体は、神経傷害を最低限に抑えるように、および/または神経の外科的傷害の直後に軸索再生を促進するように、神経傷害の危険を伴う手術（以下参照）の前に（例えば、予防措置として）投与してもよい。

【0230】

軸索再生を必要とする様々な状態を本発明の抗体によって治療し得る。これらの状態には、PNS の傷害および CNS の傷害が含まれる。これらの状態には、物理的傷害の結果としてのおよび疾患に起因する神経外傷が含まれる。かかる疾患には、免疫媒介性炎症性障害若しくは傷害、ならびに/または後天性および/若しくは先天性であり得る進行性神経変性障害が含まれる。

【0231】

PNS および CNS の物理的傷害は、外科的傷害を含む外傷性傷害、または非外傷性傷害であってもよい。本発明の方法および/または医薬品を用いて治療され得る外傷性 PNS および CNS 傷害としては、脊髄損傷、および衝突、自動車事故、銃創、骨折、脱臼、裂傷、または何らかの他の形態の穿通性外傷からの外傷を含む末梢神経への外傷性創傷が挙げられる。外傷を通して傷害を受けた治療され得る末梢神経には、指神経、正中神経、尺骨神経、橈骨神経、顔面神経、脊髄副神経、および腕神経叢神経が含まれる。

【0232】

外科的 PNS 傷害は、本明細書では、外科手術中に神経を除去または切断することが臨

10

20

30

40

50

床的に必要となる場合に生じる末梢神経への傷害と理解される。これは、毎年何千もの外科手術において発生する。本発明の方法および／または医薬品によって治療され得る外科的傷害を受けた末梢神経の一例としては、例えば、勃起機能および膀胱制御を支援する海綿体神経が挙げられ、これらの神経は、前立腺腫瘍およびその周辺組織の外科的除去中に損傷を受けることが多い。本発明に従って治療され得る外科的傷害を受けた末梢神経の別の例は、冠動脈バイパス術（CABG）後の横隔神経である。

【0233】

本発明の抗体によって治療され得る非外傷性物理的PNS傷害には、絞扼性神経障害としても知られる末梢神経の圧迫および／または接着が含まれる。最も一般的な絞扼性神経障害は、手根管症候群である。

10

【0234】

加えて、免疫媒介性炎症性障害または傷害が本発明の抗体によって治療され得る。これらには、自己免疫基盤を有し、乏突起膠細胞またはミエリンに直接引き起こされた損傷の結果として神経脱髄をもたらすと考えられる中枢および末梢神経系の脱髄性疾患が含まれる。かかる脱髄性疾患としては、例えば、ギランバレー症候群（GBS；炎症性脱髄性多発性神経障害、急性特発性多発性神経根炎、急性特発性多発性神経炎、フレンチポリオ（French Polio）、およびランドリーの上行性麻痺とも称される）が挙げられる。好ましくは、GBSにおける急性期の後の軸索再生を助長するために本発明の抗体を適用する。同様に、GBSの慢性的なものに見なされる慢性炎症性脱髄性多発性神経障害（CIDP）が本発明の抗体によって治療され得る。多発性硬化症（MS）は、本発明の抗体によって治療され得る別の脱髄性疾患である。

20

【0235】

本発明の抗体によって治療され得る遺伝要素を伴う更なる神経変性CNSおよび／またはPNS障害としては、筋萎縮性側索硬化症（ALS、ときにルー・ゲーリック病と呼ばれる）、シャルコー-マリー-トゥース病（遺伝性運動感覚ニューロパチー、HMSN）、およびハンチントン病（HD）が挙げられる。

【0236】

本発明を以下の実施例によって更に例解するが、これは更に限定的であると理解されるべきでない。本出願全体で引用する配列リスト、図面、および全ての参考文献、特許、公開特許出願の内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

30

【実施例】

【0237】

実施例1：ラット抗ヒトC6モノクローナル抗体の生成

ラット抗ヒトC6モノクローナル抗体を、PVG C6 - / - 株の5匹のラットをヒトC6タンパク質で免疫付与することによって生成した。当分野での現時点での理解によると、正常な齧歯動物における機能的なC6抗体の生成は極めて困難であるため、C6欠乏ラットを選択した。C6に対する免疫付与は、ヒトと齧歯動物との間のC6タンパク質の相同性の程度が高いことに起因して、野生型動物においては効率的でないと推測されている。C6欠乏動物における抗体応答は、これらの動物が循環中に機能的なC6タンパク質を有さず、それ故にC6を完全に「異質」とであるとみなす傾向にあるため、より強固である。ヒトC6を、セファロース（GE Healthcareカタログ番号17-0717-01）とカップリングした23D1マウスモノクローナル抗体23D1（L. Clayton（2005）Ph.D. Thesis, Cardiff Universityに詳述されている）を使用して親和性クロマトグラフィーを用いてヒト全血清から精製した。

40

【0238】

抗原および免疫付与：免疫付与の1週間前に、免疫付与前ブリードを、100μlの血液を尾静脈から採集することによってラットに行った。免疫付与の1日目に、ラットに、注射1回あたり250μlの体積で完全フロイトアジュバント（CFA）中100μgのC6抗原を4つの部位に皮下（s.c.）注射した。ブースター注射を、14日目および

50

21日目に再び4つのs.c.部位にて注射1回あたり250 μ lの体積で不完全フロイトアジュバント(IFA)中50 μ gのC6抗原を用いて行った。試験ブリードを、インビトロ試験のために尾静脈から100 μ lの血液を採集することによって36日目に行った。これらの試験ブリードを、C6 ELISA、C6ウェスタンブロット、および溶血アッセイ(以下で更に説明する)において分析すると、これらは、5匹全てのラットがヒトC6に対して陽性の免疫応答を有し、5匹全てのラットが溶血アッセイにおいて溶液を遮断した抗体を有し、5匹全てのラットがウェスタンブロット(変性条件)上で精製されたC6を認識した抗体を有したことを示した。融合前ブースターを、250 μ lのPBS中100 μ gの抗原の腹腔内注射によって62日目に行った。最後に、融合前ブースターを、250 μ lのPBS中100 μ gの抗原の静脈内注射(尾静脈)によって64日目に行った。2匹のラットの脾臓を66日目に採取し(他の3匹のラットは予備として残した)、単離した脾細胞をハイブリドーマの調製に使用した。

10

【0239】

ハイブリドーマ調製: ハイブリドーマを、Luk, J. M. et al. (1990) J. Immunol. Methods 129: 243-250に本質的に記載されているように標準的なポリエチレングリコール(PEG)媒介性融合を使用する、ヒトC6で免疫付与したラットからの脾細胞のY3-Ag1.2.3融合パートナー細胞との融合によって調製した。上清を採取し、ヒトC6抗原でコーティングした96ウェルプレートを使用するELISAによる抗ヒトC6抗体についての初期スクリーニングに使用した。陽性クローンを選択し、サブクローニングした。38個の陽性クローンを更なる分析のために選択した。

20

【0240】

溶血アッセイ: これらの38個の上清および対照上清を、ヒト血清を補体源として使用して、1:50の希釈にて溶血アッセイにおいて更に試験した。このアッセイでは、補体活性化抗原でコーティングした赤血球を血清の存在下でインキュベートする。血清は補体の成分を含有し、この成分は、コーティングされた赤血球と出会うときに古典的経路を通して活性化される。膜侵襲複合体(MAC)が終末補体の一部として形成され、MACは赤血球の溶解を開始する。赤血球溶解は、ODを上清において405または415nmで測定することによって定量することができ、MACの活性の直接的測定である。補体阻害剤は、それらが有効であれば赤血球溶解を定量的様式で防止することになるため、この系において試験することができる。

30

【0241】

アッセイを行うために、CFT緩衝液(Virion/Serion GmbH, Wurzburg, Germany)と共に、使用の準備ができている溶液系を商業的に入手した(Virion/Serion GmbH, Wurzburg, Germany)。CFT緩衝液を製造業者の指示に従って調製した。溶結系を低温室でローラーバンク上に配置して、赤血球を完全に混合した。CFT血清カクテルを調製するために、100 μ lのヒト血清を5mlのCFT緩衝液に添加した。50 μ lの体積の試験阻害剤の希釈物を、丸底96ウェルプレートに添加し、50 μ lのCFT血清カクテルを各ウェルに添加し、ピペティングしながら慎重に混合し、プレートを30分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。陽性対照はEDTAであった。陰性対照は、無血清またはC6欠乏血清であった。インキュベーション後、プレートを5分間2000rpmで遠沈させ(Hettich卓上遠心分離)、80 μ lの上清を、405または415nmでの測定のために平底プレートに移した。移したあと10分以内にODを測定した。

40

【0242】

試験上清を溶血アッセイにおいて希釈物に添加して、それらが赤血球溶解を防止するかどうかを決定した。例となる結果を図1Aに示し、これは、上清のある特定のものが他のものよりの強力な阻害活性を呈したことを示す。具体的には、上清#6~12が他の上清よりも強力な阻害を呈し、上清#11および#12が最も強力な阻害を示した。上清(1:50の希釈)も、ラット血清を補体源として使用して溶血アッセイにおいて試験すると

50

、阻害効果は観察されず、抗体の阻害活性がヒトC6に特異的であったことを示した。

【0243】

MAC ELISAアッセイ：第2のアッセイを使用して、上清がMAC形成を遮断することができたかどうかを決定した。このアッセイでは、プレート中のELISAウェルを、血清の存在下で、それぞれレクチンまたは補体の古典的経路のいずれかの誘発物としてマンナンまたはIgGのいずれかでコーティングする。血清は、それらがコーティングされたプレートに曝露されるときにいずれかの経路を通して活性化される補体系の成分を含有する。膜侵襲複合体(MAC)が終末補体系の一部として形成され、MACはELISAプレート上に堆積することになる。プレート上のMACの堆積は、HRP複合体化抗体によって検出し、色素源および基質の存在下での酵素反応によって視覚化することができる。この反応により、450または655nmのODの測定によって定量することができる色が生産される。ODは、MAC形成量の直接的測定である。補体阻害剤は、それらが有効であればプレート上のMACの堆積を防止または阻害することになるため、この系において試験することができる。

10

【0244】

ハイブリドーマ上清を試験するために使用する第2のアッセイでは、マンナン活性化補体ELISAアッセイを行った。端的には、ELISAプレートをマンナンでコーティングし、希釈したハイブリドーマ上清およびヒト血清を加えた。マンナンでコーティングしたプレート上で複合体を形成する補体成分は、抗体を使用して検出することができる。このアッセイに限っては、C9をMAC形成の指標として検出した。上清の非存在下と比較して上清の存在下でより少ないC9が検出される場合、これはMAC阻害を示す。使用した陽性対照はEDTAであった(反応がカルシウム依存性であるため)。

20

【0245】

アッセイを行うために、コーティング緩衝液(15mMの Na_2CO_3 、35mMの NaHCO_3 、15mMの NaN_3 、pH9.6)、遮断緩衝液(1mg/mlのBSA/HAS、10mMのトリス/HCl、pH7.4、145mMのNaCl、15nMの NaN_3 、pH7.4)、洗浄緩衝液(1xTBS、0.05%のTween 20、5mMの CaCl_2)、および希釈緩衝液(4mMのバルビタール、145mMのNaCl、2mMの CaCl_2 、1mMの MgCl_2 、0.3%のBSA、0.02%のTween 20)を調製した。平底高結合96ウェルプレートのウェルを、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のマンナン(Sigma、カタログ番号M7504)を含有する100 μl のコーティング緩衝液でコーティングし、4で一晩インキュベートした。プレートを、室温で1時間、200 μl の遮断緩衝液で遮断した。希釈緩衝液中のヒト血清(1:100)を、丸底プレートにおいて上清(1:50)を用いて希釈し、ウェルあたり50 μl を丸底高結合プレートに加えた。プレートを37で1時間インキュベートした後、洗浄緩衝液で3回洗浄した。抗C5b-9neo(クローンaE11、DAKO、カタログ番号M0777)を希釈緩衝液中1:100で希釈し、ウェルあたり50 μl を加え、プレートを室温で1時間インキュベートした後、洗浄緩衝液で3回洗浄した。抗マウスHRP(DAKO、カタログ番号P0447)を希釈緩衝液中1:2000で希釈し、ウェルあたり50 μl を加え、プレートを室温で30分間インキュベートした後、洗浄緩衝液で3回洗浄した。現像のため、50 μl のTMB色素源(TMB:Sigma T2885、DMSO中10mg/mlのTMBの調製済み原液)および10 μl の3% H_2O_2 を、5mlのNaAc緩衝液(1リットルの H_2O 中、8.2gmの酢酸ナトリウム、21gmのクエン酸一水和物)に加え、96ウェルプレートに分配した。反応を25 μl の1M H_2SO_4 によって停止させ、ODを450nm/655nmにて分光光度計を用いて測定した。

30

40

【0246】

このアッセイの例となる結果を図1Bに示し、これは、#11および#17という2個の上清が他の36個の上清よりも顕著に良好な阻害能力を有し、上清#11は、分析したクローン全ての中で最も優れた阻害能力を有したことを示す。

【0247】

50

上清 # 1 1 が溶血アッセイと M A C E L I S A アッセイとの両方において最も強力な阻害を呈したため、このハイブリドーマを更なる特性評価のために選択した。このハイブリドーマによって産生されたモノクローナル抗体は、本明細書では 7 E 5 と称する。

【 0 2 4 8 】

実施例 2：7 E 5 モノクローナル抗体の特性評価

この実施例では、ラット抗ヒト C 6 モノクローナル抗体 7 E 5 の結合および機能的特性評価を更に検査するために追加の実験を行った。

【 0 2 4 9 】

交差活性：ウェスタンブロットを、ヒト血清およびカニクイザル (C y n o) からの血清を使用して行った。ヒトおよび C y n o 血清を P A G E (1 0 % ゲル) および標準的なウェスタンブロットに使用した。抗体を 1 : 5 0 0 の希釈で、1 時間ブロット上でインキュベートした。L A S 3 0 0 0 (F u j i) 暗箱撮像システムにおいて、抗ラット西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) (D A K O 、 1 : 1 0 0 0) および L u m i l i g h t (R o c h e) を使用して検出を行った。結果は、7 E 5 がヒト C 6 とカニクイザル C 6 との両方を認識することができることを示した。

【 0 2 5 0 】

結合動態：C 6 への 7 E 5 結合の動態を調査するために、研究用グレードの C M 5 センサチップを装備した B I A C O R E 2 0 0 0 (G E H e a l t h c a r e) における表面プラズモン共鳴測定を使用した。リガンド (C 6 、 1 1 3 k D a) を、アミン結合化学を使用して固定化した。フローセル 2 の表面を、5 μ l / 分の流量で 0 . 1 M の N H S (N - ヒドロキシスクシンイミド) と 0 . 4 M の E D C (3 - (N , N - ジメチルアミノ) プロピル - N - エチルカルボジイミド) との 1 : 1 の混合物を用いて 7 分間活性化した。p H 5 . 0 の 1 0 m M の酢酸ナトリウム中 1 0 μ g / m l の濃度のリガンドを、9 5 5 R U の密度で固定化した。p H 8 . 0 の 1 M のエタノールアミンの 7 分の注射によって表面を遮断した。

【 0 2 5 1 】

フローセル 1 を、先の実験からの抗体を用いて固定化し (v W W F 、 9 8 7 R U) 、参照表面とした。

【 0 2 5 2 】

動態的結合データを収集するために、p H 7 . 4 の 1 0 m M の H E P E S 、 1 5 0 m M の N a C l 、 0 . 0 0 5 % の P 2 0 中の分析物 (抗 C 6 - 抗体、1 5 0 k D a) を、3 0 μ l / 分の流量および 2 5 の温度で 2 つのフローセルにかけて注射した。注射した濃度は抗体によって異なる。データを 1 H z の速度で収集した。複合体を 9 0 秒および 3 0 0 秒間それぞれ会合および解離させた。表面を、0 . 1 M の H C l の 1 0 秒の注射によって再生した。各試料および緩衝液ブランクの二重注射 (順序は無作為) を 2 つの表面上に流した。

【 0 2 5 3 】

データを、B i a E v a l u a t i o n 4 . 1 ソフトウェア中で利用可能なグローバルデータ分析オプションを使用して単純な 1 : 1 のインタラクションモデルに適合させた。B i a c o r e 動態の結果を図 2 に示す。代表的な実験からの結果を以下の表 1 ~ 4 で要約する。

【表 1】

表1:表面プラズモン共鳴によって決定した7E5結合の動態

ka	$1.69 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
kd	$4.27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
K_D	$2.53 \times 10^{-10} \text{ M}$
Rmax	36 RU
Rmax	95%

10

【表 2】

表2:7E5結合についての複合体半減期

kd(s ⁻¹)	t _{1/2} (秒)	t _{1/2} (分)	t _{1/2} (時)
$4.27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	162330	2705.5	45.1

20

【表 3】

表3:7E5結合についての5%の解離までの時間

kd(s ⁻¹)	時間(分)	時間(時)	R(RU)
$4.27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	200.2	3.3	34

【表 4】

表4:7E5結合についての95%の解離までの時間

kd(s ⁻¹)	時間(分)	時間(時)	R(RU)
$4.27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	11692.9	194.9	2

30

【0254】

7E5の K_D は、 $2.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ として計算する。高い親和性は、高い抗体 - 抗原複合体半減期（45時間）によって主に引き起こされる。このため、7E5結合は極めて安定であり、7E5 - C6複合体の半減期は40時間超であると予測される。

【0255】

抗原 - 抗体複合体がFcガンマ受容体による結合および細胞取り込み後にエンドソームおよびリソソーム中で放出され得るかどうかを決定するために、7E5 - C6複合体の感受性を低いpHで試験した。リソソームではpHは約4.8であるため、複合体安定性は最大pH = 4で試験した。このBIACORE実験では、チップ上の7E5 - C6複合体を漸減するpHの緩衝液で洗浄した。Hepes緩衝生理食塩水(HBS)をpH7.4、7.0、および6.5に使用した。10mMの酢酸ナトリウムをpH6.0、5.5、5.0、4.5、および4.0に使用した。複合体の安定性は低いpHには感受性でないことが観察された。

40

【0256】

事前インキュベーションが溶血アッセイに与える影響：BIACORE実験によって、7E5のC6からの緩慢な放出が7E5の K_D の主な決定因子であることが明らかになったため、赤血球を加える前の7E5の補体原（ヒト血清）との事前インキュベーションに

50

より、溶血アッセイにおける阻害効果が増加したかどうかを調査した。7 E 5 を、室温 (2 0) にて 3 0、9 0、または 1 8 0 分間、ヒト血清と共にインキュベートした後、赤血球を添加し、反応を 3 7 で開始した。結果は、事前インキュベーション時間を最大 3 時間に増加させることが溶血の阻害の更なる強化に繋がらなかったことを示した。このことは、この反応における 7 E 5 による C 6 結合の動態が、C 6 が効果的に複合体化され数分以内に完全に中和されるものであることを意味する。

【 0 2 5 7 】

実施例 3 : 7 E 5 モノクローナル抗体のエピトープマッピング

ペプチドアレイを使用して、ヒト C 6 における 7 E 5 のエピトープを決定した。C 6 タンパク質配列からの連続し重複した 1 6 m e r のペプチド (1 6 個のアミノ酸長であり、1 4 個のアミノ酸が重複しているペプチド) を合成し、膜上のグリッドパターン中に並べた。次に、膜を 7 E 5 抗体と共にインキュベートして、どのペプチドが抗体によって認識されたかを検出した。7 E 5 によって認識された主なペプチド配列は G S C Q D G R Q L E W G L E R T (ペプチド 4 1 8) (配列番号 1) であった。

【 0 2 5 8 】

続いて、選択したペプチドに対するアラニンスキャン (アラニンを使用して 1 つ 1 つアミノ酸を代置するもの) を行って、エピトープの正確な特定を助けた。この研究では、ペプチド 4 1 8 の修飾に加えて、4 個のアミノ酸が 4 1 8 に対してシフトしたペプチドであるペプチド 4 2 0 (D G R Q L E W G L E R T R L S S) (配列番号 2)、およびそのアラニン修飾のうちのいくつかは 7 E 5 の結合を示した。このため、7 E 5 の主要エピトープの一部を形成するアミノ酸が、ペプチド 4 1 8 と 4 2 0 とを組み合わせたこのペプチド配列 G S C Q D G R Q L E W G L E R T R L S S (配列番号 3) 内にあることが予測されると結論付けた。

【 0 2 5 9 】

図 4 A は、ヒト (配列番号 5 0) およびラット C 6 (配列番号 5 1) におけるペプチド 4 1 8 および周辺エリアの配列を示す。図 4 B で概略的に例解するように、ペプチド 4 1 8 は、C 6 の第 1 の F I M ドメインの端部に部分的に位置する。

【 0 2 6 0 】

他の抗体が 7 E 5 抗体と同じエピトープに結合するかどうかを決定するために、B i a c o r e 交差遮断実験を実施し、ここでは、C 6 抗原をチップに結合させた後、単一の抗 C 6 抗体のみ (対照として) か、または第 1 の抗 C 6 抗体 (抗体 1)、続いて第 2 の抗 C 6 抗体 (抗体 2) かのいずれかであった分析物 (複数化) を流して、交差遮断を決定した。マウス m A b 2 7 B 1 がラット m A b 7 E 5 と同じエピトープに結合するかどうかを決定するための交差遮断実験の結果を図 3 A ~ D に示し、図 3 A は、抗体 1 としての 2 7 B 1 および抗体 2 としての 7 E 5 の結果を示し、図 3 B は、抗体 1 としての 7 E 5 および抗体 2 としての 2 7 B 1 の結果を示し、図 3 C は、2 7 B 1 のみの結果を示し、図 3 D は、7 E 5 のみの結果を示す。

【 0 2 6 1 】

実施例 4 : 7 E 5 モノクローナル抗体のインビボの効能

7 E 5 が生きている動物において C 6 を遮断することができるかどうかを試験するために、ヒト C 6 を補充した C 6 欠乏 P G R ラットを使用した。この手法を使用した理由は、7 E 5 がヒト C 6 に特異的であり、ラット C 6 を阻害することができないためであった。C 6 欠乏マウスでは、ヒト C 6 を注射することで完全な補体系機能および M A C 活性を回復することができ、7 E 5 の効果をラット C 6 によって引き起こされる交絡効果なく測定することができる。

【 0 2 6 2 】

まず、この手法を、ヒト C 6 を注射した 2 匹のラットにおける溶結活性を決定することによって試験した。C 6 の注射後にいくつかの血液試料を採取することにより、ラットにおけるヒト C 6 は約 4 8 時間であると予測した。2 匹の C 6 欠乏ラットに 4 m g / k g のヒト C 6 を I V 注射した。血液試料を C 6 の注射後 1 0 分、2 4 時間、および 4 8 時間で

採取した。全血液試料の凝固後、凝固物を遠沈させること（E p p e n d o r f 卓上遠心分離中で室温にて10分間13,000rpm）によって血清を単離した。血清を実施例1に記載の溶結アッセイで使用してMAC活性を決定した。野生型PVGラットおよび処置していないC6欠乏ラットからの血清を、最大および最小溶結活性についての参照として使用した。溶血アッセイを使用して、ラットにおけるヒトC6の半減期は約48時間であると予測した。

【0263】

パイロット実験では、1匹の雌のC6欠乏PVGラット（体重220グラム）に12mgの高用量の7E5を腹腔内注射し、2mgのヒトC6を補充した（静脈内注射）。ヒトC6を、C6抗体でコーティングしたカラムによる親和性精製を使用してヒト血清から単離した。C6を、7E5ボラス注射の24時間前に1mg、5分後に1mg投薬した。対照ラット（7E5で処理したラットと同じ体重）はC6注射のみを受けた。溶血アッセイ用の血液を7E5の注射から60分後に採取した。結果を図5に示す。結果は、溶血活性が7E5投薬から60分後に7E5によって遮断されたことを示したため、7E5がインビボでMAC形成を遮断し得ることを証明した。

【0264】

後続の実験では、2匹の雌のC6欠乏ラット（PVG種）に1mgのC6を注射した。血液試料をC6注射前およびC6注射後（IV、1mg）に採取して、正常な溶血活性および補充溶血活性を規定した。C6注射から10分後、7E5を8mgのIPまたは2mgのIVいずれかで投薬した。7E5投薬から60分後、血液試料を採取して、7E5が溶血活性に与える影響を評価した。両方の投薬戦略が血中のMAC活性を遮断した。次に、別の1mgのC6を同じラットにIV注射した。新たなC6補充から15分後の血液サンプリングは、溶血活性の小幅の増加しか示さず、これは、溶血活性が自由に循環する7E5によって両方のラットにおいて依然として阻害されたことを示す。

【0265】

これらの上記の実験は、7E5が生きている動物においてC6を遮断できることを示す。

【0266】

実施例5：7E5モノクローナル抗体の配列決定および組み換え発現

7E5 mAbの重鎖および軽鎖可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、標準的な手段によって決定した。

【0267】

VH領域のヌクレオチド配列は以下の通りである。

【化2】

gaggtgcagctggtggagtctgatggaggcttagtgcagcctggaggggtccctgaaactctcctgtgtagcctcaggattctcttcagtg
actattacatggcctgggtccgccagggtccaacgaaggggtggagtgggtcgcaaccattaattatgatggttagtagtactactatc
gagagtccgtgaagggccgattcactatctccagagataatgcgaaacgcaccctatacctgcaaatggacagtctgaggtctgagg
acacggccactattactgttcaagacctctacggaggccctgttgcttactggggccacggcactctggtcactgtctcctca（配列
番号4）

【0268】

VH領域のアミノ酸配列は以下の通りである。

【化3】

EVQLVESDGGGLVQPGGSLKLSCVASGFSFSDDYYMAWVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTYYRE
SVKGRFTISRDNARTLYLQMDSLRSEDATYYCSRPEALFAYWGHGTLTVSS（配列番号5）

【0269】

VH CDR1、CDR、およびCDR3のアミノ酸配列は、以下の通りである。

CDR1：DYYMA（配列番号6）

CDR2 : T I N Y D G S S T Y Y R E S V K G (配列番号 7)

CDR3 : P S T E A L F A Y (配列番号 8)

【 0 2 7 0 】

V L 領域のヌクレオチド配列は以下の通りである。

【 化 4 】

gatgttgctgacccagactccatccacattatcggtaccattggacaatcggtctccatctcttcgaggtaagtcagagtcctttaaat
gatgttgaaacacctatttatattggtatctacagaggcctggccaatctccacagcttataatttatttggtctccgacctgggatctgggg
tcccaacaggttcagtggtcagtggtcaggaacagattcacactcaaaatcagtggtgagtgaggctgaggattgggaatttattact
catgcaagctagtcagtcctcgacacgttggtgagctgggaccaacctggaactgaaa (配列番号 9)

10

【 0 2 7 1 】

V L 領域のアミノ酸配列は以下の通りである。

【 化 5 】

DVVLTPQTPSTLSATIGQSVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQRPQGSPQLLIYLVSDLGSGVNP
RFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGIYYCMQASHAPYTFGAGTNLELK (配列番号 10)

【 0 2 7 2 】

V L CDR1、CDR、およびCDR3のアミノ酸配列は、以下の通りである。

CDR1 : R S S Q S L L N D V G N T Y L Y (配列番号 1 1)

20

CDR2 : L V S D L G S (配列番号 1 2)

CDR3 : M Q A S H A P Y T (配列番号 1 3)

【 0 2 7 3 】

クローニングのための適切な制限部位の導入および産生細胞株 (H e k - 2 9 3 細胞)
における発現のためのコード化配列の最適化の後、発現カセットを調製した。7 E 5 の合
成重鎖および軽鎖可変ドメインを p M Q R 真核細胞発現ベクターセット (p M Q R - h I
g G 1 および p M Q R - h I g K) をクローニングしたことで、ヒト - ラットキメラ組み
換え抗体を生成した。結果として得られたクローンの配列分析により、両方の配列が適正
にクローニングされたことが示された。両方の7 E 5 可変ドメイン宿す p M Q R 真核細胞
発現ベクターを H e k - 2 9 3 細胞へと形質転換し、これらの細胞に組み立て抗体を産生
させた。産生後、捕捉 E L I S A を使用することで h I g G 1 / h I g K 抗体が廃上清中
で検出された。トランスフェクション上清は、0 . 0 1 9 m g / m l で組み換え7 E 5 を
含有することが示された。

30

【 0 2 7 4 】

実施例 6 : 7 E 5 モノクローナル抗体のヒト化

部位指向性突然変異の周期に基づく抗体ヒト化方法の代わりとして、ラット7 E 5 m
A b を、H w a n g および同僚 (M e t h o d s . 2 0 0 5 . 3 6 : 3 5 - 4 2) に
よって説明されているように、ヒト抗体およびマウス抗体間のCDR相同性に基づくヒト
化手法を使用してヒト化した。この方法は、非ヒトおよびヒト抗体が類似して構築された
CDRを有する場合、ヒトフレームワークは親和性を良好に保持しながら非ヒトCDRも
支持することになるという原理に基づく。この方法において、ヒトフレームワーク配列は
、ヒト化される抗体のCDRに対するヒトCDRの構造的類似性 (同 C h o t h i a 正
準構造) に基づいて、ヒト生殖細胞系列遺伝子のセットから選択される。偏位したF R 残
基を含むF a b 変異型配列のファージディスプレイライブラリを生成する。親和性主導に
よる選択の後、個々のクローンを結合および解離速度についてスクリーニングし、配列ヒ
ト同一性および相同性を決定する。

40

【 0 2 7 5 】

この作業に適用されるヒト化7 E 5 ラット抗体に対するプロセスは、以下のステップで
構成される。

1 - ヒト化ライブラリの設計 : 最も近いヒト生殖細胞系列の特定、およびこれらのヒト生

50

殖細胞系列に由来するラットVHおよびVK FR残基の特定。

2 - 7E5遺伝子ライブラリの組み立て(重複オリゴヌクレオチドを使用して、可変重(VH)および可変軽(VL)鎖コード化遺伝子をPCRを介して合成によって生成する)。

。

3 - ヒト定常重(CH1)および定常軽(C)鎖を含有するファージミド(pCB13-CK1/3)へのこれらの遺伝子ライブラリのクローニング(ライブラリ構築)。

4 - ファージディスプレイおよび親和性選択を使用する機能的Fabの選択。

5 - 解離速度(Biacore)のスクリーニングおよび配列決定。

6 - hC6への結合を喪失せずに最も高いヒト同一性および相同性を持つFabの選択。

7 - 更なる親和性測定および機能アッセイにおいて使用するための8個のヒト化リーダーの生産および精製。

10

【0276】

ヒト化ライブラリ設計: ラット7E5抗体の可変ドメインのヌクレオチドおよびアミノ酸配列、ならびに公的なデータベースおよびツールを使用して、7E5が、IGHV5S45*01、IGHD1-6*01、IGHJ3*01、およびIGKV2S27*01、IGKJ2-3*01を生殖細胞系列セグメントとして使用することを確認した。また、7E5のCDRH1およびCDRH2についての正準の折り畳みの組み合わせは1-3であり、7E5のCDRL1およびCDRL2については4-1であると結論付けた。

【0277】

20

7E5 VH配列と、CDR1およびCDR2についての同一の正準の折り畳みの組み合わせ1-3を持つヒト生殖細胞系列との比較により、ヒト生殖細胞系列VH3ファミリーメンバー1が最も近いマッチであることが明らかになった。最も近いヒトJH生殖細胞系列はIGHJ4である。これらの生殖細胞系列セグメントに対する整列を図6Aに示す。7E5重鎖アミノ酸配列も配列番号5に示す。ヒト生殖細胞系列VH3__1アミノ酸配列も配列番号48に示す。FRおよびCDRを示し、これにより、ヒト生殖細胞系列から逸脱したFR残基の特定を可能となる。

【0278】

同様の分析を使用して、7E5 V配列について、最も近いヒト生殖細胞系列がヒトVK2ファミリーメンバー5であることを決定した。最も近いヒトJH生殖細胞系列はIGKJ2およびIGKJ5である。これらの生殖細胞系列セグメントに対する整列を図6Bに示す。7E5軽鎖アミノ酸配列も配列番号10に示す。ヒト生殖細胞系列VK2__5アミノ酸配列も配列番号49に示す。FRおよびCDRを示し、これにより、ヒト生殖細胞系列から逸脱したFR残基の特定を可能となる。

30

【0279】

図6Aおよび6Bに示すように、7E5 VH配列について13個の位置、7E5 Vについては16個の位置がそれぞれ存在し、これについて、ヒト残基、また変化が抗原結合に有害である場合に備えてラット残基もヒト化ライブラリに組み込んだ。突然変異のための位置の数および位置あたりの変異型の数を考慮に入れると、導入した多様性を網羅するためのライブラリサイズは、ヒト化VHおよびVライブラリについてそれぞれ8.2 × 10³および9.8 × 10⁴である。

40

【0280】

ヒト化7E5 Fabライブラリ構築: 最終ヒト化7E5 Fabファージディスプレイライブラリの構築のため、最初に2つの異なるサブライブラリを構築した。

1 - ヒト化7E5 VH遺伝子をWT 7E5Vと共にクローニングして、ヒト定常ドメインCH1およびCをコードする遺伝子を含有するpCB13-CK3にした、VHヒト化Fabサブライブラリ。

2 - ヒト化7E5 V遺伝子をWT 7E5VHと共にクローニングして、ヒト定常ドメインCH1およびCをコードする遺伝子を含有するファージミドベクターspCB13-CK1およびpCB13-CK3にした、VLヒト化Fabサブライブラリ。

50

【0281】

使用した2つの異なるファージミドのクローニング戦略および配列に起因して、pCB13-CK1から生産したクローンの軽鎖Vドメインの104位～107位にある残基は、LEIK（ヒト化7E5配列）に対応し、一方でpCB13-CK3において生産したクローンのVドメイン軽鎖は、同じ位置のアミノ酸LELK（7E5 WT V 配列）において現れる。

【0282】

2つの結果として得られるサブライブラリをヒトC6に対して掬い取り、結合クローンを回収して重鎖および軽鎖の両方をヒト化した最終Fabライブラリ構築に進んだ。

【0283】

合成遺伝子組み立て：異なるヒト化重鎖および軽鎖サブライブラリを構築するために、ヒト化7E5 VHおよびV 遺伝子を遺伝子組み立てによって生成した（Cherry, J. et al. (2008) J Biochem Biophys Methods, 70:820-2, Stemmer, W. P. et al. (1995) Gene, 164:49-53）。

【0284】

ヒト化7E5 VHおよびV サブライブラリ構築：7E5 VH Fabサブライブラリの構築のため、遺伝子組み立てによって生成した約400bpの合成VH遺伝子、および7E5 V WTを体系化するDNA断片を（ヒト定常重鎖およびカッパ軽鎖をコードする遺伝子を含む）ファージミドpCB13-CK3にクローニングした。

【0285】

7E5 V Fabサブライブラリの構築のため、遺伝子組み立てによって生成した約400bpの合成V 遺伝子、および7E5 VH WTを体系化するDNA断片を、それぞれApaLI / XhoI部位およびNcoI / NheIによって、（ヒト定常重鎖およびカッパ軽鎖をコードする遺伝子を含む）ファージミドpCB13-CK1およびpCB13-CK3の等モル混合物にクローニングした。

【0286】

クローニングプロセスから生じた新たなベクターをエレクトロポレーションによって大腸菌TG1細胞に形質転換した。ライブラリのサイズを、LBACalベニシリン（100 μg/ml）、グルコース2%上のTG1形質転換細胞の5 μlのスポットから計算し、FabインサートのパーセンテージをコロニーPCRによって決定した。サブライブラリのサイズおよびインサートパーセンテージを表5で以下に要約する。

【表5】

表5:ヒト化7E5サブライブラリについて得られたサイズおよびインサートパーセンテージ

サブライブラリ	ライブラリ サイズ	インサート%	最終 ライブラリ サイズ	最大理論 多様性	多様性範囲 (理論多様性 超過)
ヒト化7E5 VH	2.4×10^8	95%	2.3×10^8	8.2×10^3	約28,000倍
ヒト化7E5 V _K	1.7×10^8	91%	1.5×10^8	9.8×10^4	約1,500倍

【0287】

サブライブラリもライブラリあたり48個のクローンのDNA配列分析によってQCした。アミノ酸配列を、CLC Main Workbench Softwareを使用して抽出した。有効なVHおよびV 配列ならびに位置あたりのWTまたは突然変異残基の頻度の分析により、約50/50（V 遺伝子における103位については33/33/33）のWT/突然変異の割合でのサブライブラリの設計および構築に成功し、FR突然変異の平均数が設計通りに得られたことが明らかになった。

【0288】

ヒト化7E5 VHおよびV サブライブラリのパニング選択：ファージを2つのサ

ライブラリから調製し、コーティングしたヒトC6に対する1周目の選択に使用した。この周の選択の目的は、サブライブラリを非結合Fabから一掃し、それによりストリンジェント条件が適用されないようにすることであった。

【0289】

パニング選択のため、5および0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトC6を、低脂肪粉乳(PBS中4% Marvell)によって96ウェルMaxisorpプレート(Nunc)中でコーティングし、遮断した。サブライブラリファージとの2時間のインキュベーションおよび続く洗浄後、トリプシン溶出(10 mg/ml)を室温で行った。16 mMのプロテアーゼ阻害剤ABSFを適用することによってプロテアーゼ活性を即座に中和した。

【0290】

全てのファージ生産物を対数的に成長させた大腸菌TG1細胞に感染させ、5 μl の感染細菌を生産物の分析および濃縮決定のために寒天プレート(LBAGluC2% Carb 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)上にプレーティングした。濃縮は、ヒトC6から溶出したファージの数対無タンパク質条件から溶出したものの割合として計算した。ヒト化7E5 V と VH Fabサブライブラリとの両方について、バックグラウンド(PBS)と比較して極めて良好な濃縮が観察された。

【0291】

最終ヒト化7E5 Fabファージディスプレイライブラリの構築：7E5 VH Fabサブライブラリから選択したクローンから回収したヒト化重鎖(VHCH)を7E5 V Fabサブライブラリから選択した回収したヒト化軽鎖(V C)と組み合わせることによって、最終ヒト化7E5 Fabライブラリを構築した。結果として得られるライブラリのサイズを、LBACalpenicillin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、グルコース2%上のTG1形質転換細胞の5 μl のスポットから計算し、FabインサートのパーセンテージをコロニーPCRによって決定した。

【0292】

ヒト化7E5 Fabライブラリの選択：ラットWT 7E5 抗体と比較して親和性が失われていないか、または更には親和性が改善したヒト化変異型を選択するために、ヒト化7E5 Fabライブラリを用いた溶液内ファージディスプレイ選択を、ピオチン化hC6抗原を使用して行った。ヒトC6をピオチン化し、抗ヒトC6抗体7E5を使用してSDS-PAGE、ウェスタンブロット、およびELISAによってQCし、ニュートラアビジンでコーティングしたプレート上に捕捉したピオチン化C6を検出した。親和性主導型選択を、3周連続して、抗原濃度を周から周にかけて減少させて行い、同様にファージ投入も1周目から2週目にかけて減少させた。選択の2週目および3週目において、ニュートラアビジンで捕捉したヒトC6とインキュベートしたファージも、2時間または一晩過剰な非ピオチン化C6の存在下でインキュベートして(解離速度選択)、何度かの洗浄後に高解離速度で結合するクローンを取り除いた。対照として、同時に同様の選択を行い、ここでは、ファージを、非ピオチン化hC6の代わりにニュートラアビジンで捕捉したヒトC6およびPBSとインキュベートした(解離速度選択なし)。

【0293】

全てのファージ生産物を対数的に成長させた大腸菌TG1細胞に感染させ、5 μl の感染細菌を生産物の分析および濃縮決定のために寒天プレート(LBAGluC2% Carb 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)上にプレーティングした。濃縮は、ヒトC6から溶出したファージの数対無タンパク質条件から溶出したものの割合として計算した。背景(PBS)と比較して極めて良好な濃縮が得られた。

【0294】

ヒト化7E5 Fabライブラリから選択したクローンの結合スクリーニング：2週目および3週目の解離速度選択後に得られた溶出ファージプールに感染させた大腸菌TG1の個々のコロニーを、-80 の20%のグリセロール中で保管した100 μl の2TYGluCose 2%カルペニシリン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する 2つの96ウェルプレート(マスタープレート)中で8時間37 にて成長させ、後の配列決定およびペリブラ

10

20

30

40

50

スム抽出物生産に使用した。全部で2つのマスタープレート(MP)を、2周目の選択および3周目の選択からのクローンを用いて生成した。これらのMPから、可溶性モノクローナルFabを含有する細菌抽出物(ペリプラスム抽出物)を生産した。モノクローナル細菌の小規模培養を、イソプロピル-b-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を1mMの最終濃度まで添加することによって0.8のOD₆₀₀にて誘導した。その後、Fabを含有するペリプラスム抽出物(P.E.)を、PBS中での細菌ペレットの凍結融解、および細胞残屑を除去するための続く遠心分離によって調製した。

【0295】

選択したクローンの標的結合能を決定するために、1:5希釈のP.E.を、ニュートラアビジンでコーティングしたMaxisorpプレート上に捕捉した10nMのビオチン化hC6への結合について試験した。ラット7E5 WT Fabから調製したP.E.を陽性対照として使用した。ブランクのP.E.(MP中の植菌していないウェルから調製)を陰性対照として使用した。P.E.の標的への結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)に複合体化した抗c-mycマウス抗体によって検出した。両方のMPについて40%の結合ヒット率を得、陽性クローンの結合シグナル(OD_{450nm}値)は、親ラット7E5 Fabで得られたシグナルに相当した。

【0296】

ヒトC6に結合する選択されたクローンの解離速度スクリーニングならびにヒト同一性および相同性の分析: 陽性結合クローンについて、hC6の解離速度を、SPR法を使用して決定し、同時に重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードするDNAの配列決定を行った。

【0297】

解離速度を決定するために、Biacore 3000(GE Healthcare)を使用した。この目的のため、pH4.5のアセート緩衝液中50μg/mlのhC6を、約2000RUにCM5センサチップ上で固定した(GE Healthcare BR-1000-12)。再生条件を試験し、2×10μlの10mMのNaOHおよび1MのNaClを試料注射間の再生に使用した。上記のように調製した30μlのP.E.を120μlのHBS-E緩衝液中で希釈し、この60μlから30μl/分の流入で注射した。解離を400秒間測定し、解離速度を、1:1のラングミュア解離適合モデルを適用することによって決定した。

【0298】

同時に、ヒト同一性および相同性を分析するために、hC6への特異的結合を示したクローンの可変重鎖および軽鎖をコードするDNAの配列決定を行った。アミノ酸配列を、CLC Main Workbench Softwareを使用して抽出した。VおよびVH配列を参照配列(7E5 WT)に対して個々に整列させた。全ての配列を分析し、Abliignerソフトウェアを使用して、ヒト同一性(最も近く一致する生殖細胞系列に見出されるフレームワーク領域の部分)およびヒト相同性(最も近く一致する生殖細胞系列または同じサブクラスの他の生殖細胞系列に見出されるフレームワーク残基の部分)のパーセンテージを決定した。

【0299】

ELISAおよびBiacoreデータ間の全体的に良好な相関、ならびに88~99%で変動する良好なヒト同一性および相同性パーセント値が観察された。

【0300】

良好な結合、解離速度、ならびにヒト同一性および相同性データを有した8個のクローンのリーダーパネルを選択し、これらを8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、および7F02と称する。8個のヒト化クローンのリーダーパネルの重鎖および軽鎖の可変ドメインの完全なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下に示す。

8G09 VHおよびVLヌクレオチド配列:

8G09 VH

10

20

30

40

50

【化 6】

GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCC
 TCAGGATTCACTTTCACTGACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
 GCAACCATTAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAG
 ATAATGCGAAACGCACCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGC
 AAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (配列番号14)

8 G 0 9 V

10

【化 7】

GATATTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTGCAGGTC
 AAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGAAACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCAC
 AGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTCACTGGCAGTGGGTGAGGAAC
 AGATTTCACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCAT
 GCTCCGTACACGTTTGGAGCGGGGACCAGACTCGAGATCAAA (配列番号15)

20

7 E 1 2 V H および V L ヌクレオチド配列 :

7 E 1 2 V H

【化 8】

GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
 TCAGGATTCACTTTCACTGACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
 GCAACCATTAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAG
 ATAATGCGAAAAACACCCTATACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGC
 AAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (配列番号16)

30

7 E 1 2 V

【化 9】

GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGCCTCCATCTCTTGCAGGTC
 AAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGAAACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCAC
 AGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTCACTGGCAGTGGGTGAGGAAC
 AGATTTCACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAATTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCAT
 GCTCCGTACACGTTTGGACAGGGGACCAACCTCGAGATCAAA (配列番号17)

40

7 G 0 9 V H および V L ヌクレオチド配列 :

7 G 0 9 V H

【化 1 0】

GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
 TCAGGATTCACTTTCACTGACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAACGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
 GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAG
 ATAATGCGAAAAACACCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGC
 AAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (配列番号18)

7 G 0 9 V

10

【化 1 1】

GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATCGTCATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGCCTCCATCTCTTGCAGGTC
 AAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGAAACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCAC
 AGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCAGGAAC
 AGATTTCACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCAT
 GCTCCGTACACGTTTGGACAGGGGACCAAACTCGAGCTGAAA (配列番号19)

8 F 0 7 V H および V L ヌクレオチド配列 :

20

8 F 0 7 V H

【化 1 2】

GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
 TCAGGATTCTCTTTCACTGACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
 GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAG
 ATAATGCGAAAAACACCCTATACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGC
 AAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (配列番号20)

30

8 F 0 7 V

【化 1 3】

GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTGCAGGTC
 AAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGAAACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCAC
 AGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCAGGAAC
 AGATTTCACTCAAAATCAGTGGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCAT
 GCTCCGTACACGTTTGGAGCGGGGACCAAACTCGAGATCAAA (配列番号21)

40

7 F 0 6 V H および V L ヌクレオチド配列 :

7 F 0 6 V H

【化 1 4】

GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
 TCAGGATTCACTTTCAAGGACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
 GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAG
 ATAATGCGAAAAACAGCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTG
 CAAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (配列番号22)

50

7 F 0 6 V

【化 1 5】

GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGTCTCCATCTCTTGCAAGGTC
AAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGAAACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCAC
AGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTGAGGAAC
AGATTTCACTCAAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCAT
GCTCCGTACACGTTTGGAGCGGGGACCAGACTCGAGCTGAAA (配列番号23)

10

7 F 1 1 V HおよびV Lヌクレオチド配列：

7 F 1 1 V H

【化 1 6】

GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
TCAGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAACGAAGGGGCTGGAGTGGGT
GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAG
ATAATGCGAAAAACACCCTATACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTTC
AAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (配列番号24)

20

7 F 1 1 V

【化 1 7】

GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGTCTCCATCTCTTGCAAGGTC
AAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGAAACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCAC
AGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTGAGGAAC
AGATTTCACTCAAAAATCAGTGGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCAT
GCTCCGTACACGTTTGGAGCGGGGACCAGACTCGAGATCAAA (配列番号25)

30

7 E 1 1 V HおよびV Lヌクレオチド配列：

7 E 1 1 V H

【化 1 8】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCC
TCAGGATTCACTTTCAGTGACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT
GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAG
ATAATGCGAAAAACACCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGC
AAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (配列番号26)

40

7 E 1 1 V

【化 1 9】

GATATTGTGCTGACCCAGACTCCATTGTATTATCGGCTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTGCAAGTC
AAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGAAACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAGGCCTGGCCAATCTCCAC
AGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTGAGGAAC
AGATTTCACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCAT
GCTCCGTACACGTTTGGAGCGGGGACCAACCTCGAGATCAAA (配列番号27)

7 F 0 2 V H および V L ヌクレオチド配列 :

7 F 0 2 V H

【化 2 0】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCC
TCAGGATTCACTTTCAAGTACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAACCATTAAATATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAG
ATAATGCGAAAAACAGCCTATACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGC
AAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (配列番号28)

7 F 0 2 V

【化 2 1】

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGCTACCCCTGGACAATCGGCCTCCATCTCTTGCAAGTC
AAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGAAACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCAC
AGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTGAGGAAC
AGATTTCACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAATTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCAT
GCTCCGTACACGTTTGGAGCGGGGACCAAGCTCGAGCTGAAA (配列番号29)

8 G 0 9 V H および V L アミノ酸配列 :

8 G 0 9 V H

【化 2 2】

EVQLVESDGGVLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMAWVRQAPGKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDN
KRTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTEALFAYWGQGTLVTVSS (配列番号30)

8 G 0 9 V

【化 2 3】

DIVLTQTPLTSLVTPGQSVSISCRSSQSLNDVGNTLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPSNRFGSGSGTDFTL
KISRVEADVGVYYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK (配列番号31)

7 E 1 2 V H および V L アミノ酸配列 :

7 E 1 2 V H

【化 2 4】

EVQLVESDGGVLVQPGGSLKLSAASGFTFSDYYMAWVRQGPGLGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARPSTEALFAYWGHGTLVTVSS (配列番号32)

10

20

30

40

50

7 E 1 2 V
【化 2 5】

DVVLTTQTPLTSLVTPGQPASISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGIYYCMQASHAPYTFGQGTNLEIK (配列番号33)

7 G 0 9 V H および V L アミノ酸配列 :

7 G 0 9 V H
【化 2 6】

EVQLVESDGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMAWVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDN
KNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTEALFAYWGHGTLTVSS (配列番号34)

10

7 G 0 9 V
【化 2 7】

DIVLTQTPLTSLVTPGQSVSISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVIYYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK (配列番号35)

8 F 0 7 V H および V L アミノ酸配列 :

8 F 0 7 V H
【化 2 8】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDYMAWVRQGPQKLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRSEDTATYYCARPSTEALFAYWGHGTLTVSS (配列番号36)

20

8 F 0 7 V
【化 2 9】

DVVLTTQTPLTSLVTPGQSVSISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPDRFGSGSGTDFTL
KISGVEAEDVGVIYYCMQASHAPYTFGAGTKLEIK (配列番号37)

30

7 F 0 6 V H および V L アミノ酸配列 :

7 F 0 6 V H
【化 3 0】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYYMAWVRQGPQKLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDN
KNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTEALFAYWGHGTLTVSS (配列番号38)

7 F 0 6 V
【化 3 1】

DVVLTTQTPLTSLVTPGQPVISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVIYYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK (配列番号39)

40

7 F 1 1 V H および V L アミノ酸配列 :

7 F 1 1 V H

【化 3 2】

EVQLVESDGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYYMAWVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRPEALFAYWGHGTLTVSS (配列番号40)

7 F 1 1 V

【化 3 3】

DVVLVTQTPSTLSVTPGQPVISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFSGSGSGTDFTL
KISGVEAEDVGVYYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK (配列番号41)

10

7 E 1 1 V H および V L アミノ酸配列：

7 E 1 1 V H

【化 3 4】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSYYMAWVRQAPGKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDN
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPSTEALFAYWGQGTLLTVSS (配列番号42)

7 E 1 1 V

【化 3 5】

DIVLTQTPLSLSATPGQSVSISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQRPQGSPQLLIYLVSDLGSGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYTFGAGTNLEIK (配列番号43)

20

7 F 0 2 V H および V L アミノ酸配列：

7 F 0 2 V H

【化 3 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYYMAWVRQGPGLGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRSEDTAVYYCARPSTEALFAYWGHGTLTVSS (配列番号44)

30

7 F 0 2 V

【化 3 7】

DVVMVTQTPSTLSATPGQSASISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFSGSGSGTDFT
LKISRVEAEDVGIYYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK (配列番号45)

【0 3 0 1】

ラット 7 E 5 重鎖可変領域のアミノ酸配列の、ヒト化 7 E 5 変異型 8 G 0 9、7 E 1 2、7 G 0 9、8 F 0 7、7 F 0 6、7 F 1 1、7 E 1 1、および 7 F 0 2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列への整列を、C D R 1、2、および 3 を指し示して図 8 A に示す。ラット 7 E 5 軽鎖可変領域のアミノ酸配列の、ヒト化 7 E 5 変異型 8 G 0 9、7 E 1 2、7 G 0 9、8 F 0 7、7 F 0 6、7 F 1 1、7 E 1 1、および 7 F 0 2 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列への整列を、C D R 1、2、および 3 を指し示して図 8 B に示す。ラット 7 E 5 抗体の 8 個のヒト化変異型についての重鎖 C D R 1、2、および 3 配列は、ラット 7 E 5 m A b のものと同じである（そのアミノ酸配列はそれぞれ配列番号 6、7、および 8 に示される）。同様に、ラット 7 E 5 抗体の 8 個のヒト化変異型についての重鎖 C D R 1、2、および 3 配列は、ラット 7 E 5 m A b のものと同じである（そのアミノ酸配列はそれぞれ配列番号 1 1、1 2、および 1 3 に示される）。

40

【0 3 0 2】

F a b 発現、精製、および Q C：更なるアッセイ（即ち、事前感作した赤血球の補体媒

50

介性溶解アッセイ、親和性決定、融解温度および凝集挙動アッセイ)において7E5ヒト化変異型の一部を特性評価するために、可溶性Fabを上記の8個のクローンのリーダーパネルから生産および精製した。8個全てのヒト化クローンのFab遺伝子および7E5 WT対照をSfiI/NotI消化によってクローニングしてpCB4発現ベクター(pCB13に酷似しているが、遺伝子3体系化配列を持たない)にし、熱ショックによってTG1大腸菌株に形質転換した。配列を、CLC Main Workbench Softwareを使用して確認した。

【0303】

pCB4クローン化7E5ヒト化変異型および7E5 WTからの可溶性Fabを含有するP.E.の生産を、0.1%のグルコースおよびカルベニシリンを100μg/mlで補充した800mlの2xYT中で行った。1mMの最終濃度へのIPTGとの0.5~0.8のOD₆₀₀でのインキュベーション後、培養物を少なくとも20時間24にインキュベートした。可溶性FabをTALON金属親和性樹脂によって精製した。

【0304】

500ngの結果として得られる精製産物をSDS-PAGE上で実行したとき、Fab特異性バンドとは別のいくつかの更なるバンド(それぞれ非還元条件下および還元条件下で50kDaおよび約25kDa)が観察された。これらの試料を更に精製するために、ヒトCH1ドメインに特異的に結合するVHHを含有するLife Technologies製の樹脂(Capture Select™ Affinity resin IgG-CH1、カタログ番号194320005)を製造業者の指示に従って使用した。結果として得られる精製されたタンパク質の濃度を、微量分光光度計を使用し、ε=1.53のモル吸光係数を仮定してOD_{280nm}を測定することによって見積もった。精製した試料のSDS-PAGE分析は、高レベルの純度を示した。精製したFabの機能性をELISAにおいて確認し、このELISAでは、これらのFabの連続希釈物の、ニュートラビジンをコーティングしたMaxisorpプレートに捕捉した10nMのビオチン化hC6への結合を検査した。8個全ての精製したFabが、hC6への有効な結合を呈した。

【0305】

Biacore分析: 7E5のヒト化が結果として得られるヒト化抗体の結合特異性または活性を改変したかどうかを決定するために、Biacore親和性分析を、(親)野生型ラット7E5 mAbおよびマウス27B1 mAbと比較して、8個の選択されたヒト化Fab(7E12、7E11、7F2、7F6、7F11、7G9、8F7、および8F9)に対して行った。結果を図9に示す。結果は、7E5のヒト化が抗体の特異性または活性を改変しなかったことを示す。

【0306】

実施例7: ヒト化抗C6抗体の「ミックスアンドマッチ」特性評価

この実施例では、選択されたヒト化抗C6抗体からのヒト化VH鎖およびヒト化VL鎖のパネルを、様々な組み合わせで哺乳動物細胞において全長抗体として発現させ、その機能活性について評価した。

【0307】

使用したヒト化VH鎖は、実施例6に記載した8個のVH鎖(8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、および7F02)、ならびにそのアミノ酸配列が配列番号46に示される9番目の7C02であった。これら9個の鎖の整列を図8Aに示す。

【0308】

使用したヒト化VL鎖は、実施例6に記載した8個のVH鎖(8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、および7F02)、ならびにそのアミノ酸配列が配列番号47に示される9番目の7G08であった。これら9個の鎖の整列を図8Bに示す。

【0309】

重鎖および軽鎖ヌクレオチド配列を発見ベクターへとクローニングして、安定させた IgG4 (S228P) 定常領域を有する全長鎖をコードする配列を作出した。9 個の重鎖および 9 軽鎖を、CHO 宿主細胞において全ての可能な組み合わせで対として共発現させた。このようにして、9 個の重鎖および 9 個の軽鎖の 81 個全ての可能な「ミックスアンドマッチ」コンビネーションを評価した。81 個の対を溶結アッセイおよび MAC ELISA において各々試験した。各々のアッセイには、CHO 上清からの 4 μ g のヒト化 7E5 mAb を使用した。溶結アッセイの結果を図 7A に示す。MAC ELISA の結果を図 7B に示す。これらの結果は、9 個の VH 鎖および 9 個の VL 鎖の 81 個全ての可能な「ミックスアンドマッチ」コンビネーションが、両方のアッセイにおいて強力な阻害活性を呈したことを示す。

10

【0310】

実施例 8： C6 抗体が神経再生に与える影響を試験するための動物モデル

神経挫滅モデル（坐骨神経の挫滅）を使用して、ラット 7E5 またはヒト化 7E5 などの抗ヒト C6 モノクローナル抗体がヒト C6 を補充した C6 ノックアウトラット（PVC）における感覚機能の回復に与える影響を試験する。神経挫滅は、末梢神経傷害のモデルである。WO 2010/005310 (PCT/NL2009/050418)、および de Jonge et al (2004) Hum Mol Genet. 13(3) : 295 - 302 を参照されたい。

【0311】

治療のため、C6 - / - ラット（PVG、6 ~ 8 週）にヒト C6 または対照（PBS）のいずれかを補充した。C6 を PBS 中 4 mg / kg の用量で、挫滅傷害前 1 日前（- 1 日目）、および 0 ~ 6 日目には 1 日 1 回、C6^{+/+} ラットに静脈内投与した。C6 補充ラットおよび対照群を挫滅の 10 分前に開始して抗ヒト C6 mAb で処置した（0 日目）（腹腔内注射で 4 mg / ラット）。PVG ラットを神経挫滅の 5 分前に抗ヒト C6 mAb（4 mg / ラット IP）で再度処置した。抗ヒト C6 mAb の後続の用量を 1 ~ 6 日目に与えた（4 mg / ラット IP）。対照動物は、同じ挫滅を受けたが、抗体による処置はなかった。動物のサブセットを挫滅後 72 時間で屠殺し、神経の組織構造を研究した。72 時間を選択し、これは、この時にワラー変性が WT 動物において最大であり、この時点が治療効果を評価するために極めて有益であるためである。

20

【0312】

神経挫滅を以下のように行った。全ての手術手順を、深いイソフルラン麻酔（2.5 体積%のイソフルラン、1 L / 分 0.2 および 1 L / 分 N2O）下で無菌で行った。左大腿部の毛を剃り、坐骨神経を大腿上部の切開によって露出させた。神経を、平滑で湾曲した鉗子（7 番）を使用して坐骨切痕のレベルにて 10 秒間 3 回で挫滅させて、神経の挫滅エリアの完全に半透明の外観をもたらした。右脚を内部対照として使用した。次に、筋および皮膚を縫合によって閉じた。

30

【0313】

組み換え抗ヒト C6 mAb 7E5（12 mg / kg）による処置のための実験セットアップを表 6 で以下に示す。

【表 6】

表 6：神経挫滅実験のための実験セットアップ

ラット 番号	Temgesic	再構成 (4mg/kg)	ブリード前	処置 (12mg/Kg)	挫滅 傷害	ブリード後
1	あり	C6	あり	7 E 5	あり	あり
2	あり	C6	あり	7 E 5	あり	あり
3	あり	C6	あり	7 E 5	あり	あり
4	あり	C6	あり	7 E 5	あり	あり
5	あり	C6	あり	7 E 5	あり	あり
6	あり	C6	あり	PBS	あり	あり
7	あり	C6	あり	PBS	あり	あり
8	あり	C6	あり	PBS	あり	あり
9	あり	なし	あり	PBS	あり	あり
10	あり	なし	あり	PBS	あり	あり

【 0 3 1 4 】

傷害後 3 日に、全ての動物に、pH 7.6 のピペラジン - N - N - ビス (2 - エタン
スルホン酸) (P I P E S) 緩衝液中 4 % のパラホルムアルデヒドを心臓内灌流した。左
および右坐骨神経を各動物から除去し、挫滅部位から遠位の 5 mm 長のセグメント 1 つを
収集した。各セグメントを慣習的に加工して、免疫組織化学のためのパラフィンワックス
にした。

【 0 3 1 5 】

7 ミクロン厚のパラフィン切片を Super frost Plus ガラススライド (K
n i t t e l G l a s s , G e r m a n y) に載せた。切片を脱パラフィン化および再
水和した。エプトープを、10 mM のクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6 . 0) 中の熱誘
導性抗原回復によって露出させた。抗体の非特異的結合を、室温で 20 分間、PBS 中 1
0 % の正常なヤギ血清 (D A K O , G l o s t r u p , D e n m a r k) を使用して遮断
した。一次抗体を Normal Antibody Diluent (Immunolo
g i c , D u i v e n , t h e N e t h e r l a n d s) 中で希釈し、室温で 1 時間イン
キュベートした。1 % ウシ血清アルブミン中で 1 : 200 に希釈した Sigma - A l d
r i c h (S t . L o u i s , M O) からのヤギ抗ウサギフルオレセインイソチオシア
ネート (F I T C) 複合体化 Ig G またはヒツジ抗マウス Cy 3 複合体化のいずれかにお
いて、切片をインキュベートすることによって検出を行った。インキュベート時、スライ
ドを 4 , 6 - ジアミノジン - 2 - フェニルインドール (D A P I) (S i g m a - A l d
r i c h) で対比染色し、Vectashield 封入剤 (V e c t o r L a b o r a
t o r i e s , B u r l i n g a m e , C A) によって封入した。画像を、蛍光顕微鏡 (V a n o x , A H B T 3 , O l y m p u s , T h e N e t h e r l a n d s) に取り付
けたデジタルカメラ (D P 1 2 , O l y m p u s , Z o e t e r w o u d e , T h e N e t h e r l a n d s) によって捉えた。

【 0 3 1 6 】

結果を図 10 に示す。細胞を、MAC の検出のために抗 C 9 により、軸索の検出のため
に抗 pan - ニューロフィラメント (S M I 3 1 2) によって、ミエリンの検出のために
抗ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) により、および食細胞 (マクロファージ) の検出
のために抗リソソーム膜 (C D 6 8) により染色した。パネル A は、傷害のない坐骨神経
の結果を示し、これは、MAC の不在、強力な軸索染色、環状のミエリン染色、および活

性化されたマクロファージがないことを示している。パネル B は、傷害後の結果を示し、ここでは、正常な補体活性を有するラットは、M A C 堆積、軸索およびミエリンの喪失、ならびにマクロファージの流入を示した。パネル C は、C 6 再構成ラットを抗 C 6 で処置した後の結果を示し、これは、抗体が、M A C 形成を完全に遮断し、軸索およびミエリン破壊を阻害し、マクロファージ流入を阻害することを示している。パネル D は、再構成されていない C 6 - / - ラットの結果を示し、M A C 堆積の不在および急激な神経変性を示している。

【 0 3 1 7 】

このように、神経挫滅実験の結果は、7 E 5 抗 C 6 抗体によるインビボの処置が、M A C 形成を遮断し、軸索およびミエリン破壊を阻害し、マクロファージ流入を低減すること

10

【 0 3 1 8 】

均等物

当業者であれば、本明細書に記載される発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識することになるか、あるいは単に日常的な実験を使用してそれを特定することができる。かかる均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

【表 7 - 1】

配列リストの概要

配列番号	説明
1	GSCQDGRQLEWGLERT(ペプチド418)
2	DGRQLEWGLERTRLSS(ペプチド420)
3	GSCQDGRQLEWGLERTRLSS(ペプチド418/420)
4	7E5 VHヌクレオチド配列(実施例5)
5	7E5 VHアミノ酸配列(実施例5)
6	7E5 VH CDR1アミノ酸配列(実施例5)
7	7E5 VH CDR2アミノ酸配列(実施例5)
8	7E5 VH CDR3アミノ酸配列(実施例5)
9	7E5 VLヌクレオチド配列(実施例5)
10	7E5 VLアミノ酸配列(実施例5)
11	7E5 VL CDR1アミノ酸配列(実施例5)
12	7E5 VL CDR2アミノ酸配列(実施例5)
13	7E5 VL CDR3アミノ酸配列(実施例5)
14	8G09 VHヌクレオチド配列(実施例6)
15	8G09 VLヌクレオチド配列(実施例6)
16	7E12 VHヌクレオチド配列(実施例6)
17	7E12 VLヌクレオチド配列(実施例6)
18	7G09 VHヌクレオチド配列(実施例6)
19	7G09 VLヌクレオチド配列(実施例6)
20	8F07 VHヌクレオチド配列(実施例6)
21	8F07 VLヌクレオチド配列(実施例6)
22	7F06 VHヌクレオチド配列(実施例6)
23	7F06 VLヌクレオチド配列(実施例6)
24	7F11 VHヌクレオチド配列(実施例6)
25	7F11 VLヌクレオチド配列(実施例6)
26	7E11 VHヌクレオチド配列(実施例6)
27	7E11 VLヌクレオチド配列(実施例6)
28	7F02 VHヌクレオチド配列(実施例6)
29	7F02 VLヌクレオチド配列(実施例6)
30	8G09 VHアミノ酸配列(実施例6)
31	8G09 VLアミノ酸配列(実施例6)
32	7E12 VHアミノ酸配列(実施例6)
33	7E12 VLアミノ酸配列(実施例6)

10

20

30

40

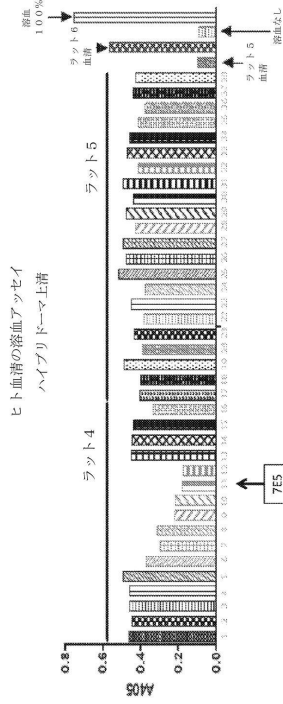
【表 7 - 2】

配列番号	説明
34	7G09 VHアミノ酸配列(実施例6)
35	7G09 VLアミノ酸配列(実施例6)
36	8F07 VHアミノ酸配列(実施例6)
37	8F07 VLアミノ酸配列(実施例6)
38	7F06 VHアミノ酸配列(実施例6)
39	7F06 VLアミノ酸配列(実施例6)
40	7F11 VHアミノ酸配列(実施例6)
41	7F11 VLアミノ酸配列(実施例6)
42	7E11 VHアミノ酸配列(実施例6)
43	7E11 VLアミノ酸配列(実施例6)
44	7F02 VHアミノ酸配列(実施例6)
45	7F02 VLアミノ酸配列(実施例6)
46	7C02 VHアミノ酸配列(図8A)
47	7G08 VLアミノ酸配列(図8B)
48	ヒトVH3__1配列(図6A)
49	ヒトVK2__5アミノ酸配列(図6B)
50	ヒトC6部分アミノ酸配列(図4A)
51	ラットC6部分アミノ酸配列(図4A)
52	ヒトC6全長アミノ酸配列(C6の定義は明細書中)

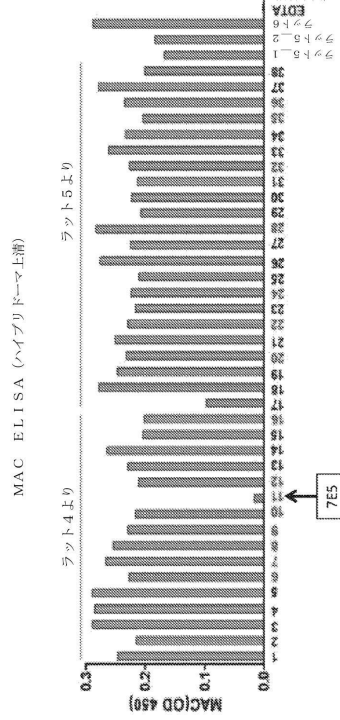
10

20

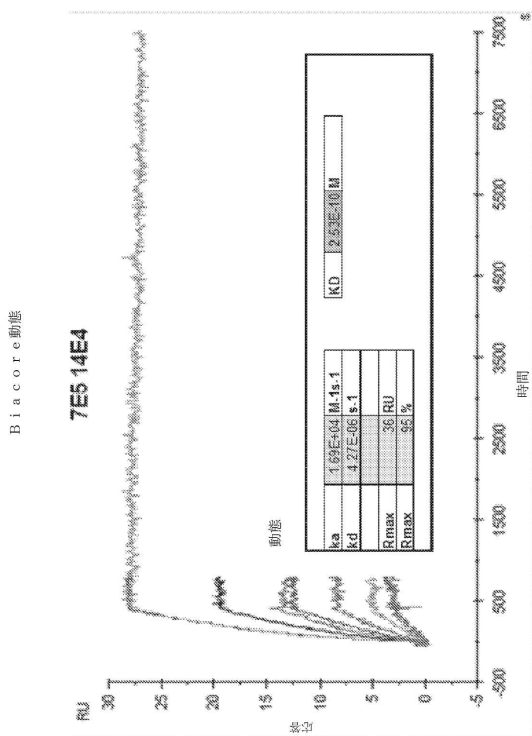
【図 1 A】



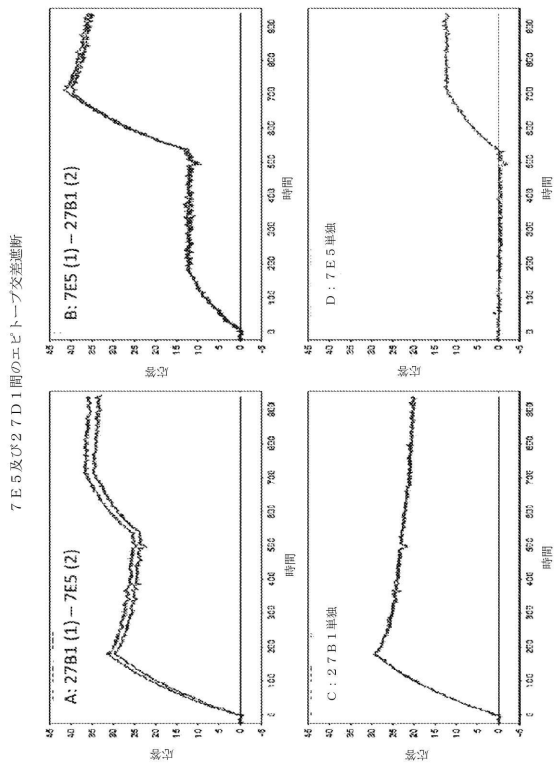
【図 1 B】



【図 2】



【図 3】



【 図 4 A 】

ヒト 601 CEGKROEDCTFSIMENNGQPCINDDEMEKVDLPFLIADSGCPQVPPENGFIINEXQ 660
CEG+ QREDCITFINE QQECI+DDEE+KEVDL E EADSGCPQ FEN F+ NEK+
ラット 601 CEGKHQEDCTFSIMEKVGQPCISDDEEKEVDLAEFEADSGCPQFLPENAFVNEKK 660
ヒト 661 LYLVGEDVEISCLAGFETVGYFRCLPDTWRQGVDECORTECKPVOEVLITTPFQ 720
LY VGB+VEISCLAGP+ VGYFRCLPD TWRQGVDECORTEC+KPVO+VLIT+PFQ
ラット 661 LYSVGEVEISCLAGFVAVGYFRCLPDRTWQGVDECORTECLKPVOVDLITISPFQ 720
ヒト 721 ペプチド 354 ペプチド 373, 376 & 377
+Y+IGESIELTCT+GFVVGAPSRVTCQGNSS 376
ラット 721 YKIGESIELTCT+GFVVGAPSRVTCQGNSS 376
ヒト 781 GSECICMSPEEDCSHSEDLGVFTDSNDYFTSPACKFLAEKCLNNQOLHFIHSCQEG 840
GSEC+CMSPEEDCS+SEDLGVFTDSNDYFTSPACKFLAEKCLN+ Q HFT+GSCQEG
ラット 781 GSECICMSPEEDCSHSEDLGVFTDSNDYFTSPACKFLAEKCLNNQOLHFIHSCQEG 840
ヒト 841 POLWGLERIRLSSNTKESCGYDTCYDWEKCSASTSKVCVCLLPQCFKGNQLYCVKM 900
OLEWGLER +L+ STK+ CGYDTCYDWEKCSA TS CVCLLPQC K NQL+CVKM
ラット 841 POLEWGLERLANKSTKRVPCGYDTCYDWEKCSASTSKVCVCLLPQCFKGNQLYCVKM 900
ヒト 901 GSSTSEKTLNICEVGTIRCANKMEILHPGKCL 933
GSS KT+NIC +G +RCANK+EIL+PG+CL
ラット 901 GSSNRGKTYNICTIGAVRCANKMEVILNPGCL 933

【 図 4 B 】

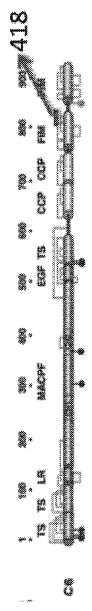
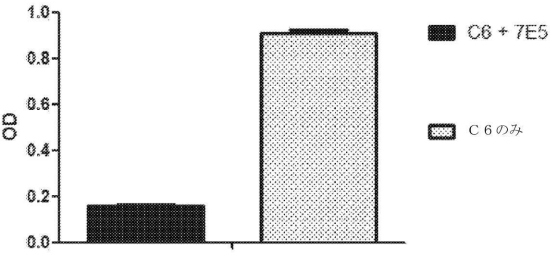


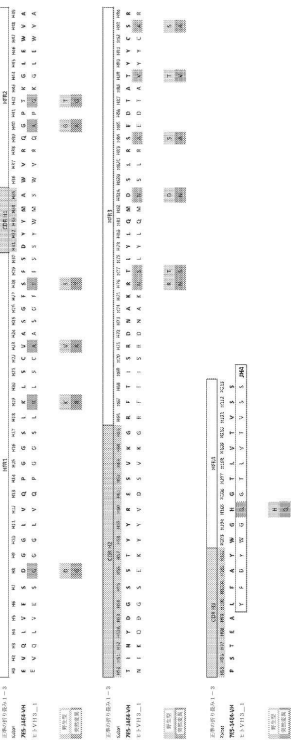
FIGURE 4B

【 図 5 】

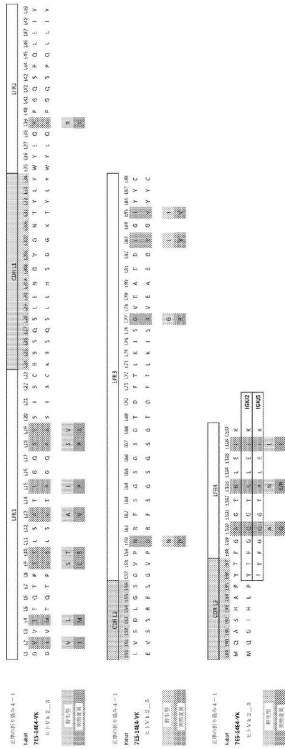
7 E 5 が C H 5 0 に与えるインビボの影響
1.2 mg I P 60秒隔
C 6 補充 C 6 ノーラット
(全 2 mg ; 7 E 5 の 2 4 時間前に 1 mg、5 分後に 1 mg)



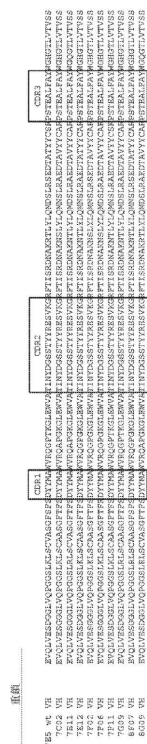
【 図 6 A 】



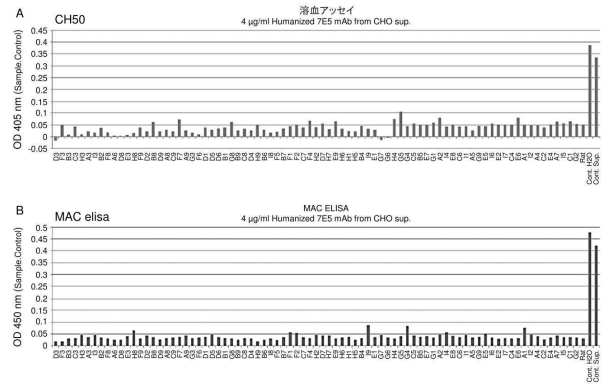
【 図 6 B 】



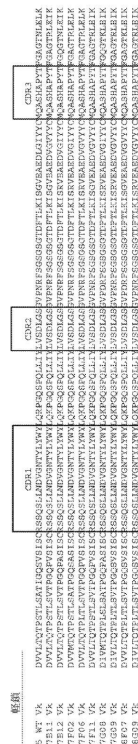
【 図 8 A 】



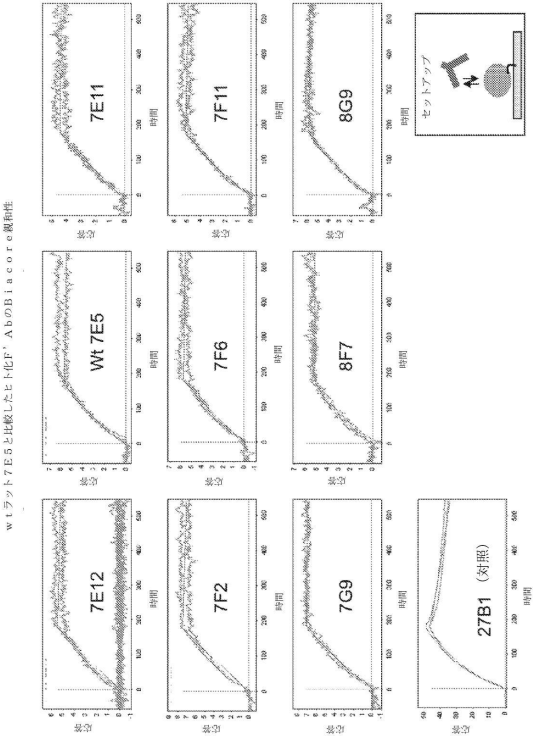
【 図 7 】



【 図 8 B 】

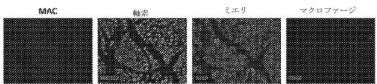


【図 9】

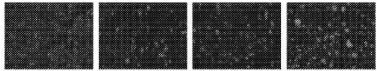


【図 10】

左から右：傷害を受けていない坐骨神経は、標的免疫複合体 (MAC) の存在、強力な軸索染色 (ニューロフィラメント、βM1312)、微細のミエリン染色 (ミエリン塩基性タンパク質、MBP)、及び活性化されたマクロファージ (CD68マーカー) がないことを示している。

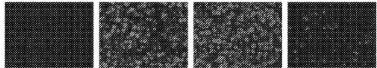


パネルA：傷害を受けていない坐骨神経
傷害後、正常な神経活性を有するラットは、マクロファージの侵入を伴って、MAC増殖、軸索及びミエリンの喪失を示す。



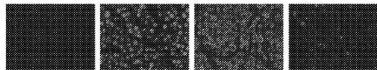
パネルB：ヒトC6によって再構成したC6-ラット中で観察された傷害を受けた坐骨神経及び正常な神経活性

Regenemaによる治療は、MAC形成、軸索及びミエリン破壊、ならびにマクロファージ侵入を完全に遮断する。



パネルC：ヒトC6で再構成しTE5で治療したC6-ラット。ラットはMAC増殖及び変性を有しない。

この結果は、C6-ラットを再構成しなかったときに観察されたものと類似する。



パネルD：C6欠乏 (-/-) ラットにおけるMAC増殖の不在及び急速な神経変性

【配列表】

0006738348000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>N</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/00</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>25/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/02</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>25/00</i>	<i>1 0 1</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>21/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>1 0 5</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>21/00</i>	
			<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 0 5 9 4 6 (J P , A)

Lisa Victoria Jane Eynstone Clayton, "Generation and characterisation of anti-C6 monoclonal antibodies in C6-deficient mice : the search for an anti-C6 therapy", PhD Thesis , University of Wales (Cardiff University), 2006, pp. 78-95 (Chapter 4), retrieved 2019.11.01, URL , <https://pdfs.semanticscholar.org/47b8/f0737635df50d6dfcce3fdcc2a6937d431d6.pdf>

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N *1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0*

C 0 7 K *1 / 0 0 - 1 9 / 0 0*

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)