

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7209464号

(P7209464)

(45)発行日 令和5年1月20日(2023.1.20)

(24)登録日 令和5年1月12日(2023.1.12)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

U

A 6 1 P 31/12 (2006.01)

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 0 7 K 16/24 (2006.01)

C 0 7 K 16/24

請求項の数 11 (全32頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-501280(P2017-501280)

(86)(22)出願日 平成27年7月10日(2015.7.10)

(65)公表番号 特表2017-525343(P2017-525343
A)

(43)公表日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(86)国際出願番号 PCT/IB2015/055226

(87)国際公開番号 WO2016/005950

(87)国際公開日 平成28年1月14日(2016.1.14)

審査請求日 平成30年7月6日(2018.7.6)

審査番号 不服2021-13420(P2021-13420/J
1)

審査請求日 令和3年10月5日(2021.10.5)

(31)優先権主張番号 14176619.6

(32)優先日 平成26年7月10日(2014.7.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 503148096

ユニヴェルズイテート・ツューリヒ

スイス国ツューハー - 8 0 0 6 ツュー

リヒ, レミシュトラッセ 7 1

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100196508

弁理士 松尾 淳一

(74)代理人 100157923

弁理士 鶴喰 寿孝

(72)発明者 ボイマン, オヌール

スイス国 キュスナハト シーエッチ - 8

7 0 0 ボーグレレンストラッセ 4 4 エー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトインターロイキン - 2 に対する免疫刺激性モノクローナル抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体 (m A b) 又はその抗原結合フラグメントであり、該抗体又はその抗原結合フラグメントの h I L - 2 への結合は、h I L - 2 の C D 2 5 への結合を阻害し、該 h I L - 2 への結合は、表面プラズモン共鳴結合アッセイにて測定される解離定数 (K_D) 7.5 nmol/L によって特徴付けられ、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 7 のアミノ酸配列からなる H C D R 1、配列番号 8 のアミノ酸配列からなる H C D R 2、配列番号 9 のアミノ酸配列からなる H C D R 3、配列番号 10 のアミノ酸配列からなる L C D R 1、配列番号 11 のアミノ酸配列からなる L C D R 2 及び配列番号 12 のアミノ酸配列からなる L C D R 3 を含むことによって特徴付けられ、そして配列番号 1 の h I L - 2 のアミノ酸配列におけるアミノ酸 K 5 2、P 5 4、K 5 5、T 5 7、R 5 8、T 6 1、F 6 2、K 6 3、Q 9 4、及び K 9 6 を含む h I L - 2 エピトープへ結合する、前記ヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体 (m A b) 又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

前記 h I L - 2 への結合は、解離速度 (K_{off}) $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ によって特徴付けられる、請求項 1 に記載のヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントがマウス I L - 2 への測定可能な交差反応性を

示さない、請求項 1 又は 2 に記載のヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

配列番号 19 に対して 80 % の同一性を有する重鎖可変領域の V H 配列及び / 又は配列番号 20 に対して 80 % の同一性を有する軽鎖可変領域の V L 配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

前記エピトープは、配列番号 1 の h I L - 2 のアミノ酸配列におけるアミノ酸 N 50、N 53、N 91、L 92、A 93、及び N 97 の一つ以上をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の核酸分子を含む細胞、又は請求項 6 に記載の核酸分子を発現する細胞。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体 (m A b) 又はその抗原結合フラグメントが産生可能である細胞。

【請求項 10】

癌又はウイルス感染症の治療に使用するための、

- a . 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の h I L - 2 特異的モノクローナル抗体 (m A b) 又はその抗原結合フラグメント、及び
- b . ヒトインターロイキン - 2

を含む、治療製剤。

【請求項 11】

癌又はウイルス感染症の治療で使用するための、h I L - 2 と同時に投与される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) 特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はヒトインターロイキン - 2 (h I L - 2) へ結合する抗体に関する。より具体的には、本発明は h I L - 2 の特定のエピトープに結合し、エピトープへの結合時に、h I L - 2 の C D 2 5 への結合を阻害することができる抗体に関する。さらに、本発明は、該抗体のインビトロ及びインビボでの治療用途に関する。

【背景技術】

【0002】

悪性黒色腫は男性及び女性で頻発する癌型である。一度黒色腫が転移性になり、離れた部分まで広がると、5 年生存率は極めて低く、15 % であると算出されている。転移性黒色腫に対する現在可能な治療戦略では、この生存率をほとんど改善しない。

【0003】

インターロイキン - 2 は転移性黒色腫に対する細胞傷害性リンパ球を強力に刺激することができるサイトカインである。しかし、I L - 2 はまた自己免疫疾患の予防に重要な、いわゆる C D 2 5 + C D 4 + 制御性 T 細胞 (T r e g 細胞) をも刺激することができる。重要なことに、T r e g 細胞は細胞傷害性リンパ球による抗腫瘍応答を著しく衰退させることができ、それ故に I L - 2 の有益な抗腫瘍効果と多少なりとも拮抗する。さらに臨床の

10

20

30

40

50

抗腫瘍応答を達成するのに必要な用量では、IL-2は有害な副作用を発揮するかもしれない。

【0004】

基本的なIL-2免疫療法は1980年代前半から転移性黒色腫と転移性腎細胞癌の免疫療法のために使われてきており、それらの効能は、それぞれ1996年と1999年にFDAからの承認に至っている。高用量での投与されたIL-2は、これらの致命的な転移性癌を罹患している患者の約17%において他覚症状率が、及び約6-9%において完全な退行が示された一方で、それらの用量で投与されたIL-2は、しばしば低血圧症、肺水腫、肝細胞の損傷、胃腸毒性及び全身性浮腫といった毒性の副作用に至った。さらに、前述のようにIL-2はTreg細胞を活性化し、それは順次抗腫瘍CD8⁺T細胞及びNK細胞の活性を衰退させる。

10

【0005】

IL-2と特定の抗IL-2モノクローナル抗体(mAb)の組み合わせは、

(1) IL-2をTreg細胞ではなく優先的に細胞傷害性リンパ球へ指向させ、かつ

(2) IL-2をより強力ではあるがより有毒でなくすること

によって実験的な癌免疫療法のマウスモデルにおいてIL-2療法の改善が示された(Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, 及び Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. Science (2006) 311:1924-1927; Krieg C, Letourneau S, Pantaleo G, 及び Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA (2010) 107:11906-11911)。

20

【0006】

このアプローチは、非変異で天然のIL-2が抗IL-2抗体(mAb)を介してCD8⁺T細胞及びNK細胞へ運ばれ、続いて強力な抗腫瘍特性を発揮し、一方で、この種の抗IL-2 mAbと複合化したIL-2はTreg細胞をほとんど活性化しないという利点がある。さらにこの種の抗IL-2 mAbと複合化したIL-2は、マウスにおいては基本的なIL-2免疫療法よりさらに毒性が低い。しかし、この治療は適切な抗ヒトIL-2 mAbの欠如により、今日まで患者に使用可能ではなかった。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, 及び Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. Science (2006) 311:1924-1927
Krieg C, Letourneau S, Pantaleo G, 及び Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences USA (2010) 107:11906-11911)

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明によって解決する課題は、インビトロ及びインビボで治療用途に使用するための、

50

ヒトIL-2の特定のエピトープを認識して結合でき、それによってTreg細胞と比較して細胞傷害性T細胞及びNK細胞を優先して刺激する抗ヒトIL-2モノクローナル抗体を提供することである。この課題は独立請求項の主題によって解決される。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の第一の側面によれば、ヒトインターロイキン-2(hIL-2)特異的モノクローナル抗体(mAb)又はその抗原結合フラグメントが提供され、ここで、該抗体はhIL-2の特定のエピトープに結合でき、それによってCD25への結合を阻害し、故にhIL-2/IL-2Rとの相互作用の免疫学的効果を制御する。本発明の抗体は、

a) 該mAbの可変鎖は、配列番号005又は配列番号006に対して 85%、 90%、 95%、又は 99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むこと、

10

b) hIL-2へ結合する該抗体は、いわゆる、mAb+hIL-2 mAb*hIL-2の反応を示し、式中、mAb*hIL-2は抗体とインターロイキンの結合複合体を記号で示したものであり、解離定数(K_D) 7.5 nmol/L 、 5 nmol/L 、 3 nmol/L 、 2 nmol/L 、又は 1.5 nmol/L によって特徴付けられること、

c) hIL-2へ結合する抗体は解離速度(K_{off}) $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、又は $2.1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ によって特徴付けられること、

d) hIL-2へmAbが結合することで、結果としてmAb*hIL-2複合体は効率よくヒトIL-2受容体(CD25としても知られる)へ結合できず、そして表面プラズモン共鳴で測定する際は、遊離の(非複合体)IL-2へのヒトCD25への結合と比較して、mAb*hIL-2複合体へのヒトCD25の結合は効果的にバックグラウンドレベルであること、及び/又は

20

e) 該抗体はマウスIL-2への測定可能な交差反応性を示さないこと、というパラメータの少なくとも一つによってさらに特徴付けられる。

【0010】

マウスIL-2との交差反応性の欠如は、通常マウスモデルを必要とする前臨床試験、例えば交差反応する抗IL-2 mAbが結合して内在性マウスTreg細胞から内在性マウスIL-2を隔離させ、それによって内在性抗腫瘍応答する可能性があるマウス腫瘍モデルの治療でmAb*hIL-2複合体を使用するような場合に有利である。

30

【0011】

マウスIL-2との交差反応性の欠如は、ヒトの患者において候補mAbを開発する前に行う前臨床の安全性及び有効性試験に対しても有利である。

【0012】

特定の実施態様では、hIL-2 mAbは、配列番号019又は配列番号020に対して 80%、 85%、 90%、 92%、 93%、 94%、 95%、 96%、 97%又は 98%の同一性を有する V_H 及び/又は V_L 配列を少なくとも一つ含む。

【0013】

特定の実施態様では、hIL-2 mAbの可変鎖は配列番号003、004、005又は006に対して 85%、 90%、 95%、又は 99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ該hIL-2 mAbは解離定数 7.5 nmol/L 、 5 nmol/L 、 3 nmol/L 、 2 nmol/L 、又は 1.5 nmol/L によって特徴付けられる。

40

【0014】

特定の実施態様では、該hIL-2 mAbの可変鎖は配列番号005又は006に対して 85%、 90%、 92%、 93%、 94%、 95%、 96%、 97%、 98%、又は 99%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ該IL-2 mAbは解離速度 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、又は $2.1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ によって特徴付けられる

50

。

【 0 0 1 5 】

特定の実施態様では、該 h I L - 2 m A b の可変鎖は配列番号 0 0 5 又は 0 0 6 に対して 8 5 %、 9 0 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ該 h I L - 2 m A b はマウス I L - 2 への測定可能な交差反応性を示さない。

【 0 0 1 6 】

特定の実施態様では、有害な反応を避けてヒトの患者へ投与するために該 h I L - 2 m A b の配列はヒト化している。

【 0 0 1 7 】

特定の実施態様では、該 h I L - 2 m A b は抗原結合フラグメント (F a b) 又は 1 本鎖可変フラグメント (s c F v) として与えられる。

【 0 0 1 8 】

特定の実施態様では、該 h I L - 2 m A b は、配列番号 0 0 7、0 0 8、0 0 9、0 1 0、0 1 1 又は 0 1 2 に対して 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、又は 9 8 % の同一性を有する相補性決定領域 (C D R) の配列を少なくとも一つ含む。

【 0 0 1 9 】

本発明の第二の側面によれば、本発明の第一の側面に記載のヒトインターロイキン - 2 へ結合可能なモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸分子が提供される。

【 0 0 2 0 】

特定の実施態様では、本発明の第二の側面に記載の核酸分子は配列番号 0 0 3 から 0 0 4 に対して 6 0 %、 7 0 %、 8 0 %、 9 0 %、 9 5 %、又は 9 9 % の配列同一性を含む。

【 0 0 2 1 】

本発明の第三の側面によれば、本発明に記載の核酸分子を含むベクターが提供される。

【 0 0 2 2 】

本発明の第四の側面によれば、本発明に記載の核酸分子を含む又は発現する細胞が提供される。

【 0 0 2 3 】

本発明の第五の側面によれば、本発明の第一の側面に記載の抗体を産生することができる細胞が提供される。

【 0 0 2 4 】

本発明の第六の側面によれば、該産生された抗体が本発明の第一の側面の抗体であることに特徴付けられるモノクローナル産生ハイブリドーマ細胞株が提供される。

【 0 0 2 5 】

本発明の第七の側面によれば、癌の、又はウイルス感染症のような免疫刺激性治療の効果がある他の疾病の、治療に使用するための治療製剤であり、

i . 本発明の第一の側面に記載のモノクローナル抗体及び / 又は

i i . ヒトインターロイキン - 2 又はヒト I L - 2 変異体をその対象に同時に若しくは異なる時間に与えること、を含む。

【 0 0 2 6 】

本発明の第八の側面によれば、融合タンパク質が提供される。該融合タンパク質は、

a . h I L - 2 結合ポリペプチドフラグメントであって、ここで前記ポリペプチドは、

i . 該 h I L - 2 結合ポリペプチドフラグメントは配列番号 0 2 1 又は配列番号 0 2 2 に対して 8 5 %、 9 0 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、又は 9 8 % 同一性を有するアミノ酸配列を含むこと、

i i . 前記ポリペプチドフラグメントの h I L - 2 への h I L - 2 結合は解離定数 7 . 5 n m o l / L、 5 n m o l / L、 3 n m o l / L、 2 n m o l / L 又は 1 . 5

10

20

30

40

50

nmol/Lによって特徴付けられること、

i i i . 前記 h I L - 2 結合ポリペプチドフラグメントの h I L - 2 への結合が解離速度 (K_{off}) $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 、 $8 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $6 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $4 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、 $3 \times 10^{-5} s^{-1}$ 、又は $2.1 \times 10^{-5} s^{-1}$ によって特徴付けられること、及び/又は

i v . 該 h I L - 2 結合ポリペプチドフラグメントがマウス I L - 2 と測定可能な交差反応性を示さないこと、

というパラメータのいずれか一つによって特徴付けられ、

b . 配列番号 001 に対して 85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は 98% の同一性を有するヒト I L - 2 ポリペプチドフラグメント、かつ任意に

c . 一つの単一ポリペプチド鎖となるように h I L - 2 結合ポリペプチドフラグメントをヒト I L - 2 ポリペプチドフラグメントへ結合させる、1~50、特に 5~40、より特に 10~30、さらに特に約 15~25 のアミノ酸のアミノ酸リンカー、を含む。

【0027】

言い換えれば、融合タンパク質は、ヒトインターロイキン - 2 に結合し、C D 8 + T 細胞及び N K 細胞のような選択された免疫細胞を刺激するように指示する該抗体の能力を保持している。

【0028】

そのような融合タンパク質を使用する利点は、ヒト I L - 2 が該抗体から解離することができないこと、そして治療が二つの製品ではなく単一の製品で構成されている、つまり製造、投与、法令順守の様々な面が容易になることである。

【0029】

本発明の第九の側面によれば、特異的なエピトープへ結合する単離された抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。前記エピトープは、本発明の他の側面に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメントが結合するエピトープであってもよい。ある実施態様では、単離した抗体又は分子は、アミノ酸 K 52、P 54、K 55、T 57、R 58、T 61、F 62、K 63、Q 94 及び K 96 を含むヒトインターロイキン - 2 エピトープへ結合する。他の実施態様では、該単離された抗体又は分子は、アミノ酸 N 50、N 53、N 91、L 92、A 93 及び N 97 の少なくとも一つ以上をさらに含むエピトープへ結合する。他の側面に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントと同等のエピトープ認識特性を有する抗原認識表面を有する単離された抗体又は分子もまた提供される。

【0030】

例えばコード配列又は結合エピトープのような単一の分離可能な形態の選択肢が「実施態様」として示されている場合はどこでも、そのような選択肢は自由に組み合わせて、ここで開示する本発明の各々の実施態様を形成すると理解される。

【0031】

本発明は以下の例及び図からさらに例示され、そこからさらなる実施態様と利点を引き出すことができる。これらの例は発明を例示することを意図し、その範囲を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】図1は、抗ヒト I L - 2 結合を示す。B 細胞ハイブリドーマ融合後に得られる B 細胞クローンの上清を、予めヒト I L - 2 で被覆したプレートへ添加した。該抗ヒト I L - 2 m A b はビオチン化抗マウス I g G 抗体を用いて検出した。

【図2】図2は、推定される特異的ヒト I L - 2 エピトープへ結合する抗ヒト I L - 2 m A b のスクリーニングを示す。プレートは 5344 (ここで標的とした超作用薬 (superagonistic) 挙動がない h I L - 2 m A b) で被覆してブロックし、続いてヒト I L - 2 を添加して、5344 へ該サイトカインを結合させ、I L - 2 の特異的エピ

10

20

30

40

50

トープで覆った。次いで第一スクリーニング（図 1）で陽性シグナルを与える該上清を加えた。上清中の m A b を I L - 2 - 5 3 4 4 複合体へ結合させた後、試験した上清の m A b が、同じ領域（いわゆる「競合」）又は M A B 6 0 2 とは異なる領域に結合するかどうかを評価するためにビオチン化 M A B 6 0 2 抗体をプレートに添加した。該競合 m A b は M A B 6 0 2 単独で得られる吸光度より 2 倍低い吸光度（O D 4 5 0）を示した（H 1 1 に示すように、この場合 O D = 1 . 1）

【図 3】図 3 は、B 細胞ハイブリドーマの濃度依存的競合を示す。第一スクリーニングの 8 つの競合 B 細胞ハイブリドーマクローンの上清（図 2 参照）を本検定で使用する前に増殖させ、濃縮した。これらの 8 つの競合 B 細胞ハイブリドーマクローン（1 ~ 8 とラベルした）の上清を添加して増量した。コンピテント競合 B 細胞ハイブリドーマクローンは、クローン 1 及び 2 で明らかであるように、M A B 6 0 2 と同等かそれ以上に O D 4 5 0 を減少させた。異なる濃度の M A B 6 0 2（緑のオープンサークル）はコントロールとして供給した。

10

【図 4】図 4 は、C D 8 + T 細胞のインビボ増殖を示す。C D 4 5 . 1 コンジェニック I L - 7 トランスジェニックマウスのカルボキシフルオレセインコハク酸エステル（C F S E）標識 C D 8 + T 細胞を、C D 4 5 . 2 コンジェニック W T レシピエントマウスへ移植し、次いで、リン酸緩衝生理食塩水、I L - 2、I L - 2 と M A B 6 0 2（I L - 2 / M A B 6 0 2）、I L - 2 と 5 3 4 4（I L - 2 / 5 3 4 4）、I L - 2 とハイブリドーマ 1（I L - 2 / H y b # 1）、又は I L - 2 とハイブリドーマ 2（I L - 2 / H y b # 2）を 4 日間毎日注射投与した。5 日目にリンパ節及び脾臓のドナー C D 4 5 . 1 + C D 8 + T 細胞の C F S E の性質について分析した。リンパ節で得られた結果を示している。同様の結果が脾臓でも得られた。

20

【図 5】図 5 は、I L - 2 とハイブリドーマ 1 及び 2 を用いてインビボ処置後の内在性 C D 8 + T 細胞及び N K 細胞の表現型特性を示す。マウスは図 4 に示す様に処置し、次いでリンパ節及び脾臓の内在性 C D 8 + 部分集合体及び N K 細胞をフローサイトメトリーで評価した。（A）全リンパ球の C D 8 対 C D 3 のプロファイル（左のグラフ）及び C D 3 + C D 8 + リンパ節細胞の C D 4 4（活性化又は記憶 T 細胞）対 C D 1 2 2（活性化又は記憶 T 細胞上に存在する I L - 2 受容体 サブユニット）のプロファイル、又は（B）示された処置を受けたマウスの N K 1 . 1 対 C D 3 のプロファイルを示す。活性化 / 記憶 C D 8 + T 細胞は C D 4 4 については高く、かつ C D 1 2 2 については中から高である。N K 細胞は C D 3 が陰性であり、N K 1 . 1 は陽性である。脾臓細胞を用いても類似の結果が得られた。

30

【図 6】図 6 は、リンパ節及び脾臓の活性化 / 記憶 C D 8 + T 細胞及び N K 細胞の全細胞数を示す。実験で用いた動物は図 5 に示す様に処置し、分析した。リンパ節（上のパネル）と脾臓（下のパネル）の C D 4 4 高 C D 8 + T 細胞（いわゆる記憶表現型 M P C D 8 +）及び C D 3 + 陰性 N K 1 . 1 + N K 細胞の絶対細胞数を示す。

【図 7】図 7 は、購入可能なモノクローナル抗体（M A B 6 0 2）（左のグラフ）及び本発明の主題であるモノクローナル抗体 N A R A 1（右のグラフ）のヒト I L - 2 に対する表面プラズモン共鳴結合曲線を示す。この実験には、アミン結合 G L M チップを用いた。該チップのカルボン酸基の活性化は、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（0 . 2 M E D C）とスルホ N - ヒドロキシスルホスクシンイミド（0 . 0 5 M s _ N H S）の混合物を 3 0 m L / 分、4 2 0 秒間使用して行った。該抗体 N A R A 1 及び M A B 6 0 2 を、酢酸ナトリウム緩衝液（1 0 m M p H 4 . 5）の 1 0 0 m g / m L 溶液でチップに被覆した。次いでエタノールアミン塩酸を 3 0 m L / 分で 3 0 0 秒間添加して不活性化した。最後にヒト I L - 2 を異なる濃度（1 0 0 n M で開始し、続いて三倍希釈）で 1 0 0 m L / 分で添加し、6 0 0 秒会合し、そして 2 4 0 秒解離させた。

40

【図 8】図 8 は、モノクローナル抗体 N A R A 1 へ結合した I L - 2 と、I L - 2 受容体サブユニット C D 2 5（ここでは C D 2 5 - F c の F c 融合体として使用した）、C D 1 2 2、モノクローナル抗体 M A B 6 0 2、又は N A R A 1 及び M A B 6 0 2 と異なるヒト

50

IL-2 エピトープへ結合する抗 IL-2 抗体との、表面プラズモン共鳴結合曲線を示す。NARA1 及び MAB602 で被覆した図 7 に記載した該チップを再利用した。該チップの再生は 10 mM グリシンを用いて、pH 2.5、30 mL / 分、60 秒で行った。ヒト IL-2 は飽和濃度 (1 mM) で 100 mL / 分で添加し、120 秒会合し、0 秒解離した。抗体への IL-2 の会合後直ちに第 2 の分析物を 100 mL / 分で添加し、120 秒会合し及び 240 秒解離した。交差結合に使用した濃度は、MAB602 : 50 nM ; NARA1 : 50 nM ; 陽性参照 : 50 nM ; CD25-Fc : 500 nM ; CD122 : 138 nM であった。hIL-2 を NARA1 へ結合するとき、異なる hIL-2 エピトープ (ここでは「陽性参照」と称する) を認識する抗 hIL-2 抗体は期待通りに hIL-2 / NARA1 複合体へ強力に結合する (図 8 の緑の線) が、しかし、IL-2 R (CD122) は hIL-2 が NARA1 へ既に結合しているとき、hIL-2 へ結合しない (図 8 のオレンジの線)。

10

【図 9】図 9 は、モノクローナル抗体 MAB602 (上のグラフ) 及び NARA1 のマウス IL-2 への表面プラズモン共鳴結合曲線を示す。図 7 及び 8 のデータ作成に使用した同一のチップを再利用した。該チップの再生は 10 mM グリシン、pH 2.5、30 mL / 分、60 秒で行った。測定はマウス IL-2 (mIL-2) 又はヒト IL-2 (hIL-2) の濃度を 10 nM から開始して、そして 3 倍希釈し、その溶液を 100 mL / 分で注入し、120 秒間会合し、5 と 240 秒解離した。上のグラフに MAB602 のマウス IL-2 への結合による交差反応性を示した。特に、マウスインターロイキン-2 の濃度を高くすると (> 1 nM)、10 を上回る応答単位 10 (RU) で、該結合曲線はバックグラウンドレベルから著しく異なる。一方、NARA1 (下のグラフ) は試験した全濃度でマウス IL-2 への交差反応性を示さない。

20

【図 10】図 10 は、実施例 1 で得られたプロロイキン / Fab-NARA1 複合体の三次元構造の概要を示す。

【図 11】図 11 は、エピトープ残基のさらなる分析を示す。X 軸は配列番号 1 に記載のアミノ酸配列とその番号を列挙している。Y 軸の上部はプロロイキン由来に対応する残基から 4 以内にある NARA1-Fab の原子の総数を示しており、Y 軸の下部は NARA1-Fab への結合の結果としてプロロイキン由来に対応する残基の溶媒接近可能領域 (\AA^2) の減少を示す。

【図 12】図 12 は、NARA1-Fab によって認識される最も重要なエピトープ残基を示す。

30

【図 13】図 13 は、プロロイキン / NARA1-Fab 複合体と IL-2 / CD25 / CD122 / CD132 四次複合体の重ね合わせを示す。

【図 14】図 14 は、IL-2_{C145A} (PDB : 3INK)、スーパーカイン (PDB : 3QB1)、IL-2 / CD25 / CD122 / CD132 (PDB : 2B5I) 及びプロロイキン / NARA1-Fab 由来の C ヘリックスの重ね合わせを示す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

定義

「ヒトインターロイキン-2」又は「hIL-2」は UniProt ID P60568 で示されたタンパク質を意味し、配列番号 1 として再現される。

40

【0034】

本明細書の文脈中の同一性とは、位置ごとの配列比較位置の結果を示している単一の定量的パラメータである。配列比較の方法は当該分野で公知であり、公に利用可能な BLAST アルゴリズムが例として挙げられる。そのような核酸配列の比較の一つの例として、デフォルト設定を使用した BLASTN アルゴリズムがある：期待閾値：10；文字サイズ：28；クエリ範囲中の最大一致：0；マッチ/ミスマッチスコア：1，-2；ギャップコスト：リニア。他の測定変数がない場合、同一性は上記仕様に従って測定される。

【0035】

本明細書の文脈において、抗体という用語は細胞生物学及び免疫学の分野で知られている

50

その意味で使用される；それは全抗体、任意の抗原結合フラグメント又はその1本鎖及び関連又は由来する構造物を指す。全抗体はジスルフィド結合によって相互結合する少なくとも2つの重(H)鎖とふたつの軽(L)鎖を含む糖タンパク質である。それぞれの重鎖は重鎖可変領域(V_H)と重鎖定常領域(C_H)を含む。該重鎖定常領域は C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} の3つのドメインを有する。それぞれの軽鎖は軽鎖可変領域(ここでは V_L と略す)と軽鎖定常領域(C_L)を含む。該軽鎖定常領域は一つのドメイン、 C_L を含む。該 V_H 及び V_L 領域は、相補性決定領域20(CDR)とよばれる超可変領域にさらに細分され、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散在する。それぞれの V_H と V_L はアミノ末端からカルボキシ末端へ $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ の順で配置された3つの CDR と4つの FR を有する。重鎖と軽鎖の可変領域には抗原と相互作用する結合領域が含まれる。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えばエフェクター細胞)及び古典的な補体系の第一成分を含む、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を仲介し得る。

10

【0036】

本明細書の文脈中において、抗原結合タンパク質又は抗原結合フラグメントという用語は細胞生物学及び免疫学の分野において知られているその意味で使用される；所与の抗原(例えばインターロイキン-2)へ特異的に結合する能力を保持する無処置の抗体の一つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は無処置の抗体のフラグメントによって行うことができる。抗原結合部分又は抗体の抗原結合フラグメントという用語に包含される結合フラグメントの例として、 V_L 、 V_H 、 C_L 及び C_H ドメインから成る一価のフラグメントであるFabフラグメント；ヒンジ部分をジスルフィド架橋によって連結した2つのFabフラグメントを有する二価のフラグメントである $F(ab)_2$ フラグメント； V_H 及び C_H ドメインから成るFdフラグメント；抗体の単一アームの V_L 及び V_H ドメインからなるFvフラグメント； V_H ドメイン又は V_L ドメインから構成される単一ドメイン抗体(dAb)フラグメント；並びに単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。 $HCDR$ は重鎖の CDR を意味し、 $LCDR$ は軽鎖の CDR を意味する。

20

【0037】

本明細書の文脈中において、キメラ抗体という用語は細胞生物学及び免疫学の分野において知られているその意味で使用される；それは、定常領域又はその一部を改変、置換又は交換した抗体分子であり、抗原結合部位(可変領域)を、異なる若しくは改変されたクラス、エフェクター機能及び/又は種の定常領域、又はキメラ抗体に新しい特性を与える全く異なる分子、例えば酵素、サイトカイン、毒、ホルモン、成長因子、薬物などと結合した抗体を指す。例えば抗体は定常領域をサイトカインに置換して改変してもよい。サイトカインと置換することで、該キメラ分子は抗原認識における特異性も保持することができ、一方で元のサイトカイン分子の機能又はその一部もまた有する。

30

【0038】

本明細書の文脈中において、ハイブリドーマという用語は細胞生物学及び免疫学の分野において知られているその意味で使用される；それは特定の抗体を産生するB細胞と骨髄腫(B細胞癌)との融合によって作製した混成細胞を指す。ハイブリドーマ細胞は組織培養で育ち、単一特異性の抗体(モノクローナル抗体)を産生することができる。

40

【0039】

本明細書の文脈中において、単一鎖可変フラグメント(scFv)という用語は細胞生物学及び免疫学の分野において知られているその意味で使用される；それは10から約25アミノ酸の短リンカーペプチドで連結している、免疫グロブリンの重鎖可変領域(V_H)及び軽鎖可変領域(V_L)の融合タンパク質を指す。該scFvは定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。

【0040】

本明細書の文脈中において、抗原結合フラグメント(Fab)という用語は細胞生物学及び免疫学の分野において知られているその意味で使用される；それは抗原へ結合する抗体上の領域を指す。それは免疫グロブリンの重鎖(V_H)と軽鎖(V_L)のそれぞれの一つ

50

の定常ドメイン及び一つの可変ドメインを有する。これらのドメインはそのモノマーのアミノ末端で抗原結合部位を形成する。

【 0 0 4 1 】

本明細書の文脈中において、解離定数 (K_D) という用語は化学及び物理学の分野において知られているその意味で使用される。それは、複合体がその構成成分へ分解する時のように、大きな物体がより小さな構成成分へ可逆的に分解する傾向を測定する平衡定数を指す。 K_D はモル単位 [M] で表され、[A g] の結合部位の半分を占める [A b] の濃度に応答する。言い換えれば、非結合 [A b] の濃度と [A b A g] 複合体の濃度は等しい。その解離定数は以下の式に従って算出される。

【 0 0 4 2 】

【数 1】

$$K_D = \frac{[Ab] * [Ag]}{[AbAg]}$$

[A b] : 抗体の濃度 ; [A g] : 抗原の濃度 ; [A b A g] : 抗原抗体複合体の濃度

【 0 0 4 3 】

本明細書の文脈中において、解離速度 (K_{off} ; [1 / s e c]) 及び結合速度 (K_{on} ; [1 / s e c * M]) という用語は化学及び物理学の分野において知られているその意味で使用される。それらは抗体とその標的の抗原との解離 (K_{off}) 又は結合 (K_{on}) を測定する速度定数を指す。 K_{off} 及び K_{on} は当該分野で十分に確立された方法を用いて実験的に決定される。抗体の K_{off} 及び K_{on} の決定方法は表面プラズモン共鳴を用いる。これは B i a c o r e (商標登録) 又は P r o t e O n (商標登録) システムのようなバイオセンサーの基本となる原理である。それらはまた以下の式を用いて解離定数 K_D を決定することができる。

【 0 0 4 4 】

【数 2】

$$K_D = \frac{[K_{off}]}{[K_{on}]}$$

【 0 0 4 5 】

本明細書の文脈において、ヒト化抗体という用語は細胞生物学及び生化学の分野において知られているその意味で使用される。それは、非ヒト種の免疫細胞によって産生される抗体であり、そのタンパク質配列はヒトの中で自然に産生される抗体変異体との類似性を高めるように改変されている。

【 0 0 4 6 】

本明細書の文脈において、測定可能な交差反応性がないという用語は、他の種からのオルソログタンパク質を認識し、結合する抗体の能力が欠如していることを指す。例えば、適切な条件下で、抗体のマウスインターロイキン - 2 への結合が、表面プラズモン共鳴の様な感受性の高い測定方法で検出できない場合、ヒトインターロイキン - 2 に対する該抗体はマウスインターロイキン - 2 に対する測定可能な交差反応性を有さない。測定可能な交差反応性がない一つの例として図 9 中の下のパネルの抗体に示す (N A R A 1)。

【 0 0 4 7 】

ここで使用される「h I L - 2 h へ特異的に結合」する抗体又はタンパク質とは、1 0 0 n M 以下、1 0 n M 以下、1 n M 以下、1 0 0 p M 以下又は 1 0 p M 以下の K_D でヒト I L - 2 ポリペプチドへ結合する抗体又はタンパク質を指す。「ヒト I L - 2 以外の抗原と

10

20

30

40

50

交差反応する」抗体とは10 nM以下、1 nM以下又は100 pM以下の K_D でその抗原へ結合する抗体を指す。「特定の抗原と交差反応しない」抗体とは100 nM以上、1 μ M以上、10 μ M以上の K_D でその抗原に結合する抗体を指す。特定の実施態様では、抗原と交差反応しないそのような抗体は標準的な結合検定においてこれらのタンパク質に対して本質的に結合は検出されない。

【0048】

「エピトープ」という用語は抗体へ特異的に結合できるタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸や糖側鎖といった分子の化学的活性表面群から構成され、かつ通常は特異的な電荷特性だけでなく、特異的な三次元構造特性を有する。立体配座及び非立体配座エピトープは、変性溶媒存在下で後者ではなく前者への結合が失われることで区別される。

10

【0049】

「エピトープ結合ドメイン」又は「EBD」という用語は、結合分子の部分（例えば抗体若しくはエピトープ結合フラグメント又はその誘導体）を指し、それは特異的に標的エピトープの結合部位へ（例えば結合、立体障害、安定化/不安定化、空間分布によって）相互作用する。EBDはまた、IL-2エピトープへ特異的に（例えば結合、立体障害、安定化/不安定化、空間分布によって）相互作用し、シグナル伝達を阻害することができる能力を保持する抗体の一つ以上のフラグメントを指す。抗体フラグメントの例として、 V_L 、 V_H 、 C_L 及び C_H1 で構成される一価フラグメントであるFabフラグメント、scFv；ヒンジ部分をジスルフィド架橋で連結した2つのFabフラグメントを有する二価フラグメントである $F(ab)_2$ フラグメント； V_H 及び C_H1 ドメインで構成されるFdフラグメント；抗体の単一アームの V_L 及び V_H で構成されるFvフラグメント； V_H ドメインで構成されるdAbフラグメント（Wardら、(1989) Nature 341: 544 - 546）；並びに単離された相補性決定領域（CDR）が含まれるがこれに限定されない。

20

【0050】

EBDはまた、当該分野で公知の単一ドメイン抗体、マキシボディ（maxibodies）、ユニボディ（unibodies）、ミニボディ（minibodies）、トリアボディ（triabodies）、テトラボディ（tetraabodies）、v-NAR及びビス-scFv（Hollinger、及びHudson、(2005) Nature Biotechnology 23: 1126 - 1136 参照）、二重特性単一鎖ジアボディ又は二つの異なるエピトープに結合するように設計された単一鎖ジアボディが含まれる。EBDはまた抗体様分子又は抗体擬態物も含まれ、これに限定されないが、ミニボディ、マキシボディ（maxibodies）、Fn3に基づくタンパク質足場、アンクリンリピート（Ankrin repeat）（DARPinとして知られる）、VASPポリペプチド、鳥類隣ポリペプチド（aPP）、テトラネクチン、アフィリン、ノッチン、SH3ドメイン、PDZドメイン、テンダミスタット、ネオカージノイステイン、タンパク質Aドメイン、リポカリン、トランスフェリン及びエピトープに特異的に結合するクニツドドメインが含まれ、それらは本発明の範囲内にある。抗体フラグメントはフィブロネクチン3型（Fn3）のようなポリペプチドに基づく足場へ移植することができる。（U.S. Pat. No. 6,703,199、which describes fibronectin polypeptide monobodies 参照）

30

40

【0051】

本発明はまた単離された抗体であるヒトIL-2への抗体も含む。

【0052】

ここでいう「単離された抗体」という語句は、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（例えば、hIL-2へ特異的に結合する単離された抗体は、hIL-2以外の抗原へ特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかし、hIL-2へ特異的に結合する単離された抗体は、他の種由来のIL-2分子といった他の抗原への交差反応性を有するかもしれない。さらに単離された抗体は実質的に他の細胞物質及び/又は化学物

50

質を実質的に含まなくてもよい。

【0053】

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」又は「配列をコードするヌクレオチド」という用語は、相互交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド、又はそれらの誘導体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは任意の三次元構造を有し、任意の機能を実行することができる。以下にポリヌクレオチドの例を示すがこれに限定されない：遺伝子又は遺伝子フラグメント（例えばプローブ、プライマー、EST又はSAGEタグ）、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、ブランチポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、siRNAs、shRNAs、RNAi試薬及びプライマー。ポリヌクレオチドは、一つ以上の塩基、糖及び/又はリン酸を、ここで記載する又は当該分野で知られる様々な修飾又は置換のいずれかで修飾又は置換してもよい。ポリヌクレオチドはメチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド誘導体のような修飾したヌクレオチドを含んでもよい。ヌクレオチド構造への修飾はポリマーの構築前又は後にしてもよい。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分によって中断してもよい。ポリヌクレオチドは重合の後、さらにラベル化成分を結合するような修飾をしてもよい。該用語は二本鎖及び一本鎖分子の両方を指す。指定するか必要でない限り、本発明のどの実施態様も、ポリヌクレオチドは、二本鎖形態及び、二本鎖形態を形成すると知られる又は予想されるそれぞれの二本の相補的一本鎖形態を有する。

【0054】

ポリペプチドという用語は「タンパク質」という用語と相互交換可能に使用され、その最も広い意味で、2つ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸誘導体、ペプチド模倣体の化合物を指す。該サブユニットはペプチド結合によって連結してもよい。他の実施態様では、該サブユニットは他の結合、例えばエステル、エーテルなどによって連結してもよい。

【0055】

ここで使用されるいずれかの疾患又は障害（例えば癌）の「治療する」又は「治療」という用語は一つの実施態様では、疾病又は障害を改善すること（例えば、疾患の進行若しくは少なくとも臨床症状の一つを遅延若しくは停止又は縮小すること）を指す。別の実施態様では、「治療する」又は「治療」という用語は、患者によって認識できないものをも含む少なくとも一つの物理パラメータを緩和又は改善することを指す。さらに別の実施態様では、「治療する」又は「治療」という用語は、物理的に（例えば、認識可能な症状の安定化）、生理学的に（例えば、物理パラメータの安定化）のいずれか又は両方で疾患又は障害を調節することを指す。以下に特に記載しない限り、疾病の治療及び/又は予防の評価方法は当該分野において一般的に知られている方法である。

【0056】

発明の詳細な説明

これまでは、開示した発明に適したモノクローナル抗体は入手出来なかった。本発明者らは臨床応用におけるこの技術の使用と商業化に向けて以下の重要な工程を許容するそれらの抗ヒトIL-2抗体mAbを開示する：

- ・抗ヒトIL-2 mAbのさらなる配列と詳細な特徴付け
- ・患者の免疫原性を回避する（又は最小にする）ために必要不可欠な、抗ヒトIL-2 mAbのヒト化
- ・IgG、IgG1、IgG4、Fab、及び単一鎖Fv（scFv）のようなヒトIL-2 mAbの異なる構成の作製
- ・ヒトIL-2及び抗ヒトIL-2 mAb（又は抗ヒトIL-2 mAbのフラグメント）で構成される融合タンパク質の作製：そのような構成物は、IL-2が抗ヒトIL-2 mAbへ結合する際に、二つではなく一つの成分だけで構成されるという利点を有する。

【0057】

本発明者は、ヒトIL-2へ結合でき、マウスにおけるテストの際に、CD8⁺T細胞及

びナチュラルキラー（NK）細胞を含む細胞傷害性リンパ球へ特異的で強力に刺激することができる特異的な抗ヒトIL-2 mAbを産生し、特徴付けた。これらの目的のために、様々な困難を克服しなくてはならなかった。

【0058】

・ヒトIL-2はマウス及びラットIL-2と高い類似性を示す。ゆえにヒトIL-2はインビトロ及びインビボでマウスのリンパ球を刺激することができる。さらにIL-2は、原発性免疫器官（例えば骨髄）において高濃度で存在し、それは、IL-2が多少なりとも「禁じられた」抗原である理由であり、IL-2に対して中和する抗体に応答するB細胞を産生するのが非常に困難であることを意味する。それにもかかわらず、本発明者らは精製組み換えヒトIL-2抗体と補助剤を用いてC57BL/6マウスを免疫化後、ポリクローナル抗ヒトIL-2抗体応答を誘発することができた。

10

【0059】

・産生した抗体応答で、いくつかのmAbのみが効率的に結合し（いわゆる「結合剤」）、そしてそれらの約0.35%のみが推定するIL-2の活性部位と相互作用した。

【0060】

・最後に、これらの抗ヒトIL-2 mAbのうちのいくつかは、インビトロ実験には置き換えることができないマウスの特殊なインビボアッセイの評価で必要な特異的かつ強力なインビボ活性を示した。

【0061】

本発明者は、免疫化した動物の血清中及びB細胞ハイブリドーマ融合後に得られるB細胞クローンの上清中で特異的抗ヒトIL-2抗体（いわゆる「結合剤」）を検出できる特異的スクリーニングアッセイを開発した。第二の工程では、標準の結合剤とヒトIL-2分子の推定される特異的エピトープを標的とするものとを区別した。異なるB細胞クローンを用いて行ったそのようなインビトロ酵素結合免疫吸着法（ELISA）の一例を図1～3に示す。

20

【0062】

抗ヒトIL-2 mAbのインビトロスクリーニング後、これらのmAbをインビボで特性を決定した。この目的のため及び十分なmAbの量を得るために、mAbをハイブリドーマの上清から濃縮し、該量はELISAを用いて推測し、最後に抗ヒトIL-2 mAbをマウス中で試験した。CD8⁺T細胞及びNK細胞の増殖および拡大における結果を図4～6に示す。

30

【0063】

抗ヒトIL-2 mAbの結合特性を特徴付けるために、ヒトインターロイキン-2への結合を表面プラズモン共鳴結合アッセイによって試験した。商業的に利用可能なヒトIL-2 mAb MAB602を比較対象として測定した。図7に様々な濃度におけるヒトインターロイキン-2へのMAB602（左のグラフ）及びNARA1（本発明に記載の抗体；右のグラフ）の結合曲線を示す。MAB602及びNARA1について測定したK_{on}及びK_{off}並びに解離定数（K_D）を表1に示す。

【0064】

【表1】

40

表 1

	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)
MAB602	5.8 x 10 ⁴	4.94 x 10 ⁻⁴	9.7
NARA1	1.78 x 10 ⁴	2.08 x 10 ⁻⁵	1.2

表1 ヒトIL-2への抗ヒトIL-2 mAbの結合特性

【実施例】

50

【 0 0 6 5 】

本発明の抗体は、配列番号 5 に記載の全長重鎖及び配列番号 6 に記載の全長軽鎖アミノ酸配列によって得られ、単離され、構造的に特徴付けられた抗体 N A R A 1 を含む。

【 0 0 6 6 】

対応する可変領域である N A R A 1 の V H 及び V L アミノ酸配列は、配列番号 1 9 (可変重鎖) 及び配列番号 2 0 (可変軽鎖) である。

【 0 0 6 7 】

N A R A 1 の全長軽鎖及び重鎖をコードするヌクレオチド配列は配列番号 3 (リーダー配列を含む重鎖コード配列) 及び配列番号 4 (リーダー配列を含む軽鎖コード配列) 。

【 0 0 6 8 】

N A R A 1 の可変軽鎖及び可変重鎖をコードするヌクレオチド配列は配列番号 2 1 (可変重鎖コード配列) 及び配列番号 2 2 (可変軽鎖コード配列) である。

【 0 0 6 9 】

N A R A 1 の C D R 領域は K a b a t システムを用いて描写している (K a b a t 、 E . A . ら 1 9 9 1 、 S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t 、 F i f t h E d i t i o n 、 U . S . D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s 、 N I H P u b l i c a t i o n N o . 9 1 - 3 2 4 2 、 s e e a l s o Z h a o & L u 2 0 0 9 、 M o l e c u l a r I m m u n o l o g y 4 7 : 6 9 4 - 7 0 0) 。 分かり易くするために、C D R 領域が K a b a t 定義に従って描写されているとき、以後それらは個々に H C D R 1 、 H C D R 2 、 H C D R 3 、 L C D R 1 、 L C D R 2 、 L C D R 3 と呼ぶ。 N A R A 1 の C D R 領域は：配列番号 7 に記載の H C D R 1 、配列番号 8 に記載の H C D R 2 、配列番号 9 に記載の H C D R 3 、配列番号 1 0 に記載の L C D R 1 、配列番号 1 1 に記載の L C D R 2 、配列番号 1 2 に記載の L C D R 3 である。

【 0 0 7 0 】

N A R A 1 の C D R 領域をコードするヌクレオチド配列は：配列番号 1 3 に記載の H C D R 1 コード配列、配列番号 1 4 に記載の H C D R 2 コード配列、配列番号 1 5 に記載の H C D R 3 コード配列、配列番号 1 6 に記載の L C D R 1 コード配列、配列番号 1 7 に記載の L C D R 2 コード配列、配列番号 1 8 に記載の L C D R 3 コード配列である。

【 0 0 7 1 】

融合タンパク質もまた配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 に従って提供される。配列番号 2 3 は、G x S リンカーを介して h I L - 2 の C 末端へ、N 末端を融合させた N A R A 1 の可変重鎖を含む融合タンパク質である。配列番号 2 4 は G x S リンカーを介して h I L - 2 の C 末端へ、N 末端を結合させた N A R A 1 の可変軽鎖を含む融合タンパク質である。

【 0 0 7 2 】

(a) 実施例 1 . N A R A 1 の結晶構造

(i) 材料及び方法

抗体「N A R A 1」の F a b フラグメント (配列番号 5 及び 6) へ結合したヒトインターロイキン 2 変異体 (配列番号 2) (「プロロイキン (P r o l e u k i n) 」と呼ぶ) の複合体の構造を決定した。結果として得られたプロロイキンの残基の番号付けは w t I L - 2 の番号付けに従って与えられる。

【 0 0 7 3 】

以下に詳細を記述する、プロロイキンと w t I L - 2 との間の配列の相違は無関係であり、プロロイキンは h I L - 2 の構造解析のための妥当性のあるモデルである。

【 0 0 7 4 】

エピトープを決定するために、X 線結晶学を使用して前述の複合体の原子分解構造を解析した。X 線結晶学は、抗体及びそれらと抗原との複合体を含む生体分子の構造データを作製するのに日常的に広く使用されている技術である (A d m s ら、(2 0 1 3) A n n u a l R e v i e w B i o p h y s i c s 4 2 : 2 6 5 - 2 8 7 ; G a r m a n 、(2 0 1 4) S c i e n c e 3 4 3 : 1 1 0 2 - 1 1 0 8 ; J o a c h i m i a k 、

10

20

30

40

50

(2009) Current Opinion Structural Biology 19:573-584.)。

【0075】

抗原、プロロイキンは賦形剤（プロロイキン1mgごとに約50mgのマニトール、0.18mgのドデシル硫酸ナトリウム、0.173mgリン酸二水素ナトリウム、及び0.89mgリン酸水素二ナトリウムと混合されている）と一緒に凍結乾燥粉末として販売されている。その複合体形成で使用する前に、プロロイキンを逆相HPLCで精製し、該賦形剤を除去した。

【0076】

NARA1のFabフラグメント（NARA1-Fab）は全長抗体をパパイン切断し、
10
プロテインAクロマトグラフィによって作製した。簡潔には6.5mLの全長NARA1（90mMの塩酸を含むpH7.0の50mMクエン酸緩衝液中9mg/mL）を5mM DTT及び590µgパパイン（ロッシュ）と混合した。切断反応は室温で16時間維持し、56mM E64溶液（ロッシュ）を15µL添加して反応を停止した。該切断溶液を、25mM トリス、25mM NaCl、pH8.0の溶液で10倍希釈し、そして25mM トリス、25mM NaCl、pH8.0の溶液によって5カラム容積で平衡化した5mLプロテインAカラム（GEヘルスケア）へ、その溶液をロードした。そしてFabフラグメントはローディングスルー分画で得られ、FcフラグメントはプロテインAカラムに結合させて得た。

【0077】

20
複合体を形成するために、HPLC後のプロロイキン粉末は5.5mg/mLの濃度でH₂Oに溶解した。過剰量である6.6mgのプロロイキンを11.5mgのNARA1 Fabフラグメント溶液に滴下した。遠心分離法を用いて現行の条件下で沈殿している過剰のプロロイキンを除去した。該複合体は、25mM トリス、25mM NaCl、pH7.4のランニングバッファーで、セファデックス200 10×300（GEヘルスケア）を用いたゲル濾過によって精製した。

【0078】

30
ゲル濾過後のプロロイキン/NARA1-Fab複合体は14mg/mLに濃縮し、シッピングドロップとして、蒸気拡散法によってスクリーニングした。該タンパク質溶液は1:1でリザーバ緩衝液と混合し、総容量0.4µLとした。該実験はPhoenix robotic system（Art Robbins Instruments）で行い、19でロックイメージャーホテル（RockImager hotel）（Formulatrix）に保存し、自動で画像化した。20%w/vポリエチレングリコール3350及び0.2M 硝酸ナトリウムの条件下でスクリーニングの4日後に結晶を収集した。結晶は10%グリセロールを含むリザーバ緩衝液で低温保護し、データ収集の前に液体窒素で急速凍結した。Pilatus画素検出器がついたビームラインPX-I IでSwiss光源（ピリゲン、スイス）の0.99998のX線放射波長を用いて、回折データを収集した。

【0079】

40
データセットはXDS及びXSCALE（2010年12月6日版）で処理し、構造は、IL-2の検索モデルとしてタンパク質データバンクエントリ「3INK」を用いて及びFabフラグメントの検索モデルとしてタンパク質データバンクエントリ「3TTI」を用いて、プログラムPHASERを用いた分子置換法で解析した。反復モデルの構築及び改良は、プログラムCoot（Crystallographic Object-Oriented Toolkit）及びAUTOBUSTER（Bricogneら、2011）で行った。全ての図はプログラムPyMOL（Molecular Graphics System; DeLano Scientific: Palo Alto, CA; <http://www.pymol.org>）で作製した。

【0080】

50
エピトープ残基は、NARA1のFabの任意の原子から4以内のプロロイキン由来の

残基として決定し、CCP4プログラムCONTACT及びAREAIMOL (Collaborative Computational Project、Number 4、version 6.4.0)で確認した。類似のパラトープ残基はプロロイキンの任意の原子から4 以内のNARA1のFabフラグメント残基として決定した。

【0081】

(ii) 結果

プロロイキン/NARA1-Fab複合体は、単位格子容積 $a = 201.8$ 、 $b = 36.2$ 、 $c = 88.7$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 102.9^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ で、空間グループC121中の1.95で解析した。詳細な構造統計は表2を参照する。各非対称単位には一つの複合体分子が存在する。

10

【0082】

【表2】

表 2. プロロイキン/NARA1-Fab 複合体の構造統計

収集データ	
空間グループ	C121
セル寸法	
a, b, c (Å)	201.757, 36.233, 88.707
a, b, γ (°)	90, 102.93, 90
分解能 (Å)	58.74-1.95
R_{merge}	0.066 (0.472)
$I/\sigma I$	14.18 (2.59)
完全性 (%)	84.8(96)
冗長性	3.19
洗練	
分解能 (Å)	58.74-1.95
反射番号	34750
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.2052/0.2872
ラムチャンドランプロット	
許容から外れた	0.0162
許容される	0.0378
好ましい	0.9459
R.m.s. 偏差	
結合距離 (Å)	0.01
結合角度 (°)	1.7

30

40

【0083】

1) エピトープ及びパラトープ分析

50

図 10 は、実験 1 で得られたプロロイキン / F a b - N A R A 1 複合体の三次元構造の概要を示す。N A R A 1 の F a b フラグメントの軽鎖を A、N A R A 1 の F a b フラグメントの重鎖を B、N A R A 1 - F a b によって認識されるエピトープ残基を D、及びプロロイキンを C と指定し、かつ変位 C 1 4 5 S をハイライトで表示した。

【 0 0 8 4 】

図 11 は、エピトープ残基のさらなる分析を示す。X 軸は配列番号 1 に記載のアミノ酸配列及び番号付けを列挙する。Y 軸の上部側はプロロイキン由来の対応する残基から 4 以内の N A R A 1 - F b の原子の総数を示し、Y 軸の下部側は N A R A 1 - F a b へ結合後の減少した溶媒接近可能領域 (\AA^2) を示す。

【 0 0 8 5 】

実験 1 で使用したプロロイキンは C 1 4 5 S の変異を有する。図 10 に示す様に C 1 4 5 S はエピトープ領域から離れている。加えて、実施例 1 のプロロイキンと、C D 2 5、C D 1 2 2 及び C D 1 3 2 (P D B : 2 B 5 I) と複合体中の w t h I L - 2 の C 原子との間の、C 原子の重ね合わせは 0 . 4 4 7 の r . m . s . d を示し、それは変異が全ての構造を妨げないことを示唆する。したがって、C 1 4 5 S 変異を有すプロロイキンは w t h I L - 2 の構造分析をするのに妥当なモデルである。

【 0 0 8 6 】

h I L - 2 は 4 - ヘリックスバンドルタンパク質であり、そして 4 ヘリックスは N 末端側から C 末端側にかけてそれぞれに A、B、C 及び D と名付けられている。図 10 に示される N A R A 1 - F a b によって認識される該エピトープは立体配座エピトープであり、図 11 に示すように 2 つの領域にわたる。一つの領域 (N 5 0 - K 6 3) はループ及びショートヘリックスを含み、ヘリックス A と B を連結させ、他方の領域 (N 9 1 - N 9 7) はループを含み、ヘリックス B と C を連結させる。

【 0 0 8 7 】

エピトープ残基は N A R A 1 - F a b 由来の相互作用するパラトープと共に表 3 に要約されている。全てのエピトープの中で、図 11 中に示される A r g 5 8 が、N A R A 1 - F a b との結合に最も重要なエピトープ残基であり、この残基単独で N A R A 1 - F a b 由来の 4 2 の相互作用する原子を有し、N A R A 1 - F a b への結合の結果として、減少させる溶媒接触可能な表面領域の 1 7 . 7 % を占める。さらに、A r g 5 8 は図 12 に示す様に、H C D R 1 の G l u 3 5、及び L C D R 3 の A s p 1 0 0 とそれぞれ強い塩架橋を形成する。A r g 5 8 は、また L C D R 3 の T r y 1 0 0 の芳香族環と 作用相互作用を形成する。K 5 2、P 5 4、K 5 5、T 5 7、T 6 1、F 6 2、K 6 3、Q 9 4 及び K 9 6 の残基も N A R A 1 - F a b への結合に重要であると考えられる。それは、それら全てが、N A R A 1 - F a b 由来の 5 原子がそれ以上と相互作用し、図 11 に示すように溶媒接触可能領域を 3 2 \AA^2 以上減少させるからである。

【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3 エピトープ及びパラトープ概要

軽鎖残基	エピトープ残基	重鎖残基
Y31	N50	
Y31	K52	
Y31	N53	
Y31, Y36, S95, N96	P54	
	K55	W99, G101, G103, Y105
D98	T57	
D98, Y100	R58	L33, E35, W47, W99
	T61	N52, S55, N59
	F62	L33, N52
	K63	S55
	N91	G101, D102, G103
	L92	W99, G101
	A93	G101
	Q94	D102, G103, Y104
D32, D34	K96	Y104
D32	N97	

【 0 0 8 9 】

図 1 2 に N A R A 1 - F a b を認識する最も重要なエピトープとして A r g 5 8 を示す。A はプロロイキンを表し、B は重鎖を表し、かつ C は軽鎖を表す。関係する残基は棒で表している。

【 0 0 9 0 】

2) N A R A 1 - F a b 結合特性

図 1 3 に I L - 2 / C D 2 5 / C D 1 2 2 / C D 1 3 2 の 4 つの複合体とプロロイキン / N A R A 1 - F s b 複合体との重ね合わせを示す。4 つの複合体の構造は P D B エントリ「2 B 5 I」から得られ、その淡いシアン色のイラスト D は w t h I L - 2 を表し、赤色のイラスト B は C D 1 2 2 を表し、青色のイラスト C は C D 1 3 2 を表し、そして緑色の表面 A は C D 2 5 を表す。プロロイキン / N A R A 1 - F a b 複合体の構造において、w t h I L - 2 で重ね合わされたシアン色のイラスト D はプロロイキンを表し、マゼンタ色のイラスト E は重鎖、黄色のイラスト F は軽鎖を表す。

【 0 0 9 1 】

図 1 3 に示される 2 つの複合体の構造の重ね合わせは、N A R A 1 - F a b は C D 2 5 に対して直接競合を形成するが、C D 1 2 2 / C D 1 2 3 に対しては直接競合を形成しないことを明らかに示しており、それは、I L - 2 / N A R A 1 複合体が、p r o - T r e g 細胞の活性よりもむしろ p r o - T エフェクター細胞の活性を主に示すという観測と一致する。

【 0 0 9 2 】

3) 4 つの複合体中のそれと類似した立体構造をとる、N A R A 1 - F a b と複合体を形成しているプロロイキンの C ヘリックス

図 1 4 は、I L - 2 C 1 4 5 A (O D B : 3 I N K)、スーパーカイン (P D B : 3 Q B 1)、I L - 2 / C D 2 5 / C D 1 2 2 / C D 1 3 2 (P D B : 2 B 5 I) 及びプロロイキン / N A R A 1 - F a b 由来の C ヘリックスの重ね合わせを示している。

【 0 0 9 3 】

IL - 2 及び CD 1 2 2 のヘリックス C 間の極性界面は、2 つの部分の間の結合において重要な役割を果たす (Wang ら (2005) Science 310 : 1159 - 1163)。2012 年レビンらは、IL - 2 変異体であるスーパーカイン単独で、4 つの複合体のそれと似た立体構造をとるヘリックス C を有し、スーパーカインは wt IL - 2 より CD 1 2 2 に対する結合親和性が 215 倍以上高いことを示した (Levin ら、(2012) Nature 484 : 529 - 533)。ヘリックス C における立体配座の変化は、立体配座の安定化に関連し、そして CD 1 2 2 への結合のエネルギー損失を減少させることが観測された。図 14 に示すとおり、NARA 1 - Fab との複合体中のプロロイキンのヘリックス C の立体配座もまた、L - 2 / CD 25 / CD 1 2 2 / CD 1 3 2 の 4 つの複合体中と同様にスーパーカイン中に観測されるものと類似しており、それゆえプロロイキン / NARA 1 - Fab 複合体は wt hIL - 2 より CD 1 2 2 に対して高い結合親和性を示す可能性がある。

10

【 0 0 9 4 】

(b) 実施例 2 NARA 1 及び MAB 602 の直鎖ペプチドマッピング

NARA 1 及び MAB 602 抗体のエピトープをマッピングするためにヒト IL - 2 の配列に基づいて 15 残基ペプチドの第一ライブラリーを作製した。選択された 15 残基ペプチドの第二のライブラリーも 3 つの特異的残基 F (62)、Y (65)、L (92) の変異に基づいて作製した。後者の変異は WO 2012 / 107417 A1 の開示されている、これら 3 つの変異を有する Roche / Glycart IL2 変異タンパク質に基づいて行った。研究所ボイマンで行われた以前の研究では (未発表)、A1 と類似の機能を有する市販のマウス抗ヒト IL - 2 mAB 602 は IL - 2 の F42A 変異体 (CD 25 への IL2 結合部位の一つ) への結合を強く減少させることが示された。

20

【 0 0 9 5 】

(i i) 材料と方法

従って、第一のライブラリー中の各ペプチドは 15 コのアミノ酸を有し、そして配列は N 末端から出発して 3 残基進めて目的の配列 (表 4 参照、参照ペプチド 1 から 41) を走査することによって該配列を得られる。したがってラダーが作製され、ラダー中、各ペプチドは前ペプチドと重複する 12 残基を含み、次のペプチドと重複する 12 残基を含む。合計で、発現されたヒト IL - 2 の配列から 41 のペプチドを作製した。

30

【 0 0 9 6 】

ペプチドの第二のライブラリーは、上記の第一ライブラリーの対応する全ペプチド中の F (62)、Y (65) 及び L (92) をアラニンへ変異することによって作製した (表 4 参照、参照ペプチド 42 から 60)。

【 0 0 9 7 】

両方のライブラリーについて、非特異的結合を避けるために、元のシステインをセリンに置き換えている (下線部の残基)。

【 0 0 9 8 】

40

【表 4】

表4 参照ペプチドライブラリ

参照ペプチ ド No.	配列 太字の残基は特定 残基を置換したアラ ニン(A)、 残基はシステインを 置換したセリン(S)
1	APTSSSTKKTQLQLE
2	SSSTKKTQLQLEHLL
3	TKKTQLQLEHLLLDL
4	TQLQLEHLLLDLQMI
5	QLEHLLLDLQMILNG
6	HLLLDLQMILNGINN
7	LDLQMILNGINNYKN
8	QMILNGINNYKNPKL
9	LNGINNYKNPKLTRM
10	INNYKNPKLTRMLTF
11	YKNPKLTRMLTFKFY
12	PKLTRMLTFKFYMPK
13	TRMLTFKFYMPKKAT
14	LTFFKFYMPKKATELK
15	KFYMPKKATELKHLQ
16	MPKKATELKHLQSLE
17	KATELKHLQSLEEEEL
18	ELKHLQSLEEEKPL
19	HLQSLEEEKPLEEV
20	SLEEEKPLEEVLNL
21	EELKPLEEVLNLAQS
22	KPLEEVLNLAQSKNF
23	EEVLNLAQSKNFHLR
24	LNLAQSKNFHLRPRD
25	AQSKNFHLRPRDLIS
26	KNFHLRPRDLISNIN
27	HLRPRDLISNINVIV
28	PRDLISNINVIVLEL
29	LISNINVIVLELKGS
30	NINVIVLELKGETT
31	VIVLELKGETTFMS
32	LELKGETTFMSEYA
33	KGSETTFMSEYADET
34	ETTFMSEYADETATI
35	FMSEYADETATIVEF
36	EYADETATIVEFLNR

10

20

30

40

50

37	DETATIVEFLNRWIT
38	ATIVEFLNRWITFSQ
39	VEFLNRWITFSQSII
40	LNRWITFSQSIISTL
41	NRWITFSQSIISTLT
42	INNYKNPKLTRMLTA
43	YKNPKLTRMLTAKFY
47	YKNPKLTRMLTFKFA
52	YKNPKLTRMLTAKFA
44	PKLTRMLTAKFYMPK
48	PKLTRMLTFKFAMPK
53	PKLTRMLTAKFAMPK
45	TRMLTAKFYMPKKAT
49	TRMLTFKFAMPKKAT
54	TRMLTAKFAMPKKAT
46	LTAKFYMPKKATELK
50	LTFKFAMPKKATELK
55	LTAKFAMPKKATELK
51	KFAMPKKATELKHLQ
56	SLEEEELKPLEEVLNA
57	EELKPLEEVLNAAQS
58	KPLEEVLNAAQSKNF
59	EEVLNAAQSKNFHLR
60	ANLAQSKNFHLRPRD

10

20

【 0 0 9 9 】

両方のペプチドセットをマイクロアレイスライド上に3重でプリントし、目的の抗体（MAB602及びNARA1）及びコントロール抗体をインキュベートした。同じアイソタイプ（マウス対照IgG2a/ 及びマウス対照IgG2a/ ）由来の無関係の抗体及び二次抗体（抗マウスIgG（Thermo 84545、DL650ラベル）又は抗マウスIgG（JIR 115-175-072、Cy5ラベル））を追加でインキュベートした。実験は基本的にMaksimov Pら 2012、PLoS One 7:e34212、doi:10.1371/journal.pone.0034212に記載のとおりに行った。

30

【 0 1 0 0 】

ペプチドマイクロアレイ（3重）を一次抗体とインキュベートした後、一次抗体のFc部分に結合する蛍光標識した二次抗体でインキュベートし、レプリトープ（Repertoire）分析によってペプチド-抗体結合の測定を行った。全ての工程は、高い信頼性と再現性のある洗浄およびインキュベーション工程が可能であるTECANマイクロアレイ処理ステーション上で実施された。インキュベーション工程を行い、次いで最後の洗浄工程（未結合の二次抗体を除去するための）後、該マイクロアレイを窒素流で乾燥させ、適切な波長設定のある高分解能マイクロアレイスキャニングシステムでスキャンした。対照のインキュベーションは偽陽性シグナルを排除するために同じアイソタイプを有する無関係の抗体を用いて行った。

40

【 0 1 0 1 】

得られた画像をスポット認識ソフトウェアジェネピクス（GenePix）（モレキュラーデバイス）を用いて分析し、定量した。各スポットについて、平均シグナル強度を抽出した（0～65535間の任意の単位）。さらなるデータの解析について、MMC2の値を決定した。MMC2はマイクロアレイ上の3つの全ての実測値の平均値に等しい。変動

50

係数（CV）（標準偏差を平均値で割ったもの）が0.5より大きいものを除外し、この場合2つの最も近い値（MC2）の平均値がMMC2に割り当てられる。

【0102】

(ii)結果

データを表5に要約する。

抗IL-2抗体（NARA1）は、固定化ペプチドに対して優位な反応性を示さなかった。ペプチド10のみが弱い応答を示したが、しかしこのペプチドはマウスの対照抗体によっても弱く認識された。市販の抗体MAB602（mlgG2a）はペプチド22～26にいくつかの弱いシグナルを示し、ペプチド10～13にはいくつか強いシグナルを示した。

【0103】

【表5】

表5 線形エピトープマッピングの結果

参照ペプチド No.	配列	コントロールシグナルを 除算後のMAB602 のシグナル強度(AU)	コントロールシグナルを 除算後のNARA1のシ グナル強度(AU)
10	INNYKNPKLTRMLTF	45954	20883
11	YKNPKLTRMLTFKFY	49726	1189
12	PKLTRMLTFKFYMPK	28849	1127
13	TRMLTFKFYMPKKAT	5250	224
22	KPLEEVLNLAQSKNF	4998	0
23	EEVLNLAQSKNFHLR	13287	32
24	LNLAQSKNFHLRPRD	3289	282
25	AQSKNFHLRPRDLIS	5220	0
26	KNFHLRPRDLISNIN	7509	0

【0104】

両方のペプチドセット内の重複配列は、標的抗体に対する結合アミノ酸を含有すると考えられる（表5）。一方の伸長はMAB602に対する強力な結合剤であり、他方はMAB602に対する弱い結合剤である：

【0105】

強い：（57）TRMLTF（62）

弱い：（96）KNF（98）

【0106】

特定の残基F42（62）、Y45（65）、L72（92）に対するAlaの変異は、残基F42（62）が抗体MAB602（表6）への結合にとって明らかに重要な残基であることを示した。

【0107】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6 変異原性の特徴付け

参照ペプチド No.	配列 太字の残基は特定残基を置換した アラニン(A)	コントロールシグナルを 除算後のMAB602の シグナル強度(AU)	コントロールシグナルを 除算後のNARA1のシ グナル強度(AU)
10	INNYKNPKLTRMLTF	45954	20883
42	INNYKNPKLTRML T A	246	162
11	YKNPKLTRMLTFK F Y	49726	1189
43	YKNPKLTRML T AKFY	42784	507
47	YKNPKLTRMLTFK F A	21382	251
52	YKNPKLTRML T AK F A	13089	238
12	PKLTRMLTFKFYMPK	28849	1127
44	PKLTRML T AKFYMPK	5027	432
48	PKLTRMLTFK F AMPK	13394	6205
53	PKLTRML T AK F AMPK	0	24
13	TRMLTFKFYMPKKAT	5250	224
45	TRML T AKFYMPKKAT	0	0
49	TRMLTFK F AMPKKAT	3018	1492
54	TRML T AK F AMPKKAT	0	0

【0108】

配列リスト

本発明を実施するための有用なアミノ酸およびヌクレオチド配列を表7に示す。

【0109】

【表 7】

表7 配列リスト

SEQ ID 番号	Ab 領域	配列
SEQ ID NO: 1	ヒト IL-2	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLT
SEQ ID NO: 2	プロロイキン	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMI LNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
抗体 1		
SEQ ID NO: 3	DNA 重鎖	ATGGAATGGAGCGGAGTCTTTATCTTTCTCCTGTCAG TAACTGCAGGTGTTCACTCCCAGGTCCAGCTGCAGCA GTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTG AAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCTTCACTA ATTACTTGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACA GGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAAGT GGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGG CAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTA CATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCG GTCTATTTCTGTGCAAGATGGAGGGGGGATGGTTACT ACGCGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGT CACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTC TATCCACTGGCCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCT CCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTT CCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGATCC CTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGC AGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGT AACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGC AATGTGGCCCAACCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACA AGAAAAATTGAGCCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTG TCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGT GGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGG ATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATG TGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTC CAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACA CAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAG TACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCAC CAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGG TCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAAC

10

20

30

40

50

		CATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAG GTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTA AGAAACAGGTCACCTCTGACCTGCATGGTCACAGACTT CATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAAC GGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAG TCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAA GCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAAT AGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACA ATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGG TAAATGA
SEQ ID NO: 4	DNA 軽鎖	ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGC TCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTGTGCTGAC CCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAAGTGTG ATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTACCAACA GAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCT GCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACAT CCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTAC TGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTACACGTTCTGGAG GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGC ACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAG TTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGA ACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAA GATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAAC AGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACA GCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTA TGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCAC AAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACA GGAATGAGTGTTAG
SEQ ID NO: 5	重鎖	MEWSGVFI FLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSV KVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGGLEWIGVINPGS GGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSA VYFCARWRGDGYAYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG GPSVFI FPPKIKDVLMLSLSPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNN GKTELNYKNTEPVLSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFRTPGK
SEQ ID NO: 6	軽鎖	METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQ RATISCKASQSDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYA ASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYY CQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN SWTDQDSKDSYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATH KTSTSPIVKSFNRNEC
SEQ ID NO: 7 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 8 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 9 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYAYFDV

10

20

30

40

SEQ ID NO: 10 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 11 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 13	HCDR1 DNA	AATTACTTGATAGAG
SEQ ID NO: 14	HCDR2 DNA	GTGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTACTAACTACAATG AGAAGTTCAAGGGC
SEQ ID NO: 15	HCDR3 DNA	TGGAGGGGGGATGGTTACTACGCGTACTTCGATGTC
SEQ ID NO: 16	LCDR1 DNA	AAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTT ATATGAAC
SEQ ID NO: 17	LCDR2 DNA	GCTGCATCCAATCTAGAATCT
SEQ ID NO: 18	LCDR3 DNA	CAGCAAAGTAATGAGGATCCGTACACG
SEQ ID NO: 19	VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWV KQRPQGQLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSDSAVYFCARWRGDGYAYFDVW GAGTTVTVSS
SEQ ID NO: 20	VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYM NWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTD FTLNHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGKLEIK
SEQ ID NO: 21	DNA VH	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAA GGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTC TGGATACGCCTTCACTAATTACTTGATAGAGTGGGTA AAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAG TGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTACTAACTACAATGA GAAGTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAA TCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGA CATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATG GAGGGGGGATGGTTACTACGCGTACTTCGATGTCTGG GGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 22	DNA VL	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTG TGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGC CAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATG AACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAAC TCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGAT CCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC TTCACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATG CTGCAACCTATTACTGTGAGCAAAGTAATGAGGATCC GTACACGTTCTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
SEQ ID NO: 23	重鎖融合	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T L T G G G G S G G G G S G G G S G G Q V Q L Q Q S G A E L V R P G T S V K V S C K A S G Y A F T N Y L I E W V K Q R P G Q G L E W I G V I N P G S G G T N Y N E K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L S S L T S D D S A V Y F C A R W R G D G Y Y A Y F D V W G A G T T V T V S S A K T T A P S V Y P L A P V C G D T T G S S V T L G C L V K G Y F P E P V T L T W N S G S L S S G V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T V T S S T W P S Q S

10

20

30

40

50

		ITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN LLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALP IQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVR APQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 24	軽鎖融合	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLTGGGSGGGGSGGGGSGGDIVLTQSPASLAVSL GQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLI YAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAAT YYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNFPKDI NVKWKIDGSERQNGV LNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT KDEYERHNSYTCEA THKTSTSPIVKSFNRECE

10

20

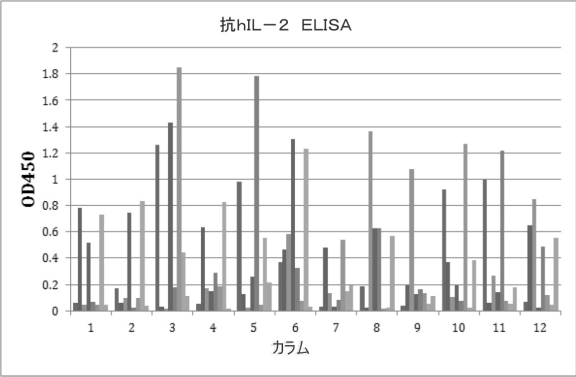
30

40

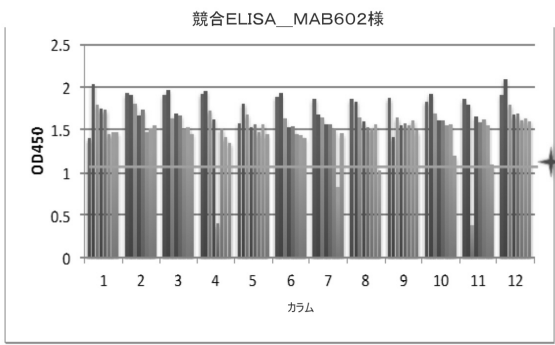
50

【図面】

【図 1】

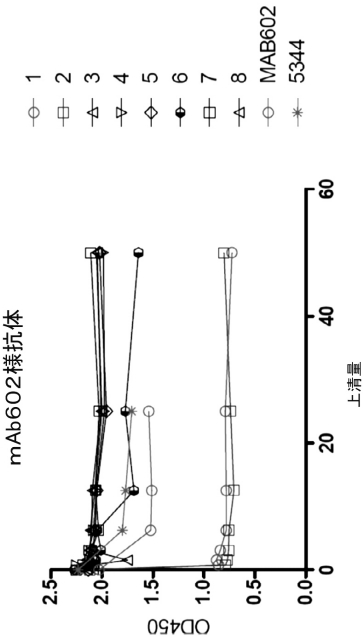


【図 2】

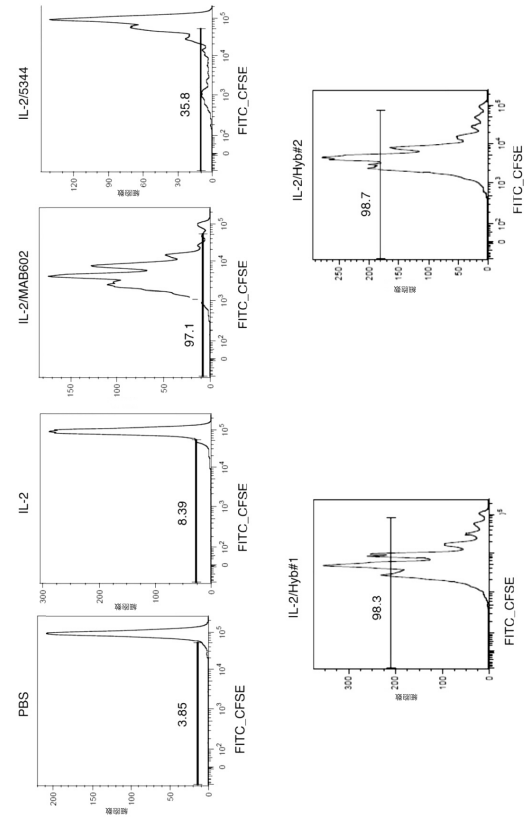


10

【図 3】



【図 4】



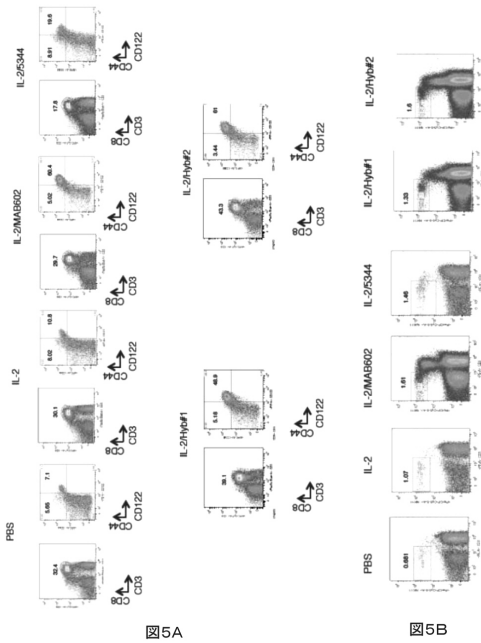
20

30

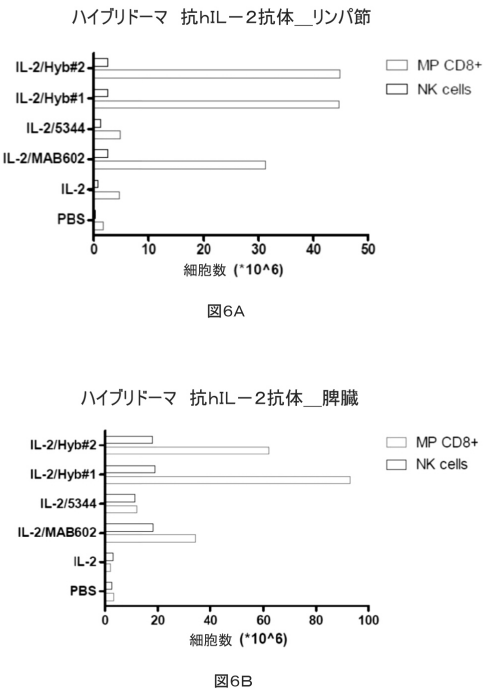
40

50

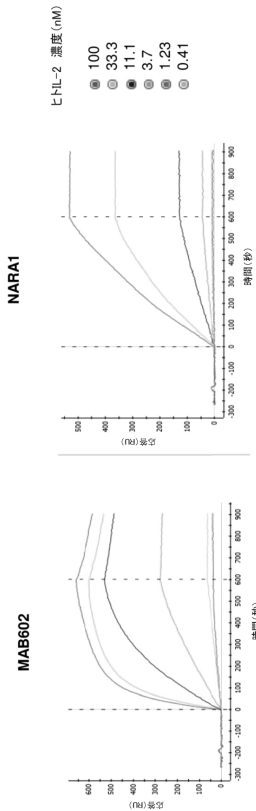
【図 5】



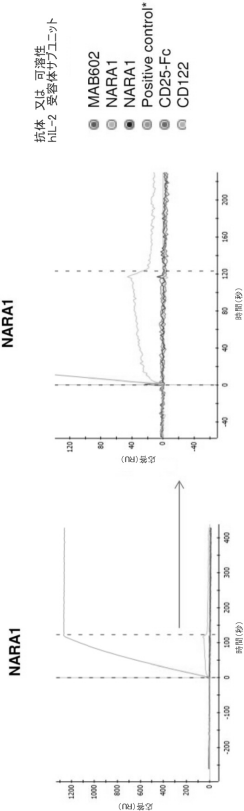
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

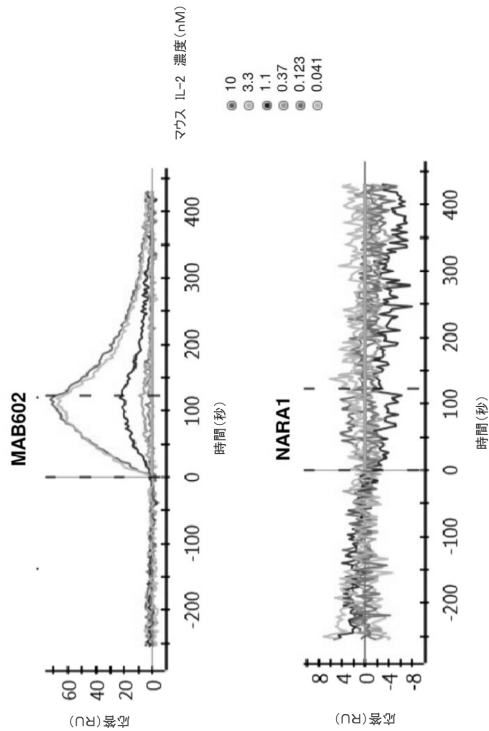
20

30

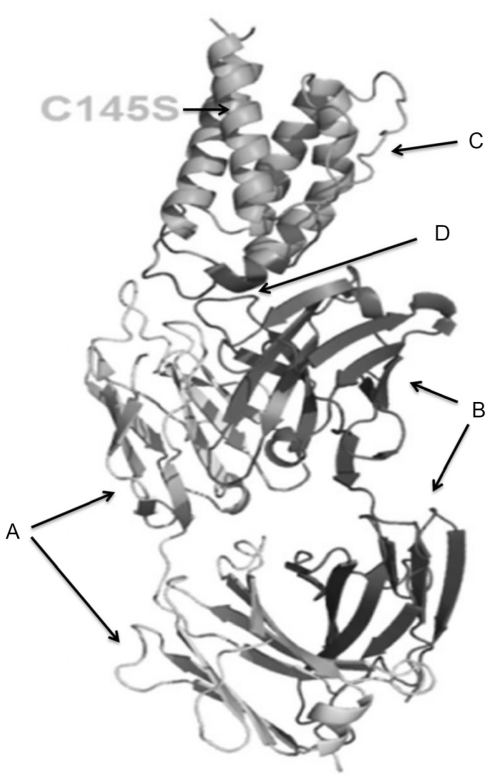
40

50

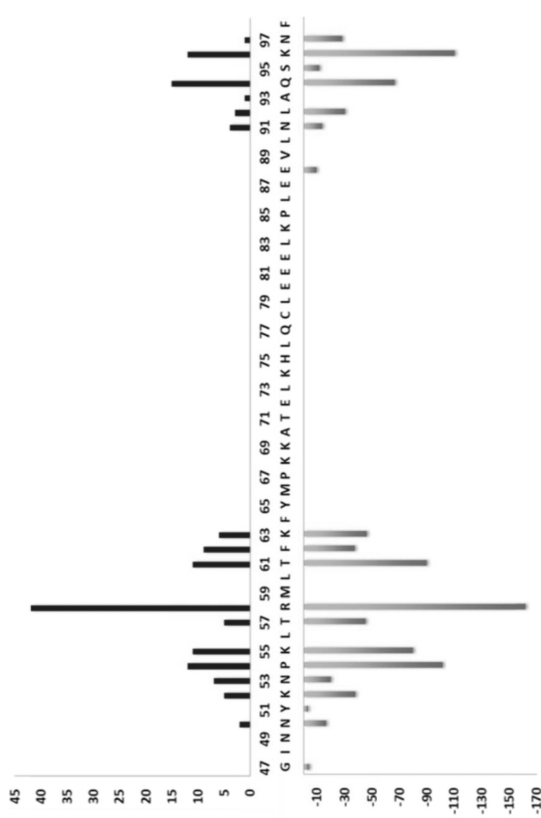
【図 9】



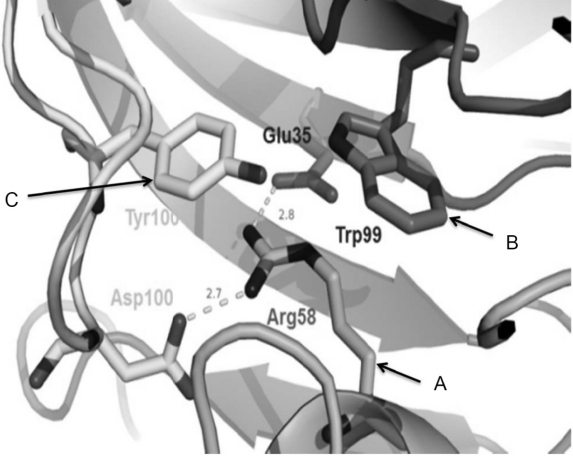
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

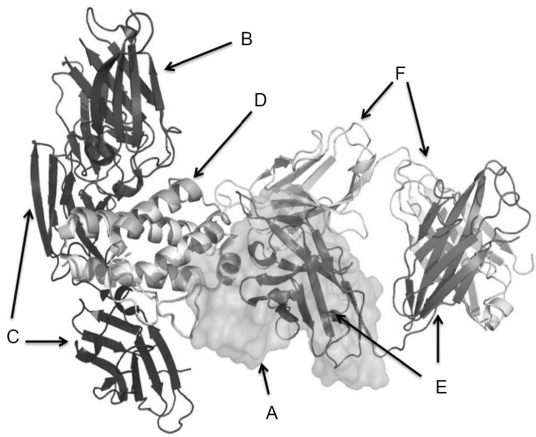
20

30

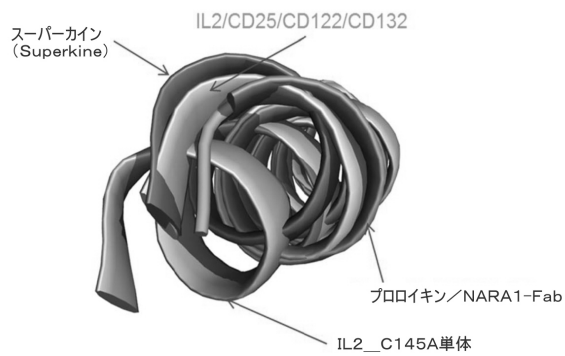
40

50

【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

[0007209464000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

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
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10

欧州特許庁(EP)

(72)発明者 アレナス - ラミレス, ナタリア

スイス国 チューリッヒ シーエッチ - 8 0 4 5 ホップフェンストラッセ 1 9

(72)発明者 ソウ, チャオ

スイス国 バーゼル シーエッチ - 4 0 0 2 ポストファッハ ノバルティス ファーマ アーゲー

合議体

審判長 福井 悟

審判官 上條 肇

審判官 飯室 里美

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 3 / 1 5 7 1 0 5 (W O , A 1)

特開 2 0 1 2 - 1 8 3 0 7 7 (J P , A)

特表 2 0 1 3 - 5 3 6 1 9 1 (J P , A)

特開平 7 - 2 3 3 0 8 2 (J P , A)

Proc. Natl. Acad. Sci., 2010, Vol. 107, No. 5, p. 2171 - 2176

ACS Chem. Biol., 2013, Vol. 8, p. 871 - 876

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00 - 15/90

A61K 38/00 - 45/08

A61K 48/00 - 51/12

PubMed

CAPLus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)

JSTPlus / JST7580 / JMEDPlus (JDreamIII)

UniProt / Geneseq