(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年2月22日(22.02.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/034226 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01)　*C07K 16/46* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)　*C12N 1/15* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)　*C12N 1/19* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)　*C12N 1/21* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)　*C12N 5/10* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)　*C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2017/029056

(22) 国際出願日：　2017年8月10日(10.08.2017)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2016-159090　2016年8月15日(15.08.2016)　JP
特願 2017-099615　2017年5月19日(19.05.2017)　JP

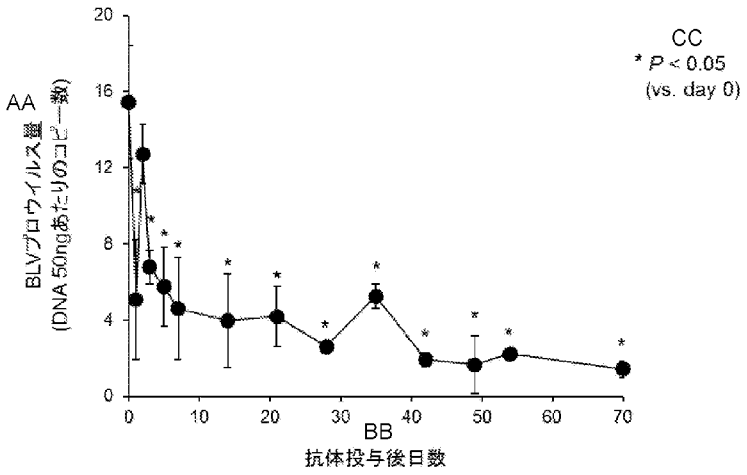
(71) 出願人: 国立大学法人北海道大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者: 今内 覚(**KONNAI, Satoru**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 大橋 和彦(**OHASHI, Kazuhiko**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 村田 史郎(**MURATA, Shiro**); 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 岡

(54) **Title:** ANTI-PD-1 ANTIBODY

(54) 発明の名称： 抗ＰＤ－１抗体

[図8]



AA　BLV provirus level (number of copies per 50 ng of DNA)
BB　Days after administration of antibody
CC　P < 0.05 (vs. day 0)

(57) **Abstract:** Provided is an anti-PD-1 antibody that can be administered frequently even to animals other than rats. An anti-PD-1 antibody including: (a) an L chain that has an L chain variable region including CDR1 having the amino acid sequence of QSLEYSDGYTY (SEQ ID NO: 16), CDR2 having the amino acid sequence of GVS, and CDR3 having the amino acid sequence of FQATHDPDT (SEQ ID NO: 17), and also has an L chain constant region of an animal antibody other than rat; and (b) an H chain that has an H chain variable region including CDR1 having the amino acid sequence

WO 2018/034226 A1

[続葉有]

川 朋弘(**OKAGAWA, Tomohiro**)；〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP)．西森 朝美(**NISHIMORI, Asami**)；〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP)．前川 直也(**MAEKAWA, Naoya**)；〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP)．鈴木 定彦(**SUZUKI, Yasuhiko**)；〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP)．中島 千絵(**NAKAJIMA, Chie**)；〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP)．

(74) 代理人：間山 世津子，外(**MAYAMA, Setsuko** et al.)；〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町３丁目３０番の１農機会館４階 Kanagawa (JP)．

(81) 指定国（表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能）：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW．

(84) 指定国（表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能）：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)．

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

of GFSLTSYY (SEQ ID NO: 18), CDR2 having the amino acid sequence of IRSGGST (SEQ ID NO: 19), and CDR3 having the amino acid sequence of ARTSSGYEGGFDY (SEQ ID NO: 20), and also has an H chain constant region of an animal antibody other than rat. A pharmaceutical composition containing the anti-PD-1 antibody as an active ingredient. Also provided is a method for producing the anti-PD-1 antibody.

(57) 要約：ラット以外の動物にも頻回投与が可能な抗PD-1抗体を提供する。(a)QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖と、(b) GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖とを含む、抗PD-1抗体。前記抗PD-1抗体を有効成分として含む、医薬組成物。前記抗PD-1抗体を製造する方法も提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 抗ＰＤ－１抗体

技術分野

[0001] 本発明は、抗PD-1抗体に関し、より詳細には、ラット抗ウシPD-1抗体の相補鎖決定領域（CDR）を含む可変領域とラット以外の動物の抗体の定常領域とを有する抗PD-1抗体に関する。

背景技術

[0002] 免疫抑制受容体Programmed death 1 (PD-1) とそのリガンドであるProgrammed death ligand 1 (PD-L1)は過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容に深く関連している因子として京都大学、本庶 佑氏らによって同定された分子である（非特許文献１：Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T The EMBO J., 11(11):3887-3895; Nov. 1992.）。腫瘍における免疫抑制に関与していることも近年明らかにされ、ヒト医療では、PD-1の働きを阻害する抗体医薬が開発され、実用化されている（小野薬品工業株式会社「オプジーボ（登録商標）」）。

[0003] これまで、本発明者らは、動物難治性疾病に対するPD-1又はPD-L1を標的とする免疫療法の開発を行い、この新規免疫療法が疾病横断的かつ動物横断的に応用が可能であることを明らかにしてきた（非特許文献２：Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K. Vet. Res., 42:103; Sep. 26, 2011.、非特許文献３：Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Vet. Res., 44:59; Jul. 22, 2013.、非特許文献４：Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology. 142(4):551-61; Aug. 2014.、非特許文献５：Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One., 9(6):e98415; Jun. 10, 2014.、非特許文献６：Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. Comp. Immunol. Microbiol.

Infect. Dis., 34(1):55-63; Jan. 2011.）。

[0004] しかし、本発明者らがこれまでに作製した抗体は、ラット抗体であるため、ラット以外の動物には頻回投与できない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. The EMBO Journal. 11(11):3887-3895; Nov. 1992.

非特許文献2：Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K. Vet. Res., 42:103; Sep. 2011.

非特許文献3：Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Vet. Res., 44:59; Jul. 22, 2013.

非特許文献4：Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology, 142(4):551-61; Aug. 2014.

非特許文献5：Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One, 9(6):e98415; Jun. 10, 2014.

非特許文献6：Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 34(1):55-63; Jan. 2011.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ラット以外の動物にも頻回投与が可能な抗PD-1抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、ウシPD-1およびPD-L1の結合を阻害可能なラット抗ウシPD-1モノクローナル抗体(5D2)の可変領域を決定し、この可変領域遺伝子と、ウシ免疫グロブリン(ウシIgG1、ただし、ADCC活性を抑制するために、CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（図１、図１１参照。アミノ酸

番号及び変異: 251 E→P, 252 L→V, 253 P→A, 254 G→deletion, 348 A→S, 349 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology 2014 Aug; 142(4):551-561.)。)の定常領域遺伝子を組み合わせたキメラ抗体遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞(Chinese hamster ovary cell:CHO細胞)を培養増殖させることにより、ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体を作製することに成功した。さらに、ラット抗ウシPD-1モノクローナル抗体(5D2)の可変領域のCDRを決定した。本発明は、これらの知見により完成されたものである。

[0008] 本発明の要旨は以下の通りである。

（１）(a)QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖と、(b) GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖とを含む、抗PD-1抗体。

（２）L鎖可変領域とH鎖可変領域がラットに由来する（１）記載の抗体。

（３）L鎖可変領域がラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域であり、H鎖可変領域がラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域である（２）記載の抗体。

（４）L鎖可変領域が配列番号１のアミノ酸配列を有し、H鎖可変領域が配列番号２のアミノ酸配列を有する（３）記載の抗体。

（５）ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖又はKappa鎖の定常領域のアミノ酸配列を有する（１）～（４）のいずれかに記載の抗体。

（６）ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域が、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有するか、あるいは、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである（１）～（５）のいずれかに記載の抗体。

（７）ラット以外の動物がウシであり、ウシ抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖

の定常領域のアミノ酸配列を有し、かつ、ウシ抗体のH鎖定常領域が、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである（６）記載の抗体。

（８）ウシ抗体のL鎖定常領域が配列番号３のアミノ酸配列を有し、ウシ抗体のH鎖定常領域が配列番号４のアミノ酸配列を有する（７）記載の抗体。

（９）L鎖２本とH鎖２本の４本鎖構造を持つ（１）～（８）のいずれかに記載の抗体。

（１０）（１）～（９）のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む、医薬組成物。

（１１）がん及び／又は感染症の予防及び／又は治療のための（１０）記載の医薬組成物。

（１２）がん及び／又は感染症が、腫瘍性疾患、白血病、ヨーネ病、アナプラズマ病、細菌性乳房炎、真菌性乳房炎、マイコプラズマ感染症（例えば、マイコプラズマ性乳房炎、マイコプラズマ性肺炎など）、結核、小型ピロプラズマ病、クリプトスポリジウム症、コクシジウム症、トリパノソーマ病及びリーシュマニア症からなる群より選択される（１１）記載の医薬組成物。

（１３）(a’)QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNAと、(b’)GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNAとを含む、人工遺伝子DNA。

（１４）（１３）記載の人工遺伝子DNAを含むベクター。

（１５）（１４）記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

（１６）（１５）記載の宿主細胞を培養し、培養物から抗PD-1抗体を採取することを含む、抗体の製造方法。

（１７）QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNA。

（１８）GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNA。

発明の効果

[0009] 本発明により、新規な抗PD-1抗体が得られた。この抗体は、ラット以外の動物にも利用可能である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2016－159090及び特願2017-099615の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2のアミノ酸配列。ラット抗ウシPD-1抗体5D2のL鎖可変領域及びH鎖可変領域における、CDR1、CDR2及びCDR3領域を示し、さらに、ウシIgG1（CH2ドメイン）に変異を加えたアミノ酸（アミノ酸番号および変異：251 E→P, 252 L→V, 253 P→A, 254 G→deletion, 348 A→S, 349 P→S）も示す。

[図2]pDN112ベクターとラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2の模式図。

[図3]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2の産生量および精製純度。

[図4]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2の結合性。

[図5]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2のウシPD-1/PD-L1 結合阻害活性。

[図6]BLV実験感染牛への投与後のラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2の血中濃度の推移。

[図7]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2を投与したBLV実験感染牛に

おけるBLV抗原に対するT細胞の細胞増殖応答。

[図8]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2を投与したBLV実験感染牛におけるBLVプロウイルス量の変化。

[図9]ヒツジPD-1に対するラット抗ウシPD-1抗体5D2の交差反応性。

[図10]スイギュウのT細胞に対するラット抗ウシPD-1抗体5D2の交差反応性。

[図11]ウシIgG1定常領域の立体構造およびFcγ受容体予想結合部位。

[図12]pDC6ベクター。

[図13]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2 IgG1 WTおよびIgG1 ADCC-の精製純度。

[図14]ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2 IgG1 WTおよびIgG1 ADCC-の各ウシFcγ受容体に対する結合性。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0012] 本発明は、(a)QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖と、(b) GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖とを含む、抗PD-1抗体を提供する。

[0013] ラット抗ウシPD-1抗体5D2（後述）のL鎖可変領域におけるCDR1～3は、ぞれぞれ、QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列からなる領域、GVSのアミノ酸配列からなる領域、FQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列からなる領域である（図１参照）。

[0014] また、ラット抗ウシPD-1抗体5D2のH鎖可変領域におけるCDR1～3は、ぞれぞれ、GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列からなる領域、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列からなる領域及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）

のアミノ酸配列からなる領域である（図１参照）。

[0015] QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列、GVSのアミノ酸配列及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列、並びに、GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列においては、１個、２個、３個、４個又は５個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよく、これらの変異が導入されても、PD-1抗体のL鎖可変領域のCDR又はH鎖可変領域のCDRとしての機能を有しうる。

[0016] 本明細書において、抗体とは、全長抗体の他、Fab、F(ab)’$_2$、ScFv、Diabody、V_H、V_L、Sc(Fv)$_2$、Bispecific sc(Fv)$_2$、Minibody、ScFv-Fc monomer、ScFv-Fc dimerなどの低分子化されたものも含む概念である。

[0017] 本発明の抗PD-1抗体において、L鎖可変領域とH鎖可変領域がラットに由来するとよい。例えば、L鎖可変領域がラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域であり、H鎖可変領域がラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域であるとよい。

[0018] ラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列及びH鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号１及び２に示すが、配列番号１及び２のアミノ酸配列においては、１若しくは複数個（例えば、５個以下、多くても１０個程度）のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよく、これらの変異が導入されても、PD-1抗体のL鎖可変領域又はH鎖可変領域としての機能を有しうる。

[0019] ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域及びH鎖定常領域は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2と交差反応するPD-1を産生する動物由来のものであるとよい。

[0020] 抗体のL鎖には、Kappa鎖（カッパ鎖）とLambda鎖（ラムダ鎖）があり、本発明の抗PD-1抗体において、ラット以外の動物の抗体のL鎖定常領域は、Kappa鎖又はLambda鎖のどちらの鎖の定常領域のアミノ酸配列を有するものであってもよいが、存在比率は、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマではLambda鎖の方が高く、マウス、ラット、ヒト、ブタではKappa鎖の方が高い。存在比率の高い鎖の方が好ましいと考えられるので、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ

ではLambda鎖の定常領域のアミノ酸配列を有することが好ましく、マウス、ラット、ヒト、ブタではKappa鎖の定常領域のアミノ酸配列を有することが好ましい。

[0021] ラット以外の動物の抗体のH鎖定常領域は、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有するとよい。H鎖は、定常領域の違いにより、γ鎖、μ鎖、α鎖、δ鎖、ε鎖に分けられ、この違いによりそれぞれIgG、IgM、IgA、IgD、IgEの5種類のクラス（アイソタイプ）の免疫グロブリンが形成される。

[0022] 免疫グロブリンG（IgG）はヒト免疫グロブリンの70-75%を占め、血漿中に最も多い単量体の抗体である。軽鎖2本と重鎖2本の4本鎖構造をもつ。ヒトIgG1、IgG2、IgG4は分子量は約146,000であるが、ヒトIgG3はFab領域とFc領域をつなぐヒンジ部が長く、分子量も170,000と大きい。ヒトIgG1はヒトIgGの65%程度、ヒトIgG2は25%程度、ヒトIgG3は7%程度、ヒトIgG4は3%程度を占める。血管内外に平均して分布する。ヒトIgG1は、エフェクター細胞表面のFcレセプターや補体因子に強い親和性を有するので、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）を誘導し、また、補体を活性化して補体依存性細胞傷害活性（CDC）を誘導する。ヒトIgG2とヒトIgG4は、Fcレセプターや補体因子への親和性が低いことから、ADCC活性及びCDC活性が低い。

[0023] 免疫グロブリンM（IgM）はヒト免疫グロブリンの約10%を占める、基本の4本鎖構造が5つ結合した五量体の抗体である。分子量は970,000。通常血中のみに存在し、感染微生物に対して最初に産生され、初期免疫を司る免疫グロブリンである。

[0024] 免疫グロブリンA（IgA）はヒト免疫グロブリンの10-15%を占める。分子量は160,000。分泌型IgAは2つのIgAが結合した二量体の抗体になっている。IgA1は血清、鼻汁、唾液、母乳中に存在し、腸液にはIgA2が多く存在する。

[0025] 免疫グロブリンD（IgD）はヒト免疫グロブリンの1%以下の単量体の抗体である。B細胞表面に存在し、抗体産生の誘導に関与する。

[0026] 免疫グロブリンE（IgE）はヒト免疫グロブリンの0.001%以下と極微量しか

存在しない単量体の抗体である。寄生虫に対する免疫反応に関与していると考えられるが、寄生虫の稀な先進国においては、特に気管支喘息やアレルギーに大きく関与している。

[0027] イヌでは、IgGのH鎖として、IgG-A（ヒトIgG2に相当）、IgG-B（ヒトIgG1に相当）、IgG-C（ヒトIgG3に相当）、IgG-D（ヒトIgG4に相当）の配列が同定されている。本発明の抗体では、ADCC活性、CDC活性をともに持たないIgG H鎖定常領域が好ましい（ヒトではIgG4）。ヒトIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域が同定されていない場合には、ヒトIgG1に相当する免疫グロブリンの当該領域に変異を加えることにより、ADCC活性、CDC活性をともに持たなくなったものを使用するとよい。

[0028] ウシでは、IgGのH鎖として、IgG1、IgG2、IgG3の配列が同定されている。本発明の抗体では、ADCC活性、CDC活性をともに持たないIgG H鎖定常領域が好ましい（ヒトではIgG4）。ヒトIgG1の定常領域は野生型ではADCC活性およびCDC活性を持つが、特定の部分にアミノ酸置換や欠損を加えることにより、それらの活性を低下させられることが知られている。ウシにおいて、ヒトIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域が同定されていないので、ヒトIgG1に相当する免疫グロブリンの当該領域に変異を加え、これを使用することができる。その一例として、ウシ抗体のH鎖定常領域（IgG1鎖, GenBank: X62916）のCH2ドメインに変異を加えたアミノ酸配列とヌクレオチド配列（コドンを最適化したもの）を、ぞれぞれ、配列番号４及び８に示す。

[0029] ウシ抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖の定常領域のアミノ酸配列を有し、かつ、ウシ抗体のH鎖定常領域が、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである抗PD-1抗体がより好ましい。

[0030] 本発明の抗PD-1抗体は、ラット－ウシキメラ抗体、ウシ化抗体、完全ウシ型抗体を包含するが、動物は、ウシに限定されるわけではなく、ヒト、イヌ、ブタ、サル、マウス、ネコ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、水牛、ウサギ、ハムスター、モルモット等などを例示することができる。

[0031] 例えば、本発明の抗PD-1抗体は、ウシ抗体のL鎖定常領域が配列番号３のア

ミノ酸配列を有し、ウシ抗体のH鎖定常領域が配列番号４のアミノ酸配列を有する抗PD-1抗体であるとよい。

[0032] 配列番号３及び４のアミノ酸配列においては、1若しくは複数個（例えば、５個以下、多くても１０個程度）のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよく、これらの変異が導入されても、抗体のL鎖定常領域又はH鎖定常領域としての機能を有しうる。

[0033] 本発明の抗PD-1抗体は、L鎖２本とH鎖２本の４本鎖構造を持つとよい。

[0034] 本発明の抗PD-1抗体は、以下のようにして製造することができる。同定したラット抗ウシPD-1抗体の可変領域配列とラット以外の動物（例えば、ウシなど）の抗体（好ましくは、ヒトIgG1に相当する免疫グロブリンの当該領域に変異を加え、ADCC活性および/又はCDC活性を低下させたもの）の定常領域配列を含む人工遺伝子を合成し、その人工遺伝子をベクター（例えば、プラスミド）に挿入後、宿主細胞（例えば、CHO細胞などの哺乳類細胞）に導入し、該宿主細胞を培養することにより、培養物から抗体を採取する。

[0035] 本発明者らが同定したラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号１及び５に示す。さらに、コドン最適化後のヌクレオチド配列を配列番号１１に示す。

[0036] 本発明者らが同定したラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号２及び６に示す。さらに、コドン最適化後のヌクレオチド配列を配列番号１２に示す。

[0037] ウシ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖, GenBank: X62917）のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号３及び７に示す。さらに、コドン最適化後のヌクレオチド配列を配列番号１３に示す。

[0038] ウシ抗体のH鎖定常領域（IgG1鎖, GenBank: X62916を改変）のアミノ酸配列とヌクレオチド配列（コドン最適化後）を、それぞれ、配列番号４及び８に示す。

[0039] また、配列番号９は、ラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域とウシ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖, GenBank: X62917）とからなるキメラL鎖のアミノ酸

配列を示す。ラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域とウシ抗体のL鎖定常領域（Lambda鎖, GenBank: X62917）とからなるキメラL鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後）を配列番号１４に示す。

[0040] 配列番号１０は、ラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（IgG1鎖, GenBank: X62916を改変）とからなるキメラH鎖のアミノ酸配列を示す。ラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（IgG1鎖, GenBank: X62916を改変）とからなるキメラH鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後）を配列番号１５に示す。

[0041] この他、ラット以外の動物のL鎖定常領域及びH鎖定常領域のアミノ酸配列とヌクレオチド配列は、公知のデータベースから入手することができ、これらの配列を利用することができる。

[0042] ウシのL鎖定常領域及びH鎖定常領域のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を下記の表にまとめた。

（表）

種名	遺伝子		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
ウシ（学名：Bos taurus）	ウシ免疫グロブリン定常領域（CH1～CH3）	IgG1 variant 1	GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGAGTTC TTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTGACCCTG GGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGA CCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCCTGTCCTTCAGTCCTCCGGGCTG TACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCA CCTGAGGACAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCC GGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGCGTGTTGATCCC AGATGCAAACCATCACCCTGTGACTGTTGCCCACCCCG TGAGCTCCCCGGAGGACCCTGTGTCTTCATCGTTCCCAC CGAAAGCCAAGGACACCCTCACAATCTCGGGAACGCC CGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCACGAT GACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACG TGGAGGTAAACACAGCCACGACGAAGCCGAGAGAGGA GCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTG CGCATCCAGCACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGT TCAAGTGCAAGGTCCACAACGAAGGCCTCCCAGCCCC CATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCCGGCC CGGGAGCCGCAGGTGTATCTCCTGCCCCCACCCCAGG AAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTCACCTGCAT GGTCACAGACTTCTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGT GGCAGAGAAATGGGCAGCCTGAGTCAGAGGACAAGTA CGGCACGACCCCTGCCCAGCTGGACGCCGACGGCTCC TACTTCCTGTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACGCAGAAGTCCA CCTCTAAGTCTGCGGGTAAATGA （配列番号29）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPGSTSGQT FTCNVAHPASSTKVDKAVDPTCKPSP CDCCPPPELPGGPSVFIFPPKPKDTLTI SGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSWFV DDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSAL RIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGLPAPIV RTISRTKGPAREPQVYVLAPPGEELSK STVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQP ESEDKYGTTPPQLDADGSYFLYSKLRV DRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQ KSTSKSAGK* （配列番号21）	X62916	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=bovine&group=IGHC	Symons D.B. et al., J. Immunogenet., 14, 273-283 (1987). PMID: 3141517 Symons D.B. et al., Mol. Immunol., 28, 841-850 (1989). PMID: 2513467 Kacskovics I. and Butler J.E., Mol. Immunol., 33, 189-195 (1996). PMID: 8648440 Rabbani H. et al., Immunogenetics, 46, 326-331 (1997). PMID: 9218536 Saini S.S. et al., Scand. J. Immunol., 66, 32-8 (2007). PMID: 17212764
		IgG1 variant 2	GCCTCCACCAGAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGAGTTC TTGCTGCCGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTGACCCTG GGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGA CCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGAGCGGGGT GCACACCTTCCCGCCCGTCCTTCAGTCCTCCGGCCTG TACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCA CCTGAGGACAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCC GGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGCGTGTTGATCCC ACATGCAAACCATCACCCTGTGACTGTTGCCCACCCCG TGAGCTCCCCGGAGGAGCCCTCTGTCTTCATCTTCCCAC CGAAAGCCAAGGACACCCTCACAATCTCGGGAACGCC GACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACG TGGAGGTAAACACAGCCACGACGAAGCCGAGAGAGGA GCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTG CGCATCCAGCACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGT TCAAGTGCAAGGTCCACAACGAAGGCCTCCCGGCCCC CATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCCGGCC CGGGAGCCGCAGGTGTATGTCCTGCCCCCACCCCAGG AAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTGACCTGCAT GGTCACCAGCTTCTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGT GGCAGAGAAACGGGCAGCCTGAGTCGGAGGACAAGTA CGGCACGACCCCTGCCCAGCTGGACGCCGACGGCTCC TACTTCCTGTACAGCAAGCTCACGGTGGACAAGAGCA GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAATCACTACACGCAGAAGTCCA CCTCTAAGTCTGCGGGTAAATGA （配列番号30）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPGSTSGQT FTCNVAHPASSTKVDKAVDPRGKTT CDCCPPPELPGGPSVFIFPPKPKDTLTI SGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSWFV DDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSAL RIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGLPAPIV RTISRTKGPAREPQVYVLAPPGEELSK STVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQP ESEDKYGTTPPQLDADGSYFLYSKLRV DRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQ KSTSKSAGK* （配列番号22）	X16701 (M25278)		
		IgG1 variant 3	GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGAGTTC TTGCTGCCGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTGACCCTG GGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGA CCGTGACCTGGAACTCGGGTGGCCTGAAGAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCCGTCCTTCAGTCCTCCGGCCTC TACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCA CCTGAGGAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCA CCCGCCACCAAGGTGGACAAGCGTGTTGAGTCCAAA CCCAGATGCAAAACAACGTGTGACTGTTGCCCACCCCG TGAGCTCCCTGGAGGAGCCCTCTGTCTTCATCTTCCCAC CGAAAGCCAAGGACACCCTCACAATCTCGGGAACGCC CGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCACGAT GACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACG TGGAGGTAAACACAGCCACGACGAAGCCGAGAGAGGA GCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTG CGCATCCAGCACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGT TCAAGTGCAAGGTCCACAACGAAGGCCTCCCAGCCCC CATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCCGGCC CGGGAGCCGCAGGTGTATCTCCTGCCCCCACCCCAGG AAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTCACCTGCAT GGTCACCAGCTTCTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGT GGCAGAGAAATGGGCAGCCTGAGTCAGAGGACAAGTA CGGCACGACCCCTGCCCAGCTGGACGCCGACGGCTCC TACTTCGTGTACAGCAGGCTCAGGGTGGACAGGAACA GCTGGCAGGAAGGAGACACCTACACGTGTGTGGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACGCAGAAGTCC AGCTCTAAGTCTGCGGGTAAATGA （配列番号31）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPGSTSGTQ TFTCNVAHPASSTKVDKAVDPRGKTT CDCCPPPELPGGPSVFIFPPKPKDTLTI SGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSWFV DDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSAL RIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGLPAPIV RTISRTKGPAREPQVYVLAPPGEELSK STVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQP ESEDKYGTTPPQLDADGSYFLYSRLRV DRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQ KSTSKSAGK* （配列番号23）	S82409		
		IgG2 variant 1	GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGGCAT CCAGCTGCGGAGACACATCCAGCTCCACCGTGACCCT GGGCTGCCTGGTGTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTG ACCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGAGCGGCGG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTTCAGTCCTCCGGGCT CTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGCAGC AGCTCAGGACAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACC CGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGGCTGTTGGGGT CTCCATTGACTGCTCCAAGTGTCATAACCAGCCTTGCG TGAGGGAACGATCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAACCC AAAGACACCCTGATGATCACAGGAACGCCCGAGGTCA CGTGTGTGGTGGTGAACGTGGGCCACGATAACCCCGA GGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGATGACGTGGAGGTG CACACGGCCAGGTCGAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCA ACAGCACGTACCGCGTGGTCAGCGCCCTGCCCATCCA GCACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGC AAGGTCAACAACAAGGCCTCTCCGCCCCCATCGTCA GGATCATCTCCAGGAGGAAAGGGCCGGCCCGGGAGCC GCAGGTGTATGTCCTGCCACCCACCCAAGGAAGAGCTC AGCAAAAGCACGGTCAGCGTCACCTGCATGGTCACCG GCTTCTACCCAGAAGATGTAGCCGTGGAGTGGCAGAG AAACGGGCAGACTGAGTCCGAGGACAAGTACCGCACG ACCCCGCCCCGAGCTGGACACCGACGCTCCTACTTCC TGTACAGCAAGCTCAGGGTGGACAGGAACAGCTGGCA GCAGGGAACACGCCTACACGTGTGTGGTGATGCACGAG GCCCTGCACAATGACTACATGCAGAAGTCCACGCTCTAA GTCTGCGGGTAAATGA （配列番号32）	ASTTAPKVYPLASSCGDTSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPASSSGQT FTCNVAHPASSTKVDKAVSVEDCSKC HNCPCVREPSVFIFPPKPKDTLMITGTP EVTCVVVNVGHDNPEVQFSWFVDDVE VHTARSKPREEQFNSTYRVVSALPIQH QDWTGGKEFKCKVNNKGLSAPIVRSIR SKGPAREPQVYVLDPPREELSKSTLSV TCMVTGFYPEDVAVEWQRNRQTESED KYRTTPPQLDTDRSYFLYSKLRVDRNS WQEGDAYTCVVMHEALHNHYMQKSTS KSAGK* （配列番号24）	S82407		

IgG2 variant 2	GCGTCGACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGAGTTC TTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTGACCGTG GGCTGCCTGGTGTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGA CCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGACGGGCGT GCACACCTTCCCGGCCGTCCTGCAGTCCTCCGGGCTC TACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCA CCTGAGGACAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCC GGCCAGCAGGACCAAGGTGGACAAGCCTGTTGGGGTC TCCAGTGACTGCTCCAAGCCTAATAACCAGCATTGCGT GAGGGAACCATCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAACCCA AAGACACCCTGATGATCACAGGAACGCCCGAGGTCAC GTGTGTGGTGGTGAACGTGGGCCACGATAACCCCGAG GTCCAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGGTGC ACAGCGCCAGGACGAAGCCGAGACGCAGTTCAA CAGCACGTACCGCGTGGTCAGCGTCCTGCCCATCCAG CACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCA AGGTCAACAATCAAAGCCTCCCGGCCTCCATCGTGAG GATCATCTCCAGGAGCAAAGGGCCGGCCCGGGAGCCG CAGGTGTATGTCCTGGACCCACCCAAGGAAGAGCTCA GCAAAAGGACCGTCAGCGTCACCTGCATGGTCATCGG CTTCTACCCAGACATCGTAGACGTGGAGTGGCAGAGA GACCGGCAGACTGAGTCGGAGGACAAGTACCGCACGA CCCCGCCCCAGCTGGACGCCGACCGCTCCTACTTCCT CTACAGCAAGCTCACGGTGGACAAGGAACAGCTGGGAG AGAGGAGACGACCTACGACGTGTGTGGTGATGCACGAG CCCTGCACAATCACTACATGCAGAAGTCCACCTCTAAG TCTGCGGGTAAATGA （配列番号33）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPGSTSGQT FTCNVAHPASSTKVDKAVGVSSDCSK PHNQHCVEEPSVFIFPPKPKDTLMITG TPEVTCVVVNVGHDNPEVQFSWFVDD VEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALPI QHQDWTGGKEFKCKVNKGLSASIVRI SRSKGPAREPQVYVLPPPREELSKSTV SVTCMVIGFYPEDVDVEWQRDRQTESE DKYRTTPPQLDADRSYFLYSKLRVDRN SWQRGDTYTCVVMHEALHNHYMQKST SKSAGK* （配列番号25）	M36946 (X06703)		
IgG2 variant 3	GCGTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGAGTTC TTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCGGGGGTGACCCTG GGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGA CCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGACGGGCGT GCACACCTTCCCGGCCGTCCTTGAGTCCTCCGGGGTC TACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGGCAGCA CCTGAGGAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCA CCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGGCTGTTGGG GTCTCCAGTGACTGCTCCAAGCCTAATAACCAGCATTG CGTGAGGGAACCATCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAAC CCAAAGACACCCTGATGATCACAGGAACGCCCGAGGT CACGTGTGTGGTGGTGAACGTGGGCCACGATAACCCC GAGGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGG TGCACACGGCCAGGACGAAGCCGAGACGCAGTTCAA CAAGCACGTACCGCGTGGTCAGCGTCCTGCCCATC CAGCACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGT GCAAGGTCAACAATCAAAGCCTCCCGGCCTCCATCGT GAGGATCATCTCCAGGAGCAAAGGGCCGGCCCGGGAG CCGCAGGTGTATGTCCTGGACCCACCCAAGGAAGAGC TCAGCAAAAGCACGGTCAGCGTCACCTGCATGGTCATC GGCTTCTACCCAGACATCGTAGACGTGGAGTGGCAGA GAGACCGGCAGACTGAGTCGGAGGACAAGTACCGCAC GACCCCGCCCCAGCTGGACGCCGACCGCTCCTACTTC CTGTACAGCAAGCTCACGGTGGACAAGGAACAGCTGG AGAGAGGAGACGACCTACGACGTGTGTGGTGATGCACGA GGCCCTGCACAATCACTACATGCAGAAGTCGACCTCTA AGTCTGCGGGTAAATGA （配列番号34）	ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSGVTLG CLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSMVTVPASSSGT QTFTCNVAHPASSTKVDKAVGVSSDC SKPNNGHCVREPSVFIFPPKPKDTLMIT GTPEVTCVVVNVGHDNPEVQFSWFVD DVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALP IQHQDWTGGKEFKCKVNKGLSASIVRE SRSKGPAREPQVYVLPPPKEELSKSTV SLTCMVIGFYPEDVDVEWQRDRQTESE DKYRTTPPQLDADRSYFLYSKLRVDRN SWQRGDTYTCVVMHEALHNHYMQKST SKSAGK* （配列番号26）	X16702 (M25279)		
IgG3 variant 1	GCGTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGGCAT CCAGCTGCGGAGACAGATCCAGCTCCACCGTGACCCT GGGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTG ACCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTGAAGAGCGGGG TGCACACCTTCCCGGCCGTCCGGGCAGTCCTCTGTGGCT GTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACTGTGCCCGGCAGC AGCTCAGAAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCA CCCGGCCAGGAGCACCAAGGTGGACAAGGCTGTCAGT GCAAGGTCCACAATCAAAGCCTCCCGGCCTCCATCGT TCCGTCGTGGAAAACCCACAACCCGCAAAGTCTCAAGTT GAAAAGACACCCTGCCAGTGTTCCAAATGCCCAGAACC TCTGGGAGGACTGTCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAAC CCAAGGACACCCTCACAATCTCGGGAACGCCCGAGGT CACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCAGGATGAGCCC GAGGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGG TGCACACGGCCAGGAGGAAGCCGAGAGAGGAGCAGTT CAACAGCACGTACGGGGTGGTCAGCGTCCTGCCCATC CAGCACCAGGACTGGCTGCAGGGAAAGCAGTTCAAGT GCAAGGTCAACAACAAAGGCCTCCCGGCGCCCATTGT GAGGAGCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGCCCCGAG CCGCAGGTGTATGTCCTGGCCCCACCCCGGGAAGAGC TCAGCAAAAGCACGGCTCAGCGTCAGCTGCATGATC GGTTTCTACCCAGACATCGTAGCCGTGGAGTGGCAGA GAATGGGCAGCCTGAGTCGGAGGACAAGTACCACAC GACCGCACCCCAGGTGGATGGTGACGGCTCCTACTTC CTGTACAGCAAGCTCACGGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGGAAGGAGACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAATGA （配列番号35）	ASTTAPKVYPLASSCGGTSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVRQSSGLYSLSSMVTVPASSETQ TFTCNVAHPASSTKVDKAVTARRPVP TTPKTTPPGKPTTPKSEVEKTPCQCS KCPEPLGGLSVFIFPPKPKDTLTISGTP EVTCVVVDVGQDDPEVQFSWFVDDVE VHTARTKPREEQFNSTYRVVSALRIQH QDWLQGKEFKCKVNNKELPAPIVRTIS RTKGQARERPQVYVLAPPREELSKSTLS LTCLITGFYPEEIDVEWQRNGQPESEDK YHTTAPQLDADGSYFLYSKLRVNKSSW QEGDHYTCAVMHEALRNHYKEKSISRS PGK* （配列番号27）	U63638		
IgG3 variant 2	GCGTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGGCAT CCAGCTGCGGAGACATCCAGCTCCACCGTGACCCT GGGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTG ACCGTGACCTCGAACTCGGGTGCCCTGAAGAGTCGCCG TGCACACCTTCCCGGCCGTCCTTCAGTCCTCCGGGCT GTACTCTCTCAGCAGCATGGTGACCGTGCCCGCCAGC AGCTCAGAAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCA CCCGGCCAGGAGCACCAAGGTGGACAAGCCTGTCACT GCAAGGCGTCCAGTCCCACGACGCCAAAGACAACCA TCCCTCCTGGAAAACCCACAACCCAGGAGTCTGAAGTT GAAAAGACACCCTGCCAGTGTTCCAAATGCCCAGAACC TCTGGGAGGACTGTCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAAC CCAAGGACACCCTCACAATCTCGGGAACCGCCCGAGGT CACGTGTGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCG GAGGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGG TGCACACGGCCAGGAGGAAGCCGAGAGAGGACGAGTT CAACAGCACGTACGGGGTGGTCAGCGTCCTGCGGATC CAGCACCAGGACTGGCTGCAGGGAAAGGAGTTCAAGT GCAAGGTCAACAACAAAGGCCTCCCGGCGCCCATTGT GAGGAGCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGCCCCGAG CCGCAGGTGTATGTCCTGGCCCCACCCCGGGAAGAGC TCAGCAAAAGCACGCCTCAGCGTCAGCTGCATGGTC GGTTTCTACCCAGACATAGACGTGGAGTGGCAGA GAAATGGGCAGCCTGAGTCGGAGGACAAGTACCACAC GACCGCACCCCAGGTGGATGGTGACGGCTCCTACTTC CTGTACAGCAGGCTCACGGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGGAAGGAGACCACTACACGTGTGCAGTGATGCATGAA GCTTTACGGAATCACTACAAAGAGAAGTCCATCTCGAG GTCTCCGGGTAAATGA （配列番号36）	ASTTAPKVYPLASRCGGTSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSMVTVPASTSETQT FTCNVAHPASSTKVDKAVTARRPVPT TPKTTPPGKPTTGESEVEKTPCQCSK CPEPLGGLSVFIFPPKPKDTLTISGTPE VTCVVVDVGQDDPEVQFSWFVDDVEV HTARTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQ DWLQGKEFKCKVNNKGLPAPIVRTISR TKGQARERPQVYVLAPPREELSKSTLSL TCLITGFYPEEIDVEWQRNGQPESEDKY HTTAPQLDADGSYFLYSELRVNKSSW QEGDHYTCAVMHEALRNHYKEKSISRS PGK* （配列番号28）	U63639		

ウシ(B)肝臓皆常領域(CL)	Ig lambda	CAGCCCAAGTCCCCACCGTCGGTCACCCTGTTCCCGC CCTCCACGGAGGAGCTCAACGGCAACAAGGCCACCCT GGTGTGTCTCATCAGCGACTTCTACCCCGGTAGCGTG ACCGTGGTCTGGAAGGCAGACGGCAGCACCATCAGCC GGAACGTGGAGACCACCCGGCCCTCCAAACAGAGCAA CAGCAAGTACGCGGCCAGGAGCTACCTGAGCCTGACG AGCAGCGACTGGAAATCGAAAGGCAGTTACAGCTGCG AGGTCACGCACGAGGGGAGCACGTGACGAAGACAGT GAAGCCTCAGAGTGTTCTTAG （配列番号7）	GPKSPPSVTLFPPSTEELNGNKATLVC LISDFYPGSVTVVWKADGSTITRNVETT RASKQSNSKYAASSYLSLTSSDWKSKG SYSCEVTHEGSTVTKTVKPSEOS* （配列番号3）	X62917	参考なし	Chan L. et al., Vet. Immunol. Immunopathol., 124, 284-294 (2008), PMID: 18538851

ヒツジ、スイギュウ、ヒトのL鎖定常領域及びH鎖定常領域のアミノ酸配列とヌクレオチド配列を下記の表にまとめた。

（表）

種名	Ig領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
ヒツジ（学名：*Ovis aries*）	ヒツジIg重鎖定常領域（CH1~CH3）	IgG1	GCCTCAAGAACACCCCCGAAAGTCTACCCTCTGACT TCTTGCTGCGGGGACACGTCCAGGTCCATCGTGACG CTGGGCTGCCTGGTCTCCAGCTATATGCCCGAGCCG GTGACCGTGAACTGGAACTCTGGTGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACGTTCCCGGCCATCCTGCAGTCCTCC GGGCTCTACTCTCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCG GCCAGCAGTGAGGAGCCGAGACCTTCATCTGCAAC GTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACGAAGGTGGACAAG CGTGTTGAGCCCGGATGCCCGGACCCATGCAAACAT TGCCGATGCCCACCCCTGAGGTCCCCGGAGGACC GTCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAACCCAAGGACAC CCTTACAATCTCTGGAACGCCCGAGGTCACGTGTGT GGTGGTGGACGTGGGCCAGGATGACCCCGAGGTGC AGTTCTCCTGGTTCGTGGACAACGTGGAGGTGCGCA CGGCCAGGACAAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACA GCACGTTCCGCCGTGGTCAGCGCCCTGCCCATCCAGC ACCAAGACTGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCA AGGTCCACAACGAAGCCCTCCCGGCCCCCATCGTGA GGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGGCCCGGGAG CCGCAGGTGTACGTCCTGCCGCCACCCCAGGAAGAG CTCAGCAAAAGCACGGTCAGCGTCACCTGCCTGGTC ACGGCTTCTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGTGG CAGAAAAATGGGCAGCCTGAGTCGGAGGACAAGTAC GGCACGACCACATCCCAGCTGGACGCCGACGGCTCC TACTTCCTGTACAGCAGGCTCAGGGTGGACAAGAAC AGGTGGCAAGAAGGAGACGCTACGCGTGTGTGGTG ATGCACGAGGGTCTGCACAACCACTACACACAGAAG TCGATCTCTAAGCCTCCGGGTAAATGA （配列番号38）	ASTTPPKVYPLTSCCGDTSSSSIVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALTSGVHTF PAILQSSGLYSLSSVVTVPASTSGAQT FICNVAHPASSTKVDKRVEPKPCPCK HCRCPPPELPGGPSVFIFPPKPKDTLTI SGTPEVTCVVVDVGQDDPEVQFSWFV DNVEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSAL PIQHQDWTGGKEFKCKVHNEALPAPIV RTISRTKGQAREPQVYVLAPPQEELSK STLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQKNGQP ESEDKYGTTTSQLDADGSYFLYSRLRV DKNSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQ KSISKPPGK* （配列番号37）	X69797	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=sheep&group=IGHC	Dufour V. et al., J. Immunol., 158, 2163-2170 (1996), PMID: 8690905
		IgG2	GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGACT TGTTGCTGCGGGGACACGTCCAGGTCCAGGTGCATCG GTGACCCTGGGCTGCCTGGTCTCCAGCTATATGCCC GAGCCGGTGACCGTGAGGTGGAACTCTGGTGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCCATCCTGCAG TCCTCCGGGCTCTACTCTCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCGGCCAGCAGCTCGAGGAGCCDCAGACCTTCATC TGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGGGCCAAGGTG GACAAGCGTGTTGAGCCCAAGGGCCCATCCATCGA ATCACAGGAACGCCCGAGGTCACGTGTGTGGTGGTG GACGTGGGCCAGGGTGACCCCGAGGTGCAGTTCTCC TGGTTCGTGGACAAGGTGGAGGTGCCCACGGCCAGG ACAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTTC CGCGTGGTGAGCGCCCTGCCCATCCAGCACGACCAC TGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCCAC AGCAAAGGCCTCCCGGCCCCCATCGTGAGGACCATC TCCAGGGCCAAAGGGCAGGCCCGGGAGCCCCAGGT GTACGTCCTGGCCCCACCCCAGGAAGAGCTCAGCAA AAGCAGGTCTGAGCGTCACCTGCCTGGTCACCGGCTT CTACCCAGACTACATCGCCGTGGAGTGGCAGAGAGC GCGGCAGCCTGAGTCGGAGGACAAGTACGGCACGAC CACATCCCAGCTGGAGGCCGAGGGCTCCTACTTCCT GTACAGCAGGCTCAGGGTGGACAAGAGCAGGTGGCA AAGAGGAGAGCCTACGCGTGTGTGGTGATGCACGA GGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCATCTC TAAGCCTCCGGGTAAATGA （配列番号40）	ASTTAPKVYPLTSCCGDTSSSSSIVTL GCLVSSYMPEPVTVTWNSGALTSGVH TFPAILQSSGLYSLSSVVTVPASTSGA QTFICNVAHPASSAKVDKRVGISSDPS KCSKPPCVSRPSVFIFPPKPKDSLMITG TPEVTCVVVDVGQDDPEVQFSWFVDN VEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSALPI QHDHWTGGKEFKCKVHSKGLPAPIVRT ISRAKGQAREPQVYVLAPPQEELSKST LSVTCLVTGFYPDYIAVEWQRAROPES EDKYGTTTSQLDADGSYFLYSRLRVDK SSWQRGDTYACVVMHEALHNHYTQKS ISKPPGK* （配列番号39）	X70983		Clarkson C.A. et al., Mol. Immunol., 30, 1195-1204 (1993), PMID: 8413324
	ヒツジIg軽鎖定常領域	Ig kappa(CK)	CCATCCGTCTTCCGTCTTCAAAGCATCTGAGGAACAG CTGAGGACCGGAACTGTCTCTGTGCTGTGCTTGCTG AATGATTTCTACCCCAAAGATATCAATGTCAAGGTGA AAGTGGATGGGGTTACCCAGAACAGCAACTTCCAGA ACAGCTTCACAGACCAGGACAGCAAGAAAAGCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGTCCAAGGCTGAG AGTACCAGAGCCATAACGCCTATGCGTGTCAGGTCA CCCACGAAGGGCTCCCCGTCACCAAGAGCTT TCAATAAGAATGAATGTTAG （配列番号42）	PSVFLFKPSEEQLRTGTVSVVCLVNDF YPKDINVKVKVDGVTQNSNFQNSFTDQ DSKKSTYSLSSTLTLSSSEYQSHNAYA CEVSHKSLPTALVKSFNKNEG* （配列番号41）	X54110	登録なし	Jenne C.N. et al., Dev. Comp. Immunol., 30 (1-2), 165-174 (2006), PMID: 16083958
		Ig lambda(CL)	GGTCAGCCCAAGTCGCCACCCTCGGTCACCCTCTTC CCGCCTTCGAGGAGCTGAGTACCAACAAGGCC ACCCTCGTGTGTCTCATCAACGACTTCTACCCGGGT AGCGTGAACGTGGTCTGGAAGGCAGATGGCAGCACC ATCAATCAGAACGTGAAGACCACCCGAGGCCTCCAAA CAGAGCAACAGCAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTG ACCCTGACGGCGAGCGAGTGGAAGTCTAAGAGCAGT TACACCTGCGAGGTCACGCACGAGGGGAGCACCGTG ACGAAGACAGTGAAGCCCTCAGAGTGTTGTTAG （配列番号44）	GQPKSAPSVTLFPPSTEELSTNKATVV CLINDFYPGSVNVVWKADGSTINQNVK TTQASKQSNSKYAASSYLTLTGSEWKS KSSYTCEVTHEGSTVTKTVKPSECS* （配列番号43）	AY734681		

種名	Ig領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
スイギュウ(学名：*Bubalus bubalis*)	スイギュウIg重鎖定常領域(CH1~CH3)	IgG1?	GAGGGGCGTGGAGACCTTCCCGGCGCGTCCTTCAGTGC TCCGGGCTCTACTCTCTCAGCAGCAGGGTGACCGCGC CCGCCAGGGCCACAAAAAGCCAGACGTTGACCTGCAA CGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACGAAGGTGGACAAG GCTGTTGTTCCCCCATGGAGACCCGAAACCCTGTGATTC CTGCCGACCCCCTGAGCTCCCCGGAGGACCCTCTGTG TTCATCTTCCCACCAAAACCCAAGGACACCCTCACAAT CTCTCCAAGTGCTGAGGTCACGTGTGTGGTGGTGGAG GTGGGCCACGATGACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGG TTCGTGGACGATGTGGAGGTAAACACAGCCAGGACGAA GCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTG GTCAGCGCCCTGCCCATCCAGCACAACGACTGGACTG GAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCTACAATGAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGTGAGGACCATCTCCAAGGACCA AAGGGCAGGCCCGCGAGCCGCAGGTGTACGTCCTGCC CCCAGCCGAGGAGCTCAGCAAAACGCAGGTCAGC ATCACTTGCATGGTCAAGGACTTCTACCCAGACATCAT CGCCGTGAGATGGCAGAAAGATGGGCAGCCTGAGTCA GAGGACAAATATGCCACCACCCCGCCCCAGCTCGACA GCCATCGCTCTACTTCGCTCTACAGCAAGCTCACCGT GAACAAGAACAGCTGGCAAGAAGGAGCCGCCTACACG TGTGTAGTGATGCATGAGGC (配列番号46)	ASVHTFPAVLQSSGLYSLSSTVTAPAS ATKSQTFTCNVAHPASSTKVDKAVVP PCRPKPCDCCPPPELPGGPSVFIFPPK PKDTLTISGTPEVTCVVVDVGHDDPEV KFSWFVDDVEVNTARTKPREEQFNSTY RVVSALPIQHNDWTGGKEFKCKVYNEG LPAPIVRTISRTKGQAREPQVYVLAPP QDELSKSTVSITCMVTGFYPDYIAVEW QKDGQPESEDKYGTTPPQLDSDGSYF LYSRLRVNKNSWQEGGAYTCVVMHE (配列番号45)	NW_00569080 3	登録なし	なし
		IgG2?	GCCTCCATCAGAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGACTTC TTGCCGCCGGGGAAACGTCCAGCTCCACCGTGACCCTG GGCTGCCTGGTGTCGAGCTACATGCCCGAGCCGGGTGA CCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCGTGAAGACCGCCGT GCACACCTTCCCGGCCGTCCTTCAGTCCTCTGGGCTC TACTCTCTCAGCAGCACGGTGACCGTCCCCTCCAGCG CCACAAAAGCCAACGCTTCACCTGCAACCGTACCCCAG CCGGCCAGGAGCACCAAGGTGCACACCGGCTGTTCGGT TCTCCAGTGACTGCTGCAAGTTTCGTAAGCCTTGTGTG AGGGGACGATCTGTCTTCATCTTCCCGCCGAAACCCAA AGACACCCTGATGATCACAGGAAATCCGGAGGTGACAT GTGTGGTGGTGGACGTGGGCCGGGATAACCCCGAGGT GCAGTTCTCCTGGTTCGTGGGTGATGTGGAGGTGCAC ACGGCAGGTCGAAGCCGAGACAGGAGCAGTTCAACA GCACCTACCGCGTGGTCAGCACCCTGCCCATCCAGCA CAATGACTGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAG GTCAACAACAAAGCCTCCCAGCCCCCATCGTGAGGA CCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGCCCCGGGAGCCGCA GGTGTACGTCCTGCCCCACCCCCAGGAAGAGCTCAGC AAAAGGACGGTCAGCGTCACTTGCATGGTGACTGGCTT CTACCCAGACTACATCGCCGTAGAGTGGCATAGACCG GGCAGGCTGAGTCGGAGGACAAGTACCGCACGACCCC GCCCCAGGTGCACAGGGATGGCTCCTACTTCCTGTAC AGCAGGCTCAAGGTGAACAAGAACAGCTGGCAAGAAG GAGGCCGCTACACGTGTGTAGTGATGCATGAGGC (配列番号48)	ASITAPKVYPLTSCRGETSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSTVTAPASATKSQT FTCNVAHPASSTKVDTAVGFSSDCGK FPKPCVRGPSVFIFPPKPKDTLMITGNP EVTCVVVDVGRDNPEVGFSWFVGDVE VHTGRSKPREEQFNSTYRVVSTLPIQH NDWTGGKEFKCKVNNKQLPAPIVRTIS RTKGQAREPQVYVLAPPGEELSKSTVS VTCMVTGFYPDYIAVEWHRDRQAESD KYRTTPPQLDSDGSYFLYSRLKVNKNS WQEGGAYTCVVMHE (配列番号47)	NW_00576614 3		
		IgG3?	GCCTGCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTGTGGCAT CCAGCTGCGGGGACACGTCCACGGTCCACCGTGACCGT GGGCTGCCTGGTCCACGCTACATGCCCGAGCCGGGTG ACCGTGACCTGCAACTCGGGTGCCGTCAAGACCGCCG TGCAGACCTTCCCGCCGTCCTCCGCCAGTCCTCCGGGCT CTACTCTCTCAGCAGCGATGGTGACCATGCCCACCAGCA CCGCCAGGAACCCAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCA CCCGGCCAGCAGGACCAAGGTGGACAGGCCTGTCACT CCAAGGCATCCGGTCCCGAAGACACCAGAGACAGCTA TCCATCGTGTAAAACCCCCAAGCCAGGAGCCCAGAGAT GAAAAGACACCCTGCCAGTGTCCCAAATGCCCAGAACC TCTGGGAGGACTGTCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAAC CCAAGGACACCCTCACAATCTCTGGAAGGCCCGAGGT CACGTGTGTGGTGGTGCACGTGGGCCAGGATGACCCC GAAGTGCAGTTCTCCTGGTTCGTGGATGACGTGGAGG TGCACACAGCCCAGGATGAGGCAAGAGAGGAGCAGTT CAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGCGCCCTGCCCATC CAGCACCAGGACTGGCTGCGGAAAAGGAGTTCAAGT GCAAGGTCAACAACAAAGCCCTCCCGGGCCCCATCGT GAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCAGGCCCGGGAG CCACAGGTGTATGTCCTGCCCCACCCCCGGGAAGAGC TCAGCAAAAGCACGCTCAGCCTCACCTGCCTAATCACC GGCTTCTACCCGAGAAGAGGTAGACGTGGAGTGGGAGA GAAATGGGGAGCCTGAGTCAGAGGACAAGTACGACAC GACCCCACCCCAGGTGGACGCTGAGGGCTCCTACTTC CTGTACAGCAGGCTCAGGGTGAACAGGAGCAGCTGGC AGGAAGGAGACCACTACACGTGTGCAGTGATGCATGAA GCTTTACCGAATCACTACAAAGAGAAGCCCATCTCGAG GTCTCCGGGTAAATGA (配列番号50)	ASTTAPKVYPLASSCGDTSSSTVTLGC LVSSYMPEPVTVTWNSGALKNGVHTF PAVRQSSGLYSLSSMVTMPTSTAGTQ TFTCNVAHPASSTKVDTAVTARHPVP KTPETPIHPVKPPTIQEPRDEKTPQDCP KQPEPLGGLSVFIFPPKPKDTLTISGTP EVTCVVVDVGQDDPEVQFSWFVDDVE VHTARMKPREEQFNSTYRVVSALPIGH QDWLRGKEFKCKVNNKGLPAPIVRTISR TKGQAREPQVYVLAPPREELSKSTLSL TGLITGFYPEEVDVEWQRNGQPESEDK YHTTPPQLDADGSYFLYSRLRVNRSSW QEGDHYTCAVMHEALRNHYKEKPISRS PGK* (配列番号49)	NW_00578420 6		
	スイギュウIg軽鎖定常領域(CL)	Ig lambda?	CAGCCCAAGTCCGCACCCTCAGTCACCCTGTTCCCAC CCTCCAGGAGGAGCTCAGGGCCAACAAGGCCACCCT GGTGTGTCTCATCAGCGACTTGTACCCGGGTAGGATGA CCGTGGCCAGGAGGCAGACGGCAGGCCGATGACCCG GAAGGTGGAGACCACCCCGCCTCCAAACAGAGCAAC AGCAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGG GCAGCGAGTGGAAATCGAAAGCAGTTACAGCTGCGA GGTCACGCACGAGAGCGGAGCACCGTGACAAAGACAGTG AAGCCCTCAGAGTGTTCTTAG (配列番号52)	QPKSAPSVTLFPPSTEELSANKATLVC LISDFYPGSMTVAWKADGSTITRNVETT RASKQSNSKYAASSYLSLTGSEWKSKG SYSCEVTHEGSTVTKTVKPSECS* (配列番号51)	NW_00569078 6	登録なし	なし

種名	Ig領域		塩基配列	アミノ酸配列	GenBank Accession No.	IMGT Database	Reference
ヒト（学名：*Homo sapiens*）	ヒIg重鎖定常領域（CH1~CH3）	IgG4 variant 1	GAGTCCAAATATGGTCCGCCCATGGCCATCATGCCCA GCACGTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTG TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTA ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGA （配列番号54）	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK* （配列番号53）	K01316	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=IGHC	Ellison J. et al., DNA, 1, 11-18 (1981). PMID: 6299662
		IgG4 variant 2	GAGTCCAAATATGGTCCCCCGTGCCCATCATGCCCA GCACGTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTG TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTA ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGA （配列番号55）	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK* （配列番号55）	AJ001553		Brusco A. et al., Eur. J. Immunogenet., 25, 349-355 (1998). PMID: 9805857
		IgG4 variant 3	GCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTG TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTAC GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGA （配列番号58）	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG K* （配列番号57）	AJ001554		
	ヒIg軽鎖定常領域	Ig kappa(CK)	ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG （配列番号60）	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* （配列番号59）	X96754	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=IGKC	なし

配列番号３、２１～２８、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、及び５９のアミノ酸配列においては、１若しくは複数個（例えば、５個以下、多くても１０個程度）のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよく、これらの変異が導入されても、Ig重鎖又は軽鎖の定常領域としての機能を有しうる。

[0043] ヒトIgG1の定常領域は野生型ではADCC活性およびCDC活性を持つが、特定の部分にアミノ酸置換や欠損を加えることにより、それらの活性を低下させられることが知られている。ヒト以外の動物において、ヒトIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域が同定されていない場合、ヒトIgG1に相当する免疫グロブリンの当該領域に変異を加え、ADCC活性およびCDC活性を低下させたも

のを使用することができる。

[0044] 本発明は、(a’)QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNAと、(b’)GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNAとを含む、人工遺伝子DNAを提供する。また、本願発明は、QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNAも提供する。さらに、本発明は、GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNAも提供する。

[0045] (a)QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖、並びに、(b) GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖については、上述した。(a’)のDNAは(a)のL鎖をコードするDNA（遺伝子）であり、(b’)のDNAは(b)のH鎖をコードするDNA（遺伝子）であり、(a’)のDNAと(b’)のDNAとを含む人工遺伝子DNAは、市販の合成機を用いて合成することができる。人工遺伝子DNAには、制限酵素認識部位、KOZAK配列、ポリA付加シグナル配列、プロモーター配列

、イントロン配列などを付加してもよい。

[0046] また、本発明は、前記人工遺伝子DNAを含むベクターも提供する。

[0047] ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、ｐＢＲ３２２，ｐＢＲ３２５，ｐＵＣ１２，ｐＵＣ１３）、枯草菌由来のプラスミド（例、ｐＵＢ１１０，ｐＴＰ５，ｐＣ１９４）、酵母由来プラスミド（例、ｐＳＨ１９，ｐＳＨ１５）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス，ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫病原ウイルスなどを用いることができる。後述の実施例では、pDN112 (Marzi A, Yoshida R, Miyamoto H, Ishijima M, Suzuki Y, Higuchi M, Matsuyama Y, Igarashi M, Nakayama E, Kuroda M, Saijo M, Feldmann F, Brining D, Feldmann H, Takada A. PLoS One, 7:e36192, Apr. 27, 2012; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology, 142(4):551-561, Aug. 2014.)を用いた。

[0048] ベクターには、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリＡ付加シグナル、イントロン配列、選択マーカー、SV40複製オリジンなどを付加してもよい。

[0049] さらに、本発明は、前記ベクターにより形質転換された宿主細胞も提供する。この宿主細胞を培養し、培養物から抗体を採取することにより、抗PD-1抗体を製造することができる。よって、本発明は、前記宿主細胞を培養し、培養物から抗PD-1抗体を採取することを含む、抗体の製造方法も提供する。本発明の抗体の製造方法において、L鎖をコードするDNAとH鎖をコードするDNAを含む人工遺伝子DNAを組み込んだベクターを宿主細胞にトランスフェクションしてもよいし、L鎖をコードするDNAを組み込んだベクターとH鎖をコードするDNAを組み込んだベクターを宿主細胞にコトランスフェクションしてもよい。

[0050] 宿主細胞としては、細菌細胞（例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、枯草菌など）、真菌細胞（例えば、酵母、アスペルギルスなど）、昆虫細胞（例えば、S2細胞、Sf細胞など）、動物細胞（例えば、CHO細胞、COS細胞

、HeLa細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293細胞など）、植物細胞などを例示することができる。このうち、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損細胞であるCHO-DG44細胞(CHO-DG44(dhfr-/-))が好ましい。

[0051] 組換えベクターを宿主に導入するには、Molecular Cloning 2nd Edition, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法（例えば、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、トランスフェクション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、エレクロトポレーション法、形質導入法、スクレープローディング法、ショットガン法など）または感染により行うことができる。

[0052] 形質転換体を培地で培養し、培養物から本発明の抗PD-1抗体を採取することができる。抗体が培地に分泌される場合には、培地を回収し、その培地から抗体を分離し、精製すればよい。抗体が形質転換された細胞内に産生される場合には、その細胞を溶解し、その溶解物から抗体を分離し、精製すればよい。

[0053] 培地としては、OptiCHO培地、Dynamis培地、CD CHO培地、ActiCHO培地、FortiCHO培地、Ex-Cell CD CHO培地、BalanCD CHO培地、ProCHO 5培地、Cellvento CHO-100培地などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

[0054] 培地のｐＨは培養する細胞により異なるが、一般的にはｐＨ６．８～７．６、多くの場合ｐＨ７．０～７．４が適当である。

[0055] 培養する細胞がCHO細胞である場合、CHO細胞の培養は当業者に公知の方法を用いて行うことができる。例えば、通常、気相のCO_2濃度が0－40%、好ましくは、2－10%の雰囲気下、30－39℃、好ましくは37℃程度で、培養することが可能である。

[0056] 適当な培養期間は、通常１日～３か月であり、好ましくは１日～３週間である。

[0057] 抗体の分離及び精製は、公知の方法により行うことができる。公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度の差を利用する方法、透

析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

[0058] 本発明の抗PD-1抗体は、動物用又はヒト用の抗体医薬として利用することができる。よって、本発明は、上記の抗PD-1抗体を有効成分として含む、医薬組成物を提供する。

[0059] 本発明の医薬組成物は、がん及び／又は感染症の予防及び／又は治療に用いることができる。がん及び／又は感染症としては、腫瘍性疾患（例えば、悪性黒色腫、肺がん、胃がん、腎臓がん、乳がん、膀胱がん、食道がん、卵巣がん等）、白血病、ヨーネ病、アナプラズマ病、細菌性乳房炎、真菌性乳房炎、マイコプラズマ感染症（例えば、マイコプラズマ性乳房炎、マイコプラズマ性肺炎など）、結核、小型ピロプラズマ病、クリプトスポリジウム症、コクシジウム症、トリパノソーマ病及びリーシュマニア症などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

[0060] 本発明の抗PD-1抗体をPBSなどの緩衝液、生理食塩水、滅菌水などに溶解し、必要に応じてフィルターなどで濾過滅菌した後、注射により被験動物（ヒトも含む）に投与するとよい。また、この溶液には、添加剤（例えば、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、安定化剤、保存剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤、pH調節剤など）などを添加してもよい。投与経路としては、静脈、筋肉、腹腔、皮下、皮内投与などが可能であり、また、経鼻、経口投与してもよい。

[0061] 本発明の抗PD-1抗体の投与量、投与の回数及び頻度は、被験動物の症状、年齢、体重、投与方法、投与形態などにより異なるが、例えば、通常、成獣一匹当たり0.1～100mg/kg体重、好ましくは、1～10mg/kg体重を、少なくとも１回、所望の効果が得られる頻度で投与するとよい。

[0062] 本発明の医薬組成物は、単独で用いてもよいが、外科手術、放射線療法、がんワクチンなど他の免疫療法や分子標的治療薬と組み合わせて用いてもよい。これにより、相乗効果が期待できる。

実施例

[0063] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例１〕ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の樹立

序論

免疫抑制受容体Programmed death 1 (PD-1) とそのリガンドであるProgrammed death ligand 1 (PD-L1)は過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容に深く関連している因子として京都大学、本庶 佑氏らによって同定された分子である。腫瘍における免疫抑制に関与していることも近年明らかにされている。本実施例では、ウシの感染症に対する新規治療法の樹立を目的にウシPD-1およびPD-L1の結合を阻害可能なラット抗ウシPD-1モノクローナル抗体5D2の可変領域遺伝子と、ウシ免疫グロブリン（ウシIgG1およびIgλ。ただし、 ADCC活性を抑制するために、ウシIgG1 CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（図１、図１１）。アミノ酸番号及び変異: 250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G→deletion, 347 A→S, 348 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology, 142(4):551-561; Aug. 2014.）の定常領域遺伝子を組み合わせたキメラ抗体遺伝子を発現するチャイニーズハムスター卵巣細胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO細胞）を培養増殖させて得たラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2を作製し、in vitro及びin vivoの効果を確認した。

[0064] 材料、方法、および実験結果

2.1. ウシPD-1およびPD-L1発現細胞の構築

ウシPD-1遺伝子 (GenBank accession number AB510901; Ikebuchi R, Konnai S, Sunden Y, Onuma M, Ohashi K. Microbiol. Immunol., 54(5):291-298; May 2010.）およびウシPD-L1遺伝子 (GenBank accession number AB510902

; Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K. Vet. Res., 42:103; Sep. 26, 2011.）についてcDNA全長の塩基配列を決定し、その遺伝子情報よりウシPD-1またはPD-L1発現細胞を作製した。まず、ウシPD-1またはPD-L1発現プラスミドを作製するため、合成したウシ末梢血単核球（PBMC） 由来cDNA を鋳型として、5´末端側に制限酵素NotIおよびHind III（ウシPD-1）、あるいはNheIおよびXhoI（ウシPD-L1）認識部位を付加したプライマー（boPD-1-myc FおよびR、あるいはboPD-L1-EGFP FおよびR）を用いてPCR を行った。得られたPCR 産物をNotI（Takara社）およびHindIII（Takara社; ウシPD-1）、あるいはNheI（Takara社）およびXhoI（Takara社; ウシPD-L1）により処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics 社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpCMV-Tag1 vector（Agilent Technologies社; ウシPD-1）またはpEGFP-N2 vector（Clontech社; ウシPD-L1）へ導入し、クローニングを行った。得られた目的の発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen 社）用いて抽出し、実験に供するまで-30℃で保存した。以降、作製した発現プラスミドをpCMV-Tag1-boPD-1またはpEGFP-N2-boPD-L1と表記する。

プライマー（boPD-1-myc F）： ATATGCGGCCGCATGGGGACCCCGCGGGCGCT（配列番号６１）

プライマー（boPD-1-myc R）： GCGCAAGCTTTCAGAGGGGCCAGGAGCAGT（配列番号６２）

プライマー（boPD-L1-EGFP F）：CTAGCTAGCACCATGAGGATATATAGTGTCTTAAC（配列番号６３）

プライマー（boPD-L1-EGFP R）： CAATCTCGAGTTACAGACAGAAGATGACTGC（配列番号６４）

以下の手順に従い、ウシPD-1発現細胞を作製した。まず、4×10^6 個のCHO-DG44 細胞に2.5 μg のpCMV-Tag1-boPD-1をLipofectamine LTX（Invitrogen社）を用いて導入した。48 時間後、G418（Enzo Life Science社）800 μg/ml、GlutaMAX supplement（Life technologies 社） 20 ml/l、10% Pluronic F

-68（Life technologies 社）18 ml/l を含むCD DG44 培地（Life technologies 社）へ培地交換し、セレクションを行った。得られた発現細胞をラット抗ウシPD-1抗体5D2 と室温で反応させ、洗浄後、抗ラットIgGマイクロビーズ標識抗体（Miltenyi Biotec社）と室温でさらに反応させた。Auto MACS（Miltenyi Biotec社）を用いてウシPD-1を高発現する細胞を分離し、さらに純度を高めるため同様の手順で再分離を行った。作製した発現細胞について限界希釈法によりクローニングを行い、ウシPD-1高発現CHO DG44細胞を得た（ウシPD-1発現細胞）。

[0065] 以下の手順に従い、ウシPD-L1膜発現細胞を作製した。まず、4×10^6 個のCHO-DG44 細胞に2.5 μg のpEGFP-N2-boPD-L1あるいは陰性対照としてpEGFP-N2をLipofectamine LTX（Invitrogen社）を用いて導入した。48 時間後、G418（Enzo Life Science社）800 μg/ml、GlutaMAX supplement（Life technologies 社）20 ml/l、10% Pluronic F-68（Life technologies 社）18 ml/l を含むCD DG44 培地（Life technologies 社）へ培地交換し、セレクションを行うと同時に限界希釈法によりクローニングを行った（ウシPD-L1発現細胞）。作製した発現細胞におけるウシPD-L1 の発現を確かめるために、倒立型共焦点レーザー顕微鏡LSM700（ZEISS 社）により、EGFPの細胞内局在を可視化した。

[0066] 2. 2. 可溶性ウシPD-1の構築

以下の手順に従い、ウシPD-1-Ig発現プラスミドを構築した。ウシPD-1（GenBank accession number AB510901）のシグナルペプチドおよび細胞外領域を既知のウシIgG1（GenBank accession number X62916）の定常領域と結合させた遺伝子配列を作成し、CHO細胞にコドンの最適化を行った後、制限酵素（NotI）認識配列、KOZAK配列、ウシPD-1シグナルペプチド配列、ウシPD-1遺伝子細胞外領域配列、ウシIgG1 Fc領域配列、制限酵素（XbaI）認識配列を上記の順で配置するように遺伝子合成を行った。なお、ウシIgG1はADCC活性を抑制するために、CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（変異挿入箇所: 185 E→P, 186 L→V, 187 P→A, 189 G→deletion, 281 A→S, 282

P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology, 142(4):551-561; Aug. 2014. この論文のFigure 2にPD-1-Igのアミノ酸配列、変異挿入箇所が掲載されている）。合成した遺伝子鎖をNotI（Takara社）およびXbaI（Takara社）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics 社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行った発現用ベクターpDN11（北海道大学　人獣共通感染症リサーチセンター　鈴木　定彦　教授より分与）のクローニングサイト（PCMV下流、INRBGとPABGHの間にあるNotIおよびXbaI制限酵素認識配列）へ組み込み、ウシPD-1-Ig発現ベクターを構築した。発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen 社）によって精製し、実験に供するまで-30°Cにて保存した。以降、作製した発現プラスミドをpDN11-boPD-1-Igと表記する。

[0067] 以下の手順に従い、ウシPD-1-His発現プラスミドを構築した。ウシPD-1（GenBank accession number AB510901）のシグナルペプチドおよび細胞外領域を増幅するように、5´末端側に制限酵素NotIおよびXhoI認識部位を付加したプライマー（boPD-1-His FおよびR）を設計した。なお、リバースプライマーには6×ヒスチジン（His）タグをコードする遺伝子配列を付加した。合成したウシPBMC由来cDNAを鋳型にPCRを行い、それぞれのPCR産物をNotI （Takara社） およびXhoI （Takara社）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpCXN2.1(+) vector（Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Gene, 108(2):193-199; Dec. 15, 1991; 順天堂大学大学院医学研究科　横溝　岳彦　教授より分与）に導入し、クローニングを行った。発現プラスミドはFastGene Xpress Plasmid PLUS Kit（NIPPON Genetics社）によって精製し、実験に供するまで-30°Cにて保存した。以降、作製した発現プラスミドをpCXN2.1-boPD-1-Hisと表記する。

プライマー（boPD-1-His F）：ATAAGAATGCGGCCGCCACCATGGGGACCCCGCGGGCGCT（配列番号６５）

プライマー（boPD-1-His R）：GCCCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGGATGACCAGGCTCTGCATCT（配列番号６６）

[0068] 以下の手順に従い、可溶性ウシPD-1-Ig発現細胞を作製した。4×10^6 個のCHO-DG44 細胞に2.5 μg のpDN11-boPD-1-IgをLipofectamine LTX（Invitrogen社）を用いて導入した。48 時間後、G418（Enzo Life Science社）800 μg/ml、GlutaMAX supplement（Life technologies 社）20 ml/lを含むCD OptiCHO培地（Life technologies 社）へ培地交換し、3週間培養してセレクションを行った。得られた細胞株の培養上清中のFc 融合組換えタンパク質の濃度は抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗体（Rockland社）を用いたELISA法を用いて測定し、Fc 融合組換えタンパク質を高発現する細胞株の選別を行った。得られた高発現細胞株はG418 を含まない培地に移し、14日間振盪培養を行って培養上清を回収した。Fc 融合組換えタンパク質を含む培養上清は、Centricon Plus-70（Millipore 社）を用いて限外濾過した後に、Ab-Capcher Extra（ProteNova 社）を用いてFc 融合組換えタンパク質を精製した。精製後、PD-10 Desalting Column（GE Healthcare 社）によりバッファーをリン酸緩衝生理食塩水（PBS; pH 7.4）に置換し、実験に供するまで-30° C にて保存した（ウシPD-1-Ig）。精製後のウシPD-1-Ig の濃度は抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗体（Rockland社）を用いたELISA法により測定した。ELISA の各洗浄操作にはAuto Plate Washer BIO WASHER 50（DS Pharma Biomedical 社）を使用し、吸光度の測定にはMicroplate Reader MTP-650FA（コロナ電気社）を使用した。

[0069] 以下の手順に従い、可溶性ウシPD-1-His発現細胞を作製した。7.5×10^7 個のExpi293F 細胞（Life Technologies 社）に30 μg のpCXN2.1-boPD-1-HisをExpifectamine（Life Technologies社）を用いて導入し、7 日間振盪培養を行って培養上清を回収した。培養上清からTALON Metal Affinity Resin（Clontech社; ウシPD-1-His）を用いて組換えタンパク質を精製した。精製後、PD MiniTrap G-25（GE Healthcare 社）によりバッファーをPBS（pH 7.4）に置換し、実験に供するまで-30° C にて保存した（ウシPD-1-His）。精製後の

ウシPD-1-His濃度は、Nanodrop8000 Spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific社）を用いて測定した吸光度（280 nm）により定量した。

[0070] 2.3. ラット抗ウシPD-1モノクローナル抗体産生細胞の作製

ウシPD-1-Ig（前述）をラットの足蹠に免疫し、腸骨リンパ節法を用いてハイブリドーマを樹立して、ラット抗ウシPD-1モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 5D2株を得た。ラット抗ウシPD-1モノクローナル抗体の樹立法については、以下の非特許文献にその詳細が記載されている（Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Vet. Res., 44:59; Jul. 22, 2013）。

[0071] 2.4. ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体発現ベクターの作製

ラット抗ウシPD-1抗体5D2を抗体可変領域としてウシIgG1およびウシIgλの抗体定常領域を融合させた、ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2を樹立した。

[0072] まず、ラット抗ウシPD-1 抗体5D2を産生するハイブリドーマより可変領域（重鎖および軽鎖）の遺伝子をRACE法により同定した。次に、ラット抗ウシPD-1 抗体5D2の重鎖および軽鎖可変領域配列を既知のウシIgG1（重鎖; GenBank Accession number X62916を改変）およびウシIgλ（軽鎖; GenBank Accession number X62917）の定常領域と結合させた遺伝子配列を作成し、コドン最適化を行った（配列番号９および１０（アミノ酸配列）、配列番号１４および１５（コドン最適化後ヌクレオチド配列）。なお、ウシIgG1にはADCC活性を抑制するために、CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（図１、図１１参照。アミノ酸番号及び変異: 251 E→P, 252 L→V, 253 P→A, 254 G→deletion, 348 A→S, 349 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology, 142(4):551-561; Aug. 2014.）。そして、NotI制限酵素認識配列、KOZAK配列、キメラ抗体軽鎖配列、ポリA付加シグナル配列（PABGH）、プロモーター配列（PCMV）、SacI制限酵素認識配列、イントロン配列（INRBG）、KOZAK配列、キメラ抗体重鎖配列、XbaI制限酵素認識配列を上記の順で配置するように

遺伝子を人工的に合成した。合成した遺伝子鎖をNotI（Takara社）およびXbaI（Takara社）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics 社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行った発現プラスミドpDN112（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター鈴木定彦教授より分与）のクローニングサイト（PCMV下流、INRBGとPABGHの間にあるNotIおよびXbaI制限酵素認識配列）へ導入し、クローニングを行った（図２）。得られた目的の発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen 社）用いて抽出し、実験に供するまで-30℃で保存した。以降、作製した発現プラスミドをpDN112-boPD-1ch5D2と表記する。

[0073] 2.5. ラットーウシキメラ抗ウシPD-1抗体の発現（図３）

作製したpDN112-boPD-1ch5D2をLipofectamine LTX（Life technologies 社）を用いて、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損（$dfhr^{-/-}$）細胞であるCHO-DG44 細胞へ導入した。48 時間後、2mM GlutaMAX supplement（Life technologies 社）およびG418 sulfate 800 μg/ml（Enzo Life Science社）を含むCD OptiCHO培地（Life technologies 社）へ培地交換し、3週間培養して発現細胞のセレクションおよび限界希釈法によるクローニングを行った。次に、抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗体（Rockland社）を用いたドットブロット法およびELISA法により培養上清に含まれるキメラ抗体の濃度を測定し、高発現クローンを選抜した。さらに、選抜したラットーウシキメラ抗ウシPD-1抗体高発現クローンに対して、60 nM のメトトレキサート（Mtx; 和光純薬工業社）を含む培地で負荷をかけることにより遺伝子増幅処理を行った。以上のようにして樹立したラットーウシキメラ抗ウシPD-1抗体安定発現細胞を、Mtxを含まないCD OptiCHO培地へ移し、14 日間の振盪培養を行った（125 rpm, 37℃, 5% CO_2）。抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗体（Rockland社）を用いたELISA法を用いて、培養上清中のキメラ抗体産生量を定量した。なお、ELISA の各洗浄操作にはAuto Plate Washer BIO WASHER 50（DS Pharma Biomedical 社）を使用し、吸光度の測定にはMicroplate Reader MTP-650FA（コロナ電気社）を使用した。14 日目の培養上清を10,000 g で10 分間遠心して

細胞を除いた後、遠心上清をSteritop-GP 0.22 μmフィルター（Millipore社）に通して滅菌し、精製に供するまで4°C にて保存した。

[0074] 結果を図３Ａに示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体発現細胞株のうち、最も産生量が高いクローンは、14日間の振盪培養で91.7 mg/Lのキメラ抗体を培養上清中に分泌した。

[0075] 2.6. ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の精製

上記の方法により準備した培養上清から、Ab Capcher Extra（ProteNova社）を用いて各キメラ抗体を精製した。レジンへの結合はオープンカラム法を用い、平衡化バッファーおよび洗浄バッファーとして1.5 M Glycine/3 M NaCl（pH 8.0）を使用した。溶出バッファーには0.1 M Glycine-HCl（pH 2.8）を、中和バッファーには1M Tris（pH 9.0）を使用した。精製した抗体は、PD-10 Desalting Column（GE Healthcare 社）およびAmicon Ultra-15（50 kDa、Millipore社）を用いて、PBS（pH 7.4）へのバッファー置換および濃縮を行った。精製したキメラ抗体は、0.22 μm シリンジフィルター（Pall Life Sciences 社）を通して滅菌し、実験に供するまで4°C にて保存した。

[0076] 2.7. ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の精製純度の確認（図３）

精製したラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の純度を確かめるため、SDS-PAGE およびCBB 染色により抗体タンパク質の検出を行った。精製したラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2をLaemmli Sample Buffer（Bio-Rad社）に懸濁し、還元条件下（2-メルカプトエタノール（Sigma-Aldrich社）により還元）または非還元条件下にて変性処理（95°C、5分）を行った。調製したサンプルは10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。この際、分子量マーカーとしてPrecision Plus Protein All Blue Standards（Bio-Rad社）を用いた。 泳動後、Quick-CBB（和光純薬工業社）によりゲルの染色を行い、続いて蒸留水中で脱色を行った。

結果を図３Ｂに示す。還元条件では25kDa（軽鎖）および50kDa（重鎖）、非還元条件では150kDaの想定した位置にラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体のバンドが確認された。

[0077] 2.8. ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の結合特異性（図４）

ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体がウシPD-1発現細胞（前述）に特異的に結合することをフローサイトメトリー法により確認した。まず、ウシPD-1発現細胞に対してラット抗ウシPD-1抗体5D2またはラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2を室温で30分間反応させた。洗浄後、Allophycocyanine（APC）標識抗ラットIgヤギ抗体（SouthernBiotech社）またはAlexa Fluor 647標識抗ウシIgG（H+L）ヤギF(ab')2（Jackson ImmunoResearch社）を室温で30分間反応させた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a(κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）またはウシIgG1抗体（Bethyl社）を使用した。洗浄後、細胞表面に結合した各ラット抗体またはラット－ウシキメラ抗体をFACS Verse（BD Biosciences社）により検出した。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）を加えたPBSを使用した。

[0078] 実験結果を図４に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2と同様にウシPD-1発現細胞に結合することが示された。

[0079] 2.9. ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体のPD-1結合親和性

分子間相互作用解析装置（Biacore X100; GE Healthcare社）を用いた表面プラズモン共鳴法により、ラット抗PD-1抗体5D2 およびラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2のウシPD-1に対する結合親和性を計測した。ウシPD-1-His（前述）をリガンドとしてセンサーチップCM5（GE Healthcare社）に固定し、ラット抗PD-1抗体5D2 またはラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2をアナライトとして反応させ、シングルカイネティクス解析を行った。同じ条件で実験を3回繰り返し、それぞれの実験で結合定数（kd値）と解離定数（ka値）を決定し、結合親和性（KD値）を求めた。

[0080] 実験結果を下記の表に示す。ラット－ウシ抗ウシPD-1キメラ抗体のPD-1タンパク質に対する結合親和性は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2と同程度であり、統計学的に差は認められなかった（P > 0.05; Welchのt検定）。

抗ウシPD-1抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
5D2	$1.84\times10^{4}\pm0.27$	$2.15\times10^{-4}\pm0.44$	$\mathbf{1.22\times10^{-8}\pm0.39}$
ch5D2	$2.07\times10^{4}\pm0.06$	$2.16\times10^{-4}\pm1.12$	$\mathbf{1.05\times10^{-8}\pm0.58}$

[0081] 2.10. ラット－ウシキメラ抗PD-1 抗体のウシPD-1/PD-L1 結合阻害活性（図５）

ウシPD-L1発現細胞（前述）およびウシPD-1-Ig（前述）を用いて、抗PD-1抗体によるウシPD-1/PD-L1 結合阻害試験を行った。まず、96穴プレートに終濃度（0, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 μg/ml）のラット抗ウシPD-1抗体5D2 またはラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2と、Lightning-Link Type A Biotin Labeling Kit（Innova Biosciences社）を用いてビオチン標識したウシPD-1-Ig（終濃度5 μg/ml）を添加し、37℃で30分間反応させた。この混合液を1×10^{5}個のウシPD-L1 発現細胞と37℃で30分間反応させた。洗浄後、APC標識ストレプトアビジン（BioLegend社）を室温で30分間反応させ、細胞表面に結合したウシPD-1-Ig を検出した。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）を加えたPBSを使用した。抗体非添加時のウシPD-1-Ig結合細胞の割合を100%とし、各抗体濃度におけるウシPD-1-Ig結合細胞の割合を相対値として表した。

[0082] 実験結果を図５に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2と同程度、PD-L1発現細胞に対するPD-1-Igの結合を阻害した。

[0083] 2.11. ラット抗ウシPD-1抗体のCDR解析

NCBI IGBLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/）を用いて、ラット抗ウシPD-1抗体5D2の相補性決定領域（CDR）を決定した。結果を図１に示す。

[0084] 2.12. ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体の牛への接種試験

BLV実験感染子牛（ホルスタイン種、雄、4ヶ月齢、体重173.5 kg）に樹立したラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2 14 mg（0.08 mg/kg）を点滴

静脈注射した。感染牛から経時的に採血を行い、血液（抗凝固剤として、ヘパリンナトリウム（味の素製薬株式会社）を使用）および血清を採取した。Percoll（GE Healthcare社）を用いた密度勾配遠心法により血液から末梢血単核球（PBMC）を分離した。

[0085] 2.13. 投与したラット－ウシキメラ抗ウシPD-1 抗体の血中動態（図６）

ウシPD-1-His（前述）を終濃度10 μg/mlでELISAプレート（Hタイプ，住友ベークライト社）に4 ℃で一晩、固相化した。その後、各ウェルを0.05% Tween20加Tris-buffered saline（TBS-T）200 μlで5回洗浄し、1% スキムミルク加TBS-Tを用いて室温で1時間ブロッキングを行った。再び同様に洗浄を行い、試験牛から採取した血清を各ウェルに添加し、室温で1時間反応させた。洗浄後に、Horseradish peroxidase標識抗ウシIgG F(c) ウサギポリクローナル抗体（Rockland社）を室温で1時間反応させた。再び各ウェルを洗浄し、TMB One Component Substrate（Bethyl社）を加えて、発色を行った。その後、0.18M希硫酸で酵素反応を停止し、Microplate Reader MTP-650FA（コロナ電気社）を用いて吸光度（450 nm）を測定した。プレートの各洗浄操作には、Auto Plate Washer BIO WASHER 50（DS Pharma Biomedical 社）を使用した。

[0086] 実験結果を図６に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体は、投与後70日目（臨床試験終了時）まで試験牛の血清中から検出された。特に、投与後1週間は高い抗体濃度を維持していた。

[0087] 2.14. BLV抗原に対するT細胞の細胞増殖応答（図７）

ウシPBMCをPBSに懸濁し、Carboxyfluorescein succinimidyl ester（CFSE; Invitrogen社）を室温で20分間反応させ、標識した。10% 非働化ウシ胎仔血清（Cell Culture Technologies社）、ペニシリン200 U/ml、ストレプトマイシン200 μg/ml、0.01% L-グルタミン（Life Technologies社）を含むRPMI 1640培地（Sigma-Aldrich社）で2回洗浄した後、同培地で4×10^6個/mlに調整した。PBMCに2% BLV感染ヒツジ胎仔腎細胞（FLK-BLV）培養上清、2 % BLV非感染ヒツジ胎仔腎細胞（FLK）培養上清、あるいはBLV gp51ペプチドミックス 0.1 μg/mlまたは1 μg/mlを添加し、37℃，5% CO_2条件下で6日間培養した。6

日後、PBMCを回収し、Alexa Fluor 647標識マウス抗ウシCD4抗体（CC30, AbD Serotec社）、Peridinin-chlorophyll-protein complex/cyanin 5.5標識マウス抗ウシCD8抗体（CC63, AbD Serotec社）およびR-Phycoerythrin/cyanin 7（PE/Cy7）標識抗ウシIgMマウス抗体（IL-A30, AbD Serotec社）と4℃で20分間反応させた。抗体の標識にはZenon Mouse IgG1 Labeling Kits（Life Technologies社）またはLightning-Link Kits（Innova Biosciences社）を用いた。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）を加えたPBSを使用した。増殖したT細胞（$CFSE^{Low}$ 細胞）の割合に関して、Dunnettの方法を用いて統計検定を行った。

[0088] 実験結果を図７に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の投与により、$CD4^{+}$ T細胞におけるBLV特異的な細胞増殖応答が投与前に比べ、投与直後から統計学的に有意に増加した。

[0089] 2.15. BLVプロウイルス量の推移（図８）

分離したウシPBMCからWizard DNA Purification kit（Promega社）を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAの濃度は、Nanodrop 8000 Spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific社）を用いて測定した吸光度（260 nm）を基準として定量した。PBMC中のBLVプロウイルス量を測定するため、Cycleave PCR Reaction Mix SP（Takara社）およびウシ白血病ウイルス検出用 Probe/Primer/Positive control（Takara社）を用いてリアルタイムPCRを行った。測定にはLightCycler480 System II（Roche Diagnosis社）を用いた。測定したプロウイルス量に関しては、Dunnettの方法を用いて統計検定を行った。

[0090] 実験結果を図８に示す。ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の投与により、PBMC中のBLVプロウイルス量が投与前に比べ、投与直後から統計学的に有意に減少し、臨床試験終了時（70日目）まで低い値のまま推移した。

[0091] 〔実施例２〕抗PD-1抗体の他の動物種への応用

1. 材料、方法、および実験結果

1.1. ヒツジおよびスイギュウPD-1遺伝子の同定

ヒツジおよびスイギュウPD-1 cDNA コーディング領域（CDS）全長を決定するために、まずウシおよびヒツジPD-1遺伝子の塩基配列（GenBank accession number BC123854およびXM_012176227）を基に遺伝子のCDS全長を増幅するプライマー（ovPD-1 CDS FおよびR、buPD-1 CDS F1, R1, F2およびR2）を設計し、合成したヒツジまたはスイギュウPBMC 由来cDNA を鋳型としてPCR法を行った。得られた増幅産物について、常法に従いキャピラリーシーケンサーにより塩基配列を決定した（Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 34(1):55-63; Jan. 2011. スイギュウPD-1遺伝子を同定した論文）。

プライマー（ovPD-1 CDS F）：ATGGGGACCCCGCGGGCGCC（配列番号６７）

プライマー（ovPD-1 CDS R）：TCAGAGGGGCCAGGAGCAGTGTCCA（配列番号６８）

プライマー（buPD-1 CDS F1）：ATGGGGACCCCGCGGGCGCT（配列番号６９）

プライマー（buPD-1 CDS R1）：GATGACCAGGCTCTGCATCT（配列番号７０）

プライマー（buPD-1 CDS F2）：AATGACAGCGGCGTCTACTT（配列番号７１）

プライマー（buPD-1 CDS R2）：TCAGAGGGGCCAGGAGCAGT（配列番号７２）

[0092] 1.2. ヒツジPD-1発現COS-7細胞の構築

ヒツジPD-1発現プラスミドを作製するため、合成したヒツジPBMC由来cDNAを鋳型に、5´末端側に制限酵素BglIIおよびSmaI認識部位を付加して設計したプライマー（ovPD-1-EGFP FおよびR）を用いてPCRを行った。得られたPCR産物をBglIIおよびSmaI（Takara社）により処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpEGFP-N2 vector（Clontech社）に導入し、クローニングを行った。発現プラスミドはFastGene Xpress Plasmid PLUS Kit（NIPPON Genetics社）を用いて抽出し、実験に供するまで-30℃で保存した。以降、作製した発現プラスミドをpEGFP-N2-ovPD-1と表記した。

プライマー（ovPD-1-EGFP F）：GAAGATCTATGGGGACCCCGCGGGCGCCG（配列番号７３）

プライマー（ovPD-1-EGFP R）：GACCCGGGGAGGGGCCAGGAGCAGTGTCC（配列番号

７４）

5×10^4/cm^{2}のCOS-7細胞を6穴プレートに継代し、10% 非働化牛胎仔血清（Invitrogen社）、0.01% L-グルタミン（Life Technologies社）を含むRPMI 1640培地にて37° C、5% CO_2存在下で一晩培養した。pEGFP-N2-ovPD-1あるいは陰性対照としてpEGFP-N2 0.4 μg/cm^{2}をLipofectamine 2000（Invitrogen社）を用いて、COS-7細胞にそれぞれ導入し48時間培養した（ovPD-1-EGFP発現細胞）。作製した発現細胞におけるヒツジPD-1の発現を確かめるために、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000（KEYENCE社）により、EGFPの細胞内局在を可視化した。

[0093] 1.3. ヒツジPD-1に対するラット抗ウシPD-1抗体5D2の反応性（図９）

ヒツジPD-1にラット抗ウシPD-1モノクローナル抗体が交差反応することをフローサイトメトリー法により確認した。ヒツジPD-1-EGFP発現COS-7細胞を10% 非働化ヤギ血清（Invitrogen社）加PBSを用いて室温で15分間ブロッキングし、10 μg/mlのラット抗ウシPD-1抗体5D2を室温で30分間反応させ、洗浄した後にAPC標識抗ラットIgヤギ抗体（Beckman Coulter社）を室温で30分間反応させた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a（κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）を使用した。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、1% ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich社）加PBSを使用した。

[0094] 実験結果を図９で示す。ラット抗ウシPD-1抗体5D2は、ヒツジPD-1発現細胞に結合することが確認された。

[0095] 1.4. スイギュウのリンパ球に対するラット抗ウシPD-1抗体5D2の反応性（図１０）

スイギュウ（Bubalus bubalis; アジアスイギュウ）の末梢血から、Percoll（GE Healthcare社）を用いた密度勾配遠心法により末梢血単核球（PBMC）を分離した。分離したスイギュウPBMCを10% 非働化ウシ胎仔血清（Cell Culture Technologies社）、ペニシリン200 U/ml、ストレプトマイシン200 μg/ml、0.01% L-グルタミン（Life Technologies社）を含むRPMI 1640培地（Sigm

a-Aldrich社）に懸濁し、2×10^{6}個/mlに調整した。このPBMCにphorbol 12-myristate acetate（PMA） 20 ng/mlおよびionomycin 1μg/ml（Sigma-Aldrich社）を添加し、37℃，5% CO_2条件下で2日間培養した。培養したPBMCを回収し、10% 非働化ヤギ血清（Invitrogen社）加PBSを用いて室温で15分間ブロッキングし、ラット抗ウシPD-1抗体5D2、マウス抗ウシCD8抗体（38.65，AbD Serotec社）を室温で30分間反応させた。陰性対照抗体として、ラットIgG2a（κ）アイソタイプコントロール（BD Biosciences社）を使用した。洗浄後、APC標識ヤギ抗ラットIg抗体（Beckman Coulter社）、PE標識ヤギ抗マウスIgG抗体（Beckman Coulter社）を室温で30分間反応させた。さらに洗浄後、Alexa Flour488標識マウス抗ウシCD4抗体（CC30，AbD Serotec社）およびPE/Cy7標識抗ウシIgMマウス抗体（IL-A30，AbD Serotec社）を室温で30分間反応させた。抗体の標識にはZenon Mouse IgG1 Labeling Kits（Life Technologies社）またはLightning-Link Kits（Innova Biosciences社）を用いた。解析にはFACS Verse（BD Biosciences社）を用いた。なお、すべての洗浄操作および抗体の希釈には、10% 非働化ヤギ血清（Invitrogen社）加PBSを使用した。

[0096] 実験結果を図１０で示す。ラット抗ウシPD-1抗体5D2は、PMA/ionomycin刺激により活性化させたスイギュウのCD4$^+$ T細胞（IgM$^-$CD4$^+$）およびCD8$^+$ T細胞（IgM$^-$CD8$^+$）に強く結合した。

[0097] 〔実施例３〕野生型または変異型ウシIgG1を有するラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体のウシFcγ受容体に対する結合性

序論

実施例１では、ウシの感染症に対する新規治療法の樹立を目的にラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体を樹立した。この際、キメラ抗体を介したADCC活性を抑制するために、ウシIgG1 CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（図１、図１１）。本実施例では、このアミノ酸変異の効果を検討するために、変異型ウシIgG1（上述、IgG1 ADCC-）と野生型ウシIgG1（IgG1 WT）を有するラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体を作製し、既知のウシFcγ受容体に対する結合性を確認した。

[0098] 材料、方法、および実験結果

2.1. ラットーウシキメラ抗ウシPD-1抗体発現ベクターの作製

野生型ウシIgG1（IgG1 WT）または変異型ウシIgG1（上述、IgG1 ADCC-）を有する、ラットーウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2を樹立した。

[0099] 実施例１に記載した手順に従い、変異型IgG1（IgG1 ADCC-）を有するラットーウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2をコードする発現プラスミドを作製した（配列番号９および１０（アミノ酸配列）、配列番号１４および１５（コドン最適化後ヌクレオチド配列）。なお、ch5D2 IgG1 ADCC-に用いたウシIgG1にはADCC活性を抑制するために、CH2ドメインのFcγ受容体予想結合部位に変異を加えた（図１および図１１参照。アミノ酸番号及び変異: 251 E→P, 252 L→V, 253 P→A, 254 G→deletion, 348 A→S, 349 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology, 142(4):551-561; Aug. 2014.）。以降、作製した発現プラスミドをpDN112-boPD-1ch5D2 IgG1 ADCC-と表記する。

[0100] 以下の手順に従い、野生型IgG1（IgG1 WT）を有するラットーウシキメラ抗ウシPD-1抗体ch5D2をコードする発現プラスミドを作製した。まず野生型のウシIgG1（GenBank accession number X62916）定常領域の遺伝子を増幅するため、合成したウシPBMC由来cDNAを鋳型に、5´末端側に制限酵素NheIおよびXbaI認識部位を付加して設計したプライマー（boIgG1 CH1 FおよびboIgG1 CH3 R）を用いてPCRを行った。増幅した遺伝子鎖をNheI（Takara社）およびXbaI（Takara社）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics 社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpDN112-boPD-1ch5D2 IgG1 ADCC-へ導入し、クローニングを行った。更に、このプラスミドをQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen 社）を用いて精製し、NotI（Takara社）およびXbaI（Takara社）によって処理し、ch5D2の軽鎖（配列番号９（アミノ酸配列）、配列番号１４（ヌクレオチド配列））および重鎖（IgG1 WT）（配列番号７５（アミノ酸配列）、配列番号７６（ヌクレオチド配列））の発現カセットを得た。この遺伝子断片をFastGene Gel/PCR Extraction Kit（

NIPPON Genetics 社）を用いて精製し、発現プラスミドpDC6（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター鈴木定彦教授より分与）のクローニングサイト（PCMV下流、INRBGとPABGHの間にあるNotIおよびXbaI制限酵素認識配列）へ導入し、クローニングを行った（図１２）。得られた目的の発現プラスミドはQIAGEN Plasmid Midi kit（Qiagen 社）を用いて抽出し、実験に供するまで-30℃で保存した。以降、作製した発現プラスミドをpDC6-boPD-1ch5D2 IgG1 WTと表記する。

プライマー（boIgG1 CH1 F）：CTAGCTAGCACCACAGCCCCGAAAGTCT（配列番号７７）

プライマー（boIgG1 CH3 R）：TGCTCTAGATTATTTACCCGCAGACTTAGA（配列番号７８）

[0101] 2.2. ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の発現および精製

7.5×10^7 個のExpi293F 細胞（Life Technologies 社）に30 μg のpDC6-boPD-1ch5D2 IgG1 WTあるいはpDN112-boPD-1ch5D2 IgG1 ADCC-をExpifectamine（Life Technologies社）を用いて導入し、5～7 日間振盪培養を行って培養上清を回収した。培養上清からAb Capcher Extra（ProteNova社）を用いて各キメラ抗体を精製した。レジンへの結合はオープンカラム法を用い、平衡化バッファーおよび洗浄バッファーとして1.5 M Glycine/3 M NaCl（pH 8.0）を使用した。溶出バッファーには0.1 M Glycine-HCl（pH 2.8）を、中和バッファーには1M Tris（pH 9.0）を使用した。精製した抗体は、PD-10 Desalting Column（GE Healthcare 社）およびAmicon Ultra-15（50 kDa、Millipore 社）を用いて、PBS（pH 7.4）へのバッファー置換および濃縮を行った。精製したキメラ抗体は、0.22 μm シリンジフィルター（Pall Life Sciences 社）を通して滅菌し、実験に供するまで4° C にて保存した。精製後の各キメラ抗体濃度は、Nanodrop8000 Spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific 社）を用いて測定した吸光度（280 nm）により定量した。

[0102] 2.3. ラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体の精製純度の確認（図１３）

精製したラット－ウシキメラ抗ウシPD-1抗体（ch5D2 IgG1 WTおよびch5D2

IgG1 ADCC-）の純度を確かめるため、SDS-PAGE およびCBB 染色により抗体タンパク質の検出を行った。精製した各キメラ抗体をLaemmli Sample Buffer（Bio-Rad社）に懸濁し、還元条件下（2-メルカプトエタノール（Sigma-Aldrich社）により還元）または非還元条件下にて変性処理（95°C、5分）を行った。調製したサンプルはSuperSep Ace 5%-20% グラジエントポリアクリルアミドゲル（和光純薬工業社）を用いて電気泳動した。この際、分子量マーカーとしてPrecision Plus Protein All Blue Standards（Bio-Rad社）を用いた。 泳動後、Quick-CBB（和光純薬工業社）によりゲルの染色を行い、続いて蒸留水中で脱色を行った。

結果を図１３に示す。還元条件では25kDa（軽鎖）および50kDa（重鎖）、非還元条件では150kDaの想定した位置にch5D2 IgG1 WTおよびch5D2 IgG1 ADCC-のバンドが確認された。

[0103] 2.4. 可溶性ウシFcγ受容体（FcγR）の構築

以下の手順に従い、ウシFcγRI-His、FcγRII-His、FcγRIII-HisおよびFcγ2R-His発現プラスミドを構築した。ウシFcγRI、FcγRII、FcγRIIIおよびFcγ2R（GenBank accession number NM_174538、NM_174539、NM_001077402およびNM_001001138）のシグナルペプチドおよび細胞外領域を増幅するように、5´末端側に制限酵素NotIおよびXhoI認識部位を付加したプライマー（boFcγRI-His FおよびR、boFcγRIII-His FおよびR、またはboFcγ2R-His FおよびR）あるいは5´末端側に制限酵素NheIおよびEcoRV認識部位を付加したプライマー（boFcγRIII-His FおよびR）を設計した。なお、リバースプライマーには6×ヒスチジン（His）タグをコードする遺伝子配列を付加した。合成したウシPBMC由来cDNAを鋳型にPCRを行い、それぞれのPCR産物をNotI（Takara社） およびXhoI（Takara社）（FcγRI-His、FcγRIII-HisおよびFcγ2R-His）あるいはNheI（Takara社） およびEcoRV（Takara社）（FcγRII-His）によって処理した後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit（NIPPON Genetics社）を用いて精製し、同様の制限酵素処理を行ったpCXN2.1(+) vector（Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Gene, 108(2):193-199; Dec. 15, 1991; 順天堂大

学大学院医学研究科　横溝岳彦教授より分与）に導入し、クローニングを行った。発現プラスミドはFastGene Xpress Plasmid PLUS Kit (NIPPON Genetics社）によって精製し、実験に供するまで-30°Cにて保存した。以降、作製した発現プラスミドをpCXN2.1-boFcγRI-His、pCXN2.1-boFcγRII-His、pCXN2.1-boFcγRIII-HisあるいはpCXN2.1-boFcγ2R-Hisと表記する。

プライマー（boFcγRI-His F）：ATAAGAATGCGGCCGCCACCATGTGGCTCATAATAGCTCT（配列番号７９）

プライマー（boFcγRI-His R）：GCCCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGAGGAGTTGTTGACTGGAGGC（配列番号８０）

プライマー（boFcγRII-His F）：ATAAGAATGCTAGCCACCATGGGGATCCCCTCATTCCT（配列番号８１）

プライマー（boFcγRII-His R）：GCCGATATCTTAATGGTGATGGTGATGGTGCGATGAGGGGCCGCTCGAGC（配列番号８２）

プライマー（boFcγRIII-His F）：ATAAGAATGCGGCCGCCACCATGTGGCAACTGCTACCACC（配列番号８３）

プライマー（boFcγRIII-His R）：GCCCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGGTGCCAAGGTAGAAAGAATG（配列番号８４）

プライマー（boFcγ2R-His F）：ATAAGAATGCGGCCGCCACCATGGCCCCCACCCTCCCTGCCTTGCTCT（配列番号８５）

プライマー（boFcγ2R-His R）：GCCCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGATTCTGCATCGTGTAGTCTG（配列番号８６）

[0104] 以下の手順に従い、可溶性ウシFcγRI-His、FcγRII-His、FcγRIII-HisおよびFcγ2R-His発現細胞を作製した。7.5×10^7 個のExpi293F 細胞（Life Technologies 社）に30 μg のpCXN2.1-boFcγRI-His、pCXN2.1-boFcγRII-His、pCXN2.1-boFcγRIII-HisあるいはpCXN2.1-boFcγ2R-HisをExpifectamine（Life Technologies社）を用いて導入し、5～7 日間振盪培養を行って培養上清を回収した。培養上清からTALON Metal Affinity Resin (Clontech社）を用いて組換えタンパク質を精製した。精製後、Amicon Ultra-15 Centrifugal

Filter Unit（10 kDa、Millipore社）によりバッファーをPBS（pH 7.4）に置換し、実験に供するまで-30° C にて保存した（ウシPD-1-His）。精製後のウシFcγRI-His、FcγRII-His、FcγRIII-HisおよびFcγ2R-His濃度は、Nanodrop8000 Spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific社）を用いて測定した吸光度（280 nm）により定量した。

[0105] 2.5. ラットーウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2 IgG1 WTおよびIgG1 ADCC-のウシFcγRに対する結合性（図１４）

ラットーウシキメラ抗ウシPD-1 抗体ch5D2 IgG1 WTまたはIgG1 ADCC-を終濃度，50、25、12.5、6.25、3.12、1.5610 nMでNunc MaxiSorp ELISAプレート（Nunc社）に37 ℃で2時間固相化した。その後、各ウェルを0.05% Tween20加PBS（PBS-T）200 μlで5回洗浄し、SuperBlock（PBS）Blocking Buffer（Thermo Fisher Scientific社）を用いて37 ℃で30分間ブロッキングを行った。再び同様に洗浄を行い、ウシFcγRI-His、FcγRII-His、FcγRIII-HisまたはFcγ2R-Hisを終濃度10 μg/mlで各ウェルに添加し、37 ℃で1時間反応させた。洗浄後に、抗ポリヒスチジンタグマウスモノクローナル抗体（Abcam社）を37 ℃で30分間反応させた。次に、各ウェルを洗浄し、Horseradish peroxidase標識抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体（MP Biomedicals社）を37 ℃で30分間反応させた。再び各ウェルを洗浄し、TMB One Component Substrate（Bethyl社）を加えて、発色を行った。その後、0.18M希硫酸で酵素反応を停止し、Microplate Reader MTP-900（コロナ電気社）を用いて吸光度（450 nm）を測定した。プレートの各洗浄操作には、Auto Plate Washer BIO WASHER 50（DS Pharma Biomedical 社）を使用した。

[0106] 実験結果を図１４に示す。IgG1 WTはウシFcγRI-Hisに強く結合し、ウシFcγRII-Hisには弱く結合した。一方、IgG1 ADCC-はウシFcγRI-His およびFcγRII-Hisと結合しなかった。また、IgG1 WT およびIgG1 ADCC-のいずれも、ウシFcγRIII-HisおよびウシFcγ2R-Hisとの結合は認められなかった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0107] 本発明の抗PD-1抗体は、動物のがんや感染症の予防及び/又は治療に利用できる。

配列表フリーテキスト

[0108] ＜配列番号１＞

配列番号１は、ラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

下線部：NH2末端から順にCDR1, CDR2, CDR3。

MKVPGRLLVLLFWIPASRSDVVLTQTPVSLSVTLGDQASISCRSSQSLEYSDGYTYLEWYLQKPGQSPQ

LLIYGVSNRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPDTFGAGTKLELK

＜配列番号２＞

配列番号２は、ラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

下線部：NH2末端から順にCDR1, CDR2, CDR3。

MAILVLLLCLVTIPHSVLSQVQLKETGPGLVQPTQTLSITCTVSGFSLTSYYIQWVRQTPGKGLEWMGF

IRSGGSTEYNSEFKSRLSINRDTSKNQVFLKMNSLKTEDTGVYYCARTSSGYEGGFDYWGQGVMVTVSS

＜配列番号３＞

配列番号３は、ウシ抗体のL鎖定常領域（ウシIg lambda, GenBank: X62917）のアミノ酸配列を示す。

QPKSPPSVTLFPPSTEELNGNKATLVCLISDFYPGSVTVVWKADGSTITRNVETTRASKQSNSKYAASS

YLSLTSSDWKSKGSYSCEVTHEGSTVTKTVKPSECS

＜配列番号４＞

配列番号４は、ウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916を改変）のアミノ酸配列を示す。変異箇所に下線を引いた。アミノ酸番号および変異：123 E→P, 124 L→V, 125 P→A, 126 G→deletion, 218 A→S, 219 P→S

ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMV

TVPGSTSGQTFTCNVAHPASSTKVDKAVDPTCKPSPCDCCPPPPVAGPSVFIFPPKPKDTLTISGTPEV

TCVVVDVGHDDPEVKFSWFVDDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGL

PSSIVRTISRTKGPAREPQVYVLAPPQEELSKSTVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQPESEDKYGTTP

PQLDADSSYFLYSKLRVDRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK

＜配列番号５＞

配列番号５は、ラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域のヌクレオチド配列を示す。

ATGAAAGTGCCTGGTAGGCTGCTGGTGCTGTTGTTTTGGATTCCAGCTTCCAGGAGTGATGTTGTGTTG
ACACAAACTCCAGTTTCCCTGTCTGTCACACTTGGAGATCAAGCTTCTATATCTTGCAGGTCTAGTCAG
AGCCTGGAATATAGTGATGGATACACTTATTTGGAATGGTACCTACAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAG
CTCCTCATCTATGGAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCATTGGCAGTGGGTCAGGG
ACAGATTTCACCCTCAAGATCAGCAGAGTAGAGCCTGAGGACTTGGGAGTTTATTACTGCTTCCAAGCT
ACACATGATCCGGACACGTTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA

配列番号５のヌクレオチド配列のコドン最適化後ヌクレオチド配列を＜配列番号１１＞に示す。

ATGAAGGTCCCTGGTAGGCTGCTGGTTCTCTTGTTCTGGATCCCTGCTTCCAGAAGTGACGTGGTGCTG
ACTCAAACACCAGTGAGTCTCAGTGTGACCCTCGGCGACCAGGCCTCCATTTCTTGCCGTAGCAGCCAG
TCCTTGGAATACTCTGATGGTTATACTTATCTGGAGTGGTACCTCCAGAAGCCCGGGCAGTCACCCCAG
CTTCTTATCTACGGTGTGAGCAACAGATTTTCTGGGGTTCCTGATCGGTTTATTGGATCTGGATCCGGT
ACCGACTTCACATTGAAAATTTCACGCGTCGAACCCGAGGATCTGGGGGTCTACTATTGCTTCCAAGCC
ACCCACGATCCCGACACCTTCGGCGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAA

＜配列番号６＞

配列番号６は、ラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域のヌクレオチド配列を示す。

ATGGCTATCCTGGTGCTGCTTCTCTGCCTGGTGACCATTCCACACTCTGTCTTGTCCCAGGTGCAGCTG
AAGGAGACAGGACCTGGCCTGGTGCAACCAACACAGACCCTGTCCATCACATGTACTGTTTCTGGGTTC
TCATTAACCAGCTATTATATACAGTGGGTTCGCCAGACTCCAGGAAAGGGACTAGAATGGATGGGATTT
ATACGGAGTGGTGGAAGCACAGAGTATAATTCAGAGTTCAAATCCCGACTTAGCATCAACAGGGACACC
TCCAAGAACCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGAAAACAGAGGACACAGGCGTGTACTACTGTGCC
AGAACCTCTTCGGGGTACGAAGGGGGTTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA

配列番号６のヌクレオチド配列のコドン最適化後ヌクレオチド配列を＜配列番号１２＞に示す。

ATGGCAATCCTCGTGTTGCTTCTGTGCTTGGTGACCATTCCACACTCTGTGCTTTCCCAGGTGCAGCTC
AAGGAAACAGGGCCAGGACTCGTCCAACCTACACAAACCCTGTCAATCACCTGTACCGTATCCGGTTTT
AGCCTCACCAGCTATTATATACAATGGGTGAGGCAGACCCCCGGGAAAGGACTGGAATGGATGGGCTTC
ATTCGCAGCGGTGGGAGTACCGAGTACAATAGCGAGTTTAAAAGTCGCTTGAGTATCAATAGAGATACT
TCCAAGAATCAGGTGTTCTTGAAGATGAACTCCCTCAAGACCGAAGATACAGGGGTCTATTACTGCGCC
AGGACCTCCAGTGGATATGAAGGAGGCTTTGATTATTGGGGGCAGGGCGTCATGGTAACTGTGAGCTCA

＜配列番号７＞

配列番号７は、ウシ抗体のL鎖定常領域（ウシIg lambda, GenBank: X62917）のヌクレオチド配列を示す。

CAGCCCAAGTCCCCACCCTCGGTCACCCTGTTCCCGCCCTCCACGGAGGAGCTCAACGGCAACAAGGCC
ACCCTGGTGTGTCTCATCAGCGACTTCTACCCGGGTAGCGTGACCGTGGTCTGGAAGGCAGACGGCAGC
ACCATCACCCGCAACGTGGAGACCACCCGGGCCTCCAAACAGAGCAACAGCAAGTACGCGGCCAGCAGC
TACCTGAGCCTGACGAGCAGCGACTGGAAATCGAAAGGCAGTTACAGCTGCGAGGTCACGCACGAGGGG
AGCACCGTGACGAAGACAGTGAAGCCCTCAGAGTGTTCTTAG

配列番号７のヌクレオチド配列のコドン最適化後ヌクレオチド配列を＜配列番号１３＞に示す。

CAACCCAAGTCACCACCATCCGTGACTCTGTTTCCTCCATCTACAGAGGAGCTGAACGGAAACAAAGCT
ACCTTGGTGTGTCTCATCTCTGACTTTTACCCCGGATCTGTCACTGTGGTATGGAAAGCAGATGGCAGC
ACAATAACCAGGAATGTTGAAACCACACGAGCCTCCAAGCAGTCCAATAGTAAGTATGCCGCATCTTCA
TATCTGTCCCTTACAAGCTCAGACTGGAAATCCAAAGGCAGCTACAGTTGCGAGGTCACACATGAAGGC
AGCACCGTGACAAAGACCGTAAAGCCATCTGAGTGTAGCTAG

＜配列番号８＞

配列番号８は、ウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916を改変）のヌクレオチド配列（コドン最適化後）を示す。

GCTAGCACCACAGCACCTAAAGTTTACCCTCTGTCTTCCTGCTGCGGCGACAAGTCTTCATCAACTGTT
ACTCTTGGATGCCTGGTCTCAAGTTACATGCCCGAGCCCGTGACAGTGACCTGGAACTCAGGCGCTCTG
AAGTCTGGAGTGCACACATTTCCAGCTGTGCTTCAGTCTAGCGGCCTGTATTCCCTCAGCTCTATGGTT
ACTGTACCTGGTAGCACCAGCGGACAGACTTTCACCTGTAATGTTGCCCATCCCGCATCTTCTACCAAG

GTCGATAAAGCCGTTGACCCCACTTGCAAACCATCCCCTTGTGATTGTTGTCCACCCCCTCCAGTGGCT
GGCCCTTCCGTCTTCATTTTCCCTCCTAAACCTAAGGATACTCTGACCATCTCAGGGACACCCGAGGTC
ACCTGTGTCGTCGTGGACGTGGGACATGACGACCCAGAAGTCAAGTTCTCATGGTTCGTGGACGATGTG
GAGGTGAACACAGCAACAACAAAGCCCAGAGAAGAACAGTTTAACAGCACATATCGGGTGGTCAGCGCC
TTGCGTATTCAGCACCAGGACTGGACTGGTGGCAAGGAGTTTAAGTGCAAGGTGCATAACGAAGGTCTG
CCCTCTTCTATAGTGAGAACTATCTCCCGAACTAAGGGCCCCGCTCGGGAGCCCCAGGTTTACGTCCTT
GCTCCCCCTCAGGAGGAACTGAGTAAATCAACCGTGAGTCTCACCTGTATGGTTACCTCATTTTACCCA
GACTACATCGCCGTAGAGTGGCAGAGGAATGGACAGCCAGAGTCTGAGGACAAATACGGCACTACTCCT
CCCCAACTGGATGCCGACTCTTCCTACTTCCTCTACTCCAAATTGCGAGTTGACCGGAACTCATGGCAG
GAGGGGGACACATACACATGCGTCGTTATGCACGAGGCCCTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCCACA
TCTAAAAGTGCAGGTAAGTAA

＜配列番号９＞

配列番号９は、ラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域とウシ抗体のL鎖定常領域とからなるキメラL鎖のアミノ酸配列を示す。

MKVPGRLLVLLFWIPASRSDVVLTQTPVSLSVTLGDQASISCRSSQSLEYSDGYTYLEWYLQKPGQSPQ
LLIYGVSNRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPDTFGAGTKLELKQPKSPPS
VTLFPPSTEELNGNKATLVCLISDFYPGSVTVVWKADGSTITRNVETTRASKQSNSKYAASSYLSLTSS
DWKSKGSYSCEVTHEGSTVTKTVKPSECS

＜配列番号１０＞

配列番号１０は、ラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916を改変）とからなるキメラH鎖のアミノ酸配列を示す。

MAILVLLLCLVTIPHSVLSQVQLKETGPGLVQPTQTLSITCTVSGFSLTSYYIQWVRQTPGKGLEWMGF
IRSGGSTEYNSEFKSRLSINRDTSKNQVFLKMNSLKTEDTGVYYCARTSSGYEGGFDYWGQGVMVTVSS
ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMV
TVPGSTSGQTFTCNVAHPASSTKVDKAVDPTCKPSPCDCCPPPPVAGPSVFIFPPKPKDTLTISGTPEV
TCVVVDVGHDDPEVKFSWFVDDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGL
PSSIVRTISRTKGPAREPQVYVLAPPQEELSKSTVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQPESEDKYGTTP

PQLDADSSYFLYSKLRVDRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK

＜配列番号１４＞

ラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域とウシ抗体のL鎖定常領域とからなるキメラL鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後ヌクレオチド配列）を示す。

ATGAAGGTCCCTGGTAGGCTGCTGGTTCTCTTGTTCTGGATCCCTGCTTCCAGAAGTGACGTGGTGCTG
ACTCAAACACCAGTGAGTCTCAGTGTGACCCTCGGCGACCAGGCCTCCATTTCTTGCCGTAGCAGCCAG
TCCTTGGAATACTCTGATGGTTATACTTATCTGGAGTGGTACCTCCAGAAGCCCGGGCAGTCACCCCAG
CTTCTTATCTACGGTGTGAGCAACAGATTTTCTGGGGTTCCTGATCGGTTTATTGGATCTGGATCCGGT
ACCGACTTCACATTGAAAATTTCACGCGTCGAACCCGAGGATCTGGGGGTCTACTATTGCTTCCAAGCC
ACCCACGATCCCGACACCTTCGGCGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAACAACCCAAGTCACCACCATCC
GTGACTCTGTTTCCTCCATCTACAGAGGAGCTGAACGGAAACAAAGCTACCTTGGTGTGTCTCATCTCT
GACTTTTACCCCGGATCTGTCACTGTGGTATGGAAAGCAGATGGCAGCACAATAACCAGGAATGTTGAA
ACCACACGAGCCTCCAAGCAGTCCAATAGTAAGTATGCCGCATCTTCATATCTGTCCCTTACAAGCTCA
GACTGGAAATCCAAAGGCAGCTACAGTTGCGAGGTCACACATGAAGGCAGCACCGTGACAAAGACCGTA
AAGCCATCTGAGTGTAGCTAG

＜配列番号１５＞

ラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916を改変）とからなるキメラH鎖のヌクレオチド配列（コドン最適化後ヌクレオチド配列）を示す。

ATGGCAATCCTCGTGTTGCTTCTGTGCTTGGTGACCATTCCACACTCTGTGCTTTCCCAGGTGCAGCTC
AAGGAAACAGGGCCAGGACTCGTCCAACCTACACAAACCCTGTCAATCACCTGTACCGTATCCGGTTTT
AGCCTCACCAGCTATTATATACAATGGGTGAGGCAGACCCCCGGGAAAGGACTGGAATGGATGGGCTTC
ATTCGCAGCGGTGGGAGTACCGAGTACAATAGCGAGTTTAAAAGTCGCTTGAGTATCAATAGAGATACT
TCCAAGAATCAGGTGTTCTTGAAGATGAACTCCCTCAAGACCGAAGATACAGGGGTCTATTACTGCGCC
AGGACCTCCAGTGGATATGAAGGAGGCTTTGATTATTGGGGGCAGGGCGTCATGGTAACTGTGAGCTCA
GCTAGCACCACAGCACCTAAAGTTTACCCTCTGTCTTCCTGCTGCGGCGACAAGTCTTCATCAACTGTT
ACTCTTGGATGCCTGGTCTCAAGTTACATGCCCGAGCCCGTGACAGTGACCTGGAACTCAGGCGCTCTG
AAGTCTGGAGTGCACACATTTCCAGCTGTGCTTCAGTCTAGCGGCCTGTATTCCCTCAGCTCTATGGTT

ACTGTACCTGGTAGCACCAGCGGACAGACTTTCACCTGTAATGTTGCCCATCCCGCATCTTCTACCAAG
GTCGATAAAGCCGTTGACCCCACTTGCAAACCATCCCCTTGTGATTGTTGTCCACCCCCTCCAGTGGCT
GGCCCTTCCGTCTTCATTTTCCCTCCTAAACCTAAGGATACTCTGACCATCTCAGGGACACCCGAGGTC
ACCTGTGTCGTCGTGGACGTGGGACATGACGACCCAGAAGTCAAGTTCTCATGGTTCGTGGACGATGTG
GAGGTGAACACAGCAACAACAAAGCCCAGAGAAGAACAGTTTAACAGCACATATCGGGTGGTCAGCGCC
TTGCGTATTCAGCACCAGGACTGGACTGGTGGCAAGGAGTTTAAGTGCAAGGTGCATAACGAAGGTCTG
CCCTCTTCTATAGTGAGAACTATCTCCCGAACTAAGGGCCCCGCTCGGGAGCCCCAGGTTTACGTCCTT
GCTCCCCCTCAGGAGGAACTGAGTAAATCAACCGTGAGTCTCACCTGTATGGTTACCTCATTTTACCCA
GACTACATCGCCGTAGAGTGGCAGAGGAATGGACAGCCAGAGTCTGAGGACAAATACGGCACTACTCCT
CCCCAACTGGATGCCGACTCTTCCTACTTCCTCTACTCCAAATTGCGAGTTGACCGGAACTCATGGCAG
GAGGGGGACACATACACATGCGTCGTTATGCACGAGGCCCTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCCACA
TCTAAAAGTGCAGGTAAGTAA

＜配列番号１６＞

配列番号１６は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2のL鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列（QSLEYSDGYTY）を示す。

＜配列番号１７＞

配列番号１７は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2のL鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列（FQATHDPDT）を示す。

＜配列番号１８＞

配列番号１８は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2のH鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列（GFSLTSYY）を示す。

＜配列番号１９＞

配列番号１９は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2のH鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列（IRSGGST）を示す。

＜配列番号２０＞

配列番号２０は、ラット抗ウシPD-1抗体5D2のH鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列（ARTSSGYEGGFDY）を示す。

＜配列番号２１＞

配列番号２１は、ウシ抗体(IgG1 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号２２＞

配列番号２２は、ウシ抗体(IgG1 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号２３＞

配列番号２３は、ウシ抗体(IgG1 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号２４＞

配列番号２４は、ウシ抗体(IgG2 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号２５＞

配列番号２５は、ウシ抗体(IgG2 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号２６＞

配列番号２６は、ウシ抗体(IgG2 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号２７＞

配列番号２７は、ウシ抗体(IgG3 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号２８＞

配列番号２８は、ウシ抗体(IgG3 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号２９＞

配列番号２９は、ウシ抗体(IgG1 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３０＞

配列番号３０は、ウシ抗体(IgG1 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌク

レオチド配列を示す。

＜配列番号３１＞

配列番号３１は、ウシ抗体(IgG1 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３２＞

配列番号３２は、ウシ抗体(IgG2 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３３＞

配列番号３３は、ウシ抗体(IgG2 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３４＞

配列番号３４は、ウシ抗体(IgG2 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３５＞

配列番号３５は、ウシ抗体(IgG3 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３６＞

配列番号３６は、ウシ抗体(IgG3 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３７＞

配列番号３７は、ヒツジ抗体(IgG1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号３８＞

配列番号３８は、ヒツジ抗体(IgG1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号３９＞

配列番号３９は、ヒツジ抗体(IgG2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４０＞

配列番号４０は、ヒツジ抗体(IgG2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号４１＞

配列番号４１は、ヒツジ抗体のL鎖（Ig kappa(CK)）定常領域のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４２＞

配列番号４２は、ヒツジ抗体のL鎖（Ig kappa(CK)）定常領域のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号４３＞

配列番号４３は、ヒツジ抗体のL鎖（Ig lambda(CL)）定常領域のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４４＞

配列番号４４は、ヒツジ抗体のL鎖（Ig lambda(CL)）定常領域のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号４５＞

配列番号４５は、スイギュウ抗体(IgG1と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４６＞

配列番号４６は、スイギュウ抗体(IgG1と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号４７＞

配列番号４７は、スイギュウ抗体(IgG2と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号４８＞

配列番号４８は、スイギュウ抗体(IgG2と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号４９＞

配列番号４９は、スイギュウ抗体(IgG3と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５０＞

配列番号５０は、スイギュウ抗体(IgG3と推定される)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５１＞

配列番号５１は、スイギュウ抗体のL鎖（Ig lambdaと推定される）定常領域(CL)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５２＞

配列番号５２は、スイギュウ抗体のL鎖（Ig lambdaと推定される）定常領域(CL)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５３＞

配列番号５３は、ヒト抗体(IgG4 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５４＞

配列番号５４は、ヒト抗体(IgG4 variant 1)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５５＞

配列番号５５は、ヒト抗体(IgG4 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５６＞

配列番号５６は、ヒト抗体(IgG4 variant 2)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号５７＞

配列番号５７は、ヒト抗体(IgG4 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号５８＞

配列番号５８は、ヒト抗体(IgG4 variant 3)のH鎖定常領域(CH1～CH3)のヌク

レオチド配列を示す。

＜配列番号５９＞

配列番号５９は、ヒト抗体のL鎖定常領域のアミノ酸配列を示す。

＜配列番号６０＞

配列番号６０は、ヒト抗体のL鎖定常領域のヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号６１～７４＞

配列番号６１～７４は、順に、プライマーboPD-1-myc F, boPD-1-myc R, boPD-L1-EGFP F, boPD-L1-EGFP R, boPD-1-His F, boPD-1-His R, ovPD-1 CDS F, ovPD-1 CDS R, buPD-1 CDS F1, buPD-1 CDS R1, buPD-1 CDS F2, buPD-1 CDS R2, ovPD-1-EGFP F及びovPD-1-EGFP Rのヌクレオチド配列を示す。

＜配列番号７５＞

配列番号７５は、ラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916）とからなるキメラH鎖のヌクレオチド配列を示す。

ATGGCAATCCTCGTGTTGCTTCTGTGCTTGGTGACCATTCCACACTCTGTGCTTTCCCAGGTGCAGCTC
AAGGAAACAGGGCCAGGACTCGTCCAACCTACACAAACCCTGTCAATCACCTGTACCGTATCCGGTTTT
AGCCTCACCAGCTATTATATACAATGGGTGAGGCAGACCCCCGGGAAAGGACTGGAATGGATGGGCTTC
ATTCGCAGCGGTGGGAGTACCGAGTACAATAGCGAGTTTAAAAGTCGCTTGAGTATCAATAGAGATACT
TCCAAGAATCAGGTGTTCTTGAAGATGAACTCCCTCAAGACCGAAGATACAGGGGTCTATTACTGCGCC
AGGACCTCCAGTGGATATGAAGGAGGCTTTGATTATTGGGGGCAGGGCGTCATGGTAACTGTGAGCTCA
GCCTCCACCACAGCCCCGAAAGTCTACCCTCTGAGTTCTTGCTGCGGGGACAAGTCCAGCTCCACCGTG
ACCCTGGGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCCGAGCCGGTGACCGTGACCTGGAACTCGGGTGCCCTG
AAGAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTTCAGTCCTCCGGGCTGTACTCTCTCAGCAGCATGGTG
ACCGTGCCCGGCAGCACCTCAGGACAGACCTTCACCTGCAACGTAGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAG
GTGGACAAGGCTGTTGATCCCACATGCAAACCATCACCCTGTGACTGTTGCCCACCCCCTGAGCTCCCC
GGAGGACCCTCTGTCTTCATCTTCCCACCGAAACCCAAGGACACCCTCACAATCTCGGGAACGCCCGAG
GTCACGTGTGTGGTGGTGGACGTGGGCCACGATGACCCCGAGGTGAAGTTCTCCTGGTTCGTGGACGAC
GTGGAGGTAAACACAGCCACGACGAAGCCGAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTCAGC

GCCCTGCGCATCCAGCACCAGGACTGGACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAAGGTCCACAACGAAGGC
CTCCCGGCCCCCATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAAGGGCCGGCCCGGGAGCCGCAGGTGTATGTC
CTGGCCCCACCCCAGGAAGAGCTCAGCAAAAGCACGGTCAGCCTCACCTGCATGGTCACCAGCTTCTAC
CCAGACTACATCGCCGTGGAGTGGCAGAGAAACGGGCAGCCTGAGTCGGAGGACAAGTACGGCACGACC
CCGCCCCAGCTGGACGCCGACAGCTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCAGGGTGGACAGGAACAGCTGG
CAGGAAGGAGACACCTACACGTGTGTGGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACGCAGAAGTCC
ACCTCTAAGTCTGCGGGTAAATAA

＜配列番号７６＞

配列番号７５は、ラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域とウシ抗体のH鎖定常領域（ウシIgG1, GenBank: X62916）とからなるキメラH鎖のアミノ酸配列を示す。

MAILVLLLCLVTIPHSVLSQVQLKETGPGLVQPTQTLSITCTVSGFSLTSYYIQWVRQTPGKGLEWMGF
IRSGGSTEYNSEFKSRLSINRDTSKNQVFLKMNSLKTEDTGVYYCARTSSGYEGGFDYWGQGVMVTVSS
ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMV
TVPGSTSGQTFTCNVAHPASSTKVDKAVDPTCKPSPCDCCPPPELPGGPSVFIFPPKPKDTLTISGTPE
VTCVVVDVGHDDPEVKFSWFVDDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVHNEG
LPAPIVRTISRTKGPAREPQVYVLAPPQEELSKSTVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQRNGQPESEDKYGTT
PPQLDADSSYFLYSKLRVDRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK

＜配列番号７７～８６＞

配列番号７７～８６は、順に、プライマーboIgG1 CH1 F、boIgG1 CH3 R、boFcγRI-His F、boFcγRI-His R、boFcγRII-His F、boFcγRII-His R、boFcγRIII-His F、boFcγRIII-His R、boFcγ2R-His F及びboFcγ2R-His Rのヌクレオチド配列を示す。

請求の範囲

[請求項1] (a)QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖と、(b) GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖とを含む、抗PD-1抗体。

[請求項2] L鎖可変領域とH鎖可変領域がラットに由来する請求項１記載の抗体。

[請求項3] L鎖可変領域がラット抗ウシPD-1抗体のL鎖可変領域であり、H鎖可変領域がラット抗ウシPD-1抗体のH鎖可変領域である請求項２記載の抗体。

[請求項4] L鎖可変領域が配列番号１のアミノ酸配列を有し、H鎖可変領域が配列番号２のアミノ酸配列を有する請求項３記載の抗体。

[請求項5] ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖又はKappa鎖の定常領域のアミノ酸配列を有する請求項１～４のいずれかに記載の抗体。

[請求項6] ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域が、ヒトのIgG4に相当する免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列を有するか、あるいは、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである請求項１～５のいずれかに記載の抗体。

[請求項7] ラット以外の動物がウシであり、ウシ抗体のL鎖定常領域が、Lambda鎖の定常領域のアミノ酸配列を有し、かつ、ウシ抗体のH鎖定常領域が、ADCC活性及び/又はCDC活性を低下させる変異が導入されたものである請求項６記載の抗体。

[請求項8] ウシ抗体のL鎖定常領域が配列番号３のアミノ酸配列を有し、ウシ抗体のH鎖定常領域が配列番号４のアミノ酸配列を有する請求項７記載の抗体。

[請求項9] L鎖２本とH鎖２本の４本鎖構造を持つ請求項１～８のいずれかに記載の抗体。

[請求項10] 請求項１～９のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む、医薬組成物。

[請求項11] がん及び／又は感染症の予防及び／又は治療のための請求項１０記載の医薬組成物。

[請求項12] がん及び／又は感染症が、腫瘍性疾患、白血病、ヨーネ病、アナプラズマ病、細菌性乳房炎、真菌性乳房炎、マイコプラズマ感染症（例えば、マイコプラズマ性乳房炎、マイコプラズマ性肺炎など）、結核、小型ピロプラズマ病、クリプトスポリジウム症、コクシジウム症、トリパノソーマ病及びリーシュマニア症からなる群より選択される請求項１１記載の医薬組成物。

[請求項13] (a’)QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖定常領域とを有するL鎖をコードするDNAと、(b’)GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域とラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNAとを含む、人工遺伝子DNA。

[請求項14] 請求項１３記載の人工遺伝子DNAを含むベクター。

[請求項15] 請求項１４記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

[請求項16] 請求項１５記載の宿主細胞を培養し、培養物から抗PD-1抗体を採取することを含む、抗体の製造方法。

[請求項17] QSLEYSDGYTY（配列番号１６）のアミノ酸配列を有するCDR1、GVSのアミノ酸配列を有するCDR2及びFQATHDPDT（配列番号１７）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むL鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のL鎖

定常領域とを有するL鎖をコードするDNA。

[請求項18] GFSLTSYY（配列番号１８）のアミノ酸配列を有するCDR1、IRSGGST（配列番号１９）のアミノ酸配列を有するCDR2及びARTSSGYEGGFDY（配列番号２０）のアミノ酸配列を有するCDR3を含むH鎖可変領域と、ラット以外の動物抗体のH鎖定常領域とを有するH鎖をコードするDNA。

[図1]

軽鎖

斜体：可変領域配列（太字下線部：NH2 末端から順に CDR1, CDR2, CDR3）

正体：定常領域配列（ウシ Ig lambda, GenBank: X62917）

*MKVPGRLLVLLFWIPASRSDVVLTQTPVSLSVTLGDQASISCRSS**QSLEYSDGYTY**LE WYLQKPGQSPQLLIY**GVS**NRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYC**FQA THDPDT**FGAGTKLELK*QPKSPPSVTLFPPSTEELNGNKATLVCLISDFYPGSVTVVW KADGSTITRNVETTRASKQSNSKYAASSYLSLTSSDWKSKGSYSCEVTHEGSTVTKT VKPSECS*

重鎖

斜体：可変領域配列（太字下線部：NH2 末端から順に CDR1, CDR2, CDR3）

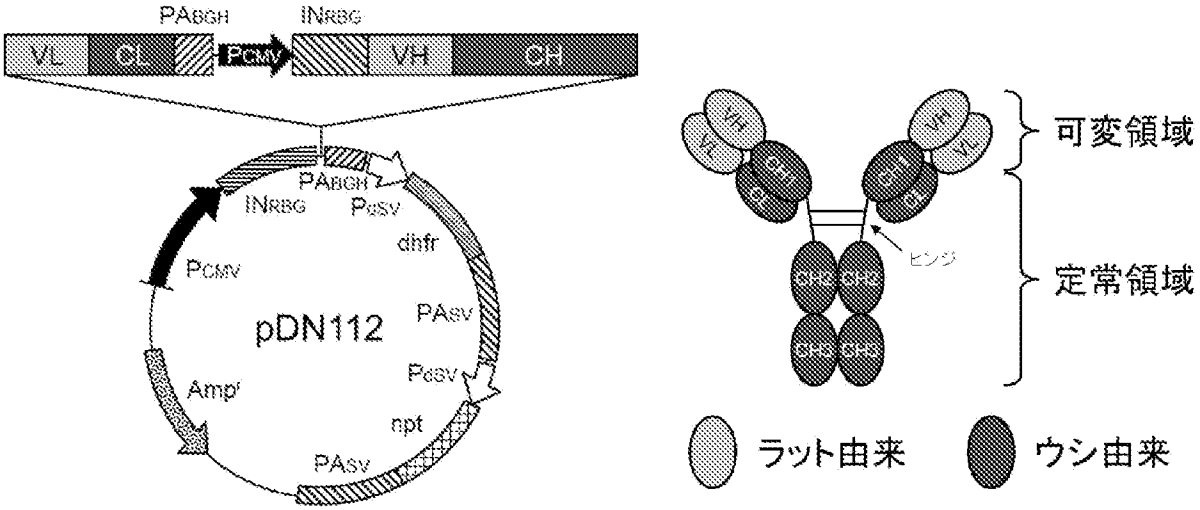
正体：定常領域配列（ウシ IgG1, GenBank: X62916 を改変）

二重下線：ウシ IgG1（CH2 ドメイン）の変異を加えたアミノ酸

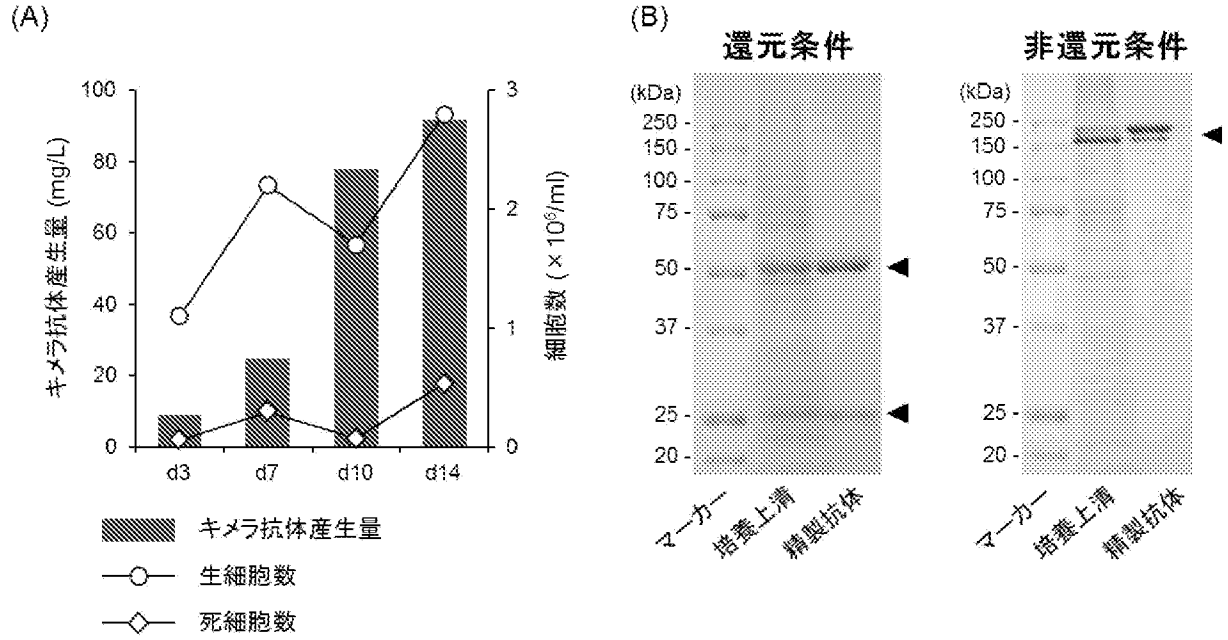
（アミノ酸番号および変異：251 E→P, 252 L→V, 253 P→A, 254 G→deletion, 348 A→S, 349 P→S）

*MAILVLLLCLVTIPHSVLSQVQLKETGPGLVQPTQTLSITCTVS**GFSLTSYY**IQWVRQT PGKGLEWMGF**IRSGGST**EYNSEFKSRLSINRDTSKNQVFLKMNSLKTEDTGVYYC**A RTSSGYEGGFDY**WGQGVMVTVSS*ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGCLVSSYM PEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMVTVPGSTSGQTFTCNVAHPASS TKVDKAVDPTCKPSPCDCCPPPPVAGPSVFIFPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGHD DPEVKFSWFVDDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVH NEGLPSSIVRTISRTKGPAREPQVYVLAPPQEELSKSTVSLTCMVTSFYPDYIAVEWQ RNGQPESEDKYGTTPPQLDADSSYFLYSKLRVDRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNH YTQKSTSKSAGK*

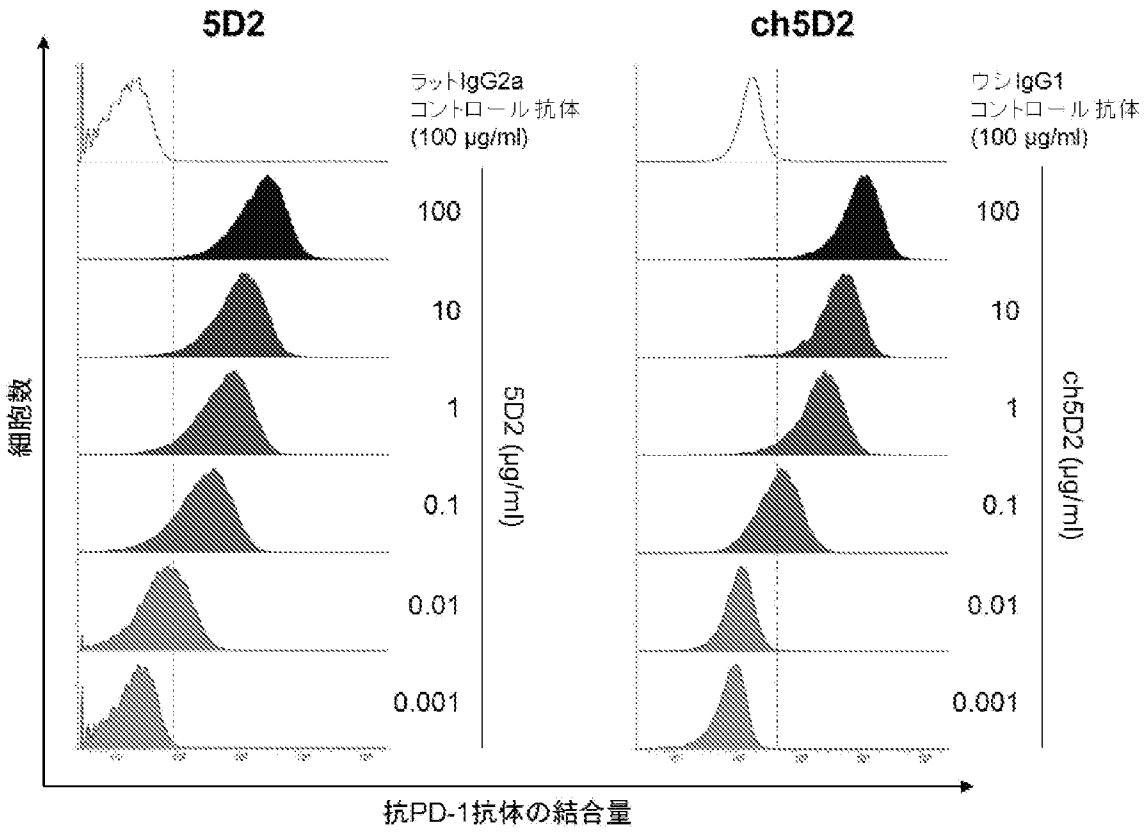
[図2]



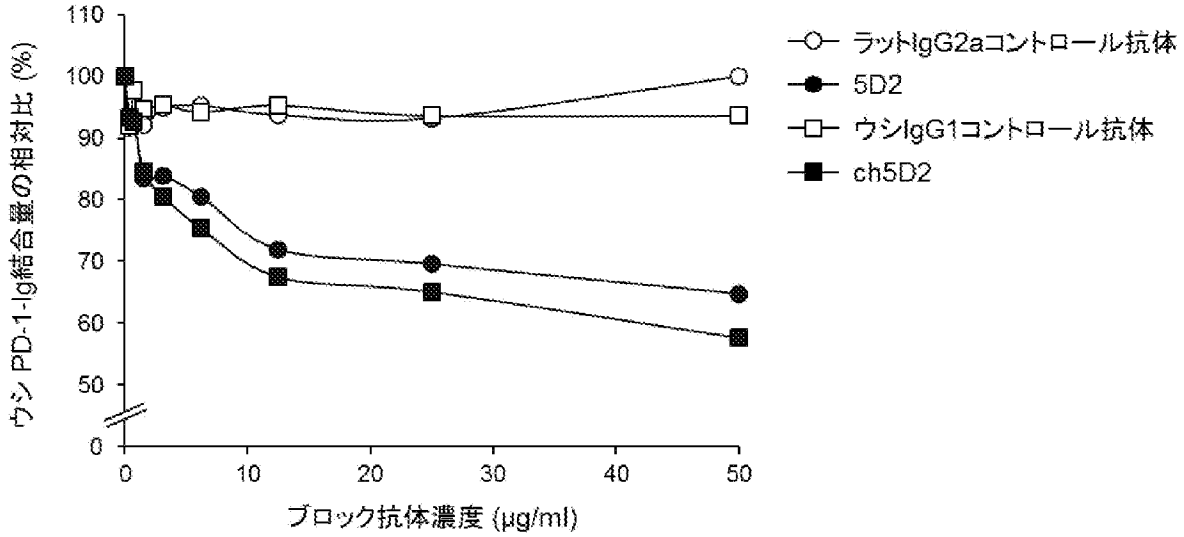
[図3]


(A)
キメラ抗体産生量 (mg/L)
細胞数 (×10⁶/ml)
d3
d7
d10
d14
キメラ抗体産生量
生細胞数
死細胞数
(B)
還元条件
非還元条件
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
マーカー
培養上清
精製抗体

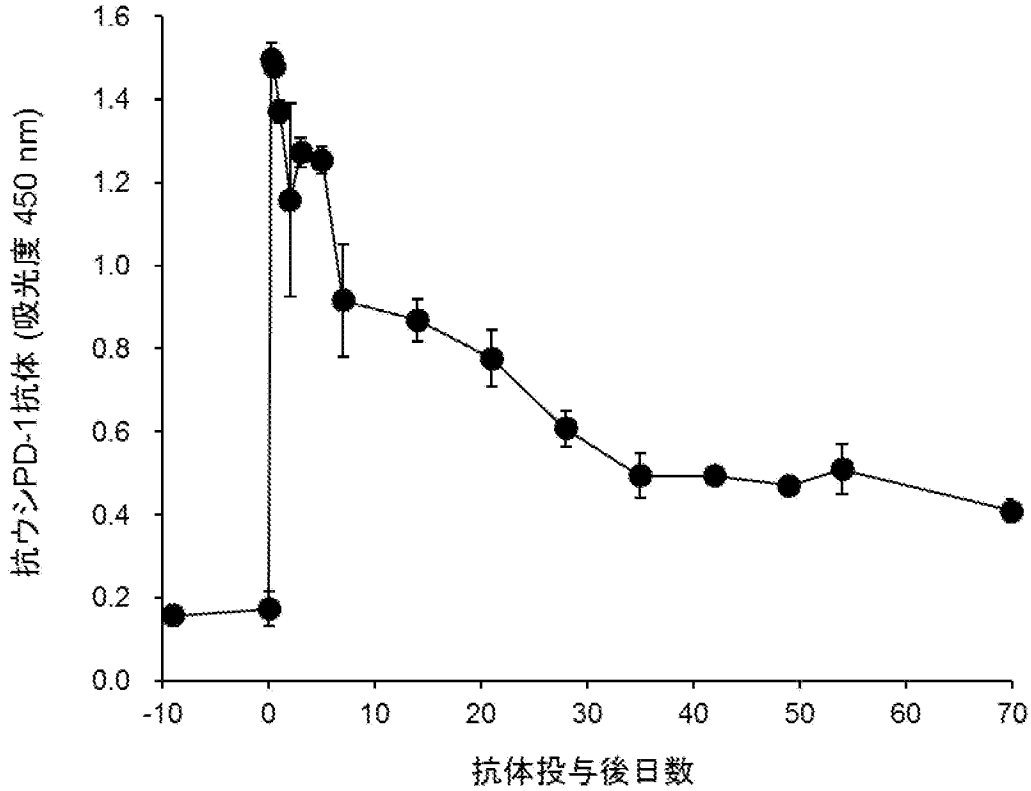
[図4]


5D2
ch5D2
ラットIgG2a
コントロール抗体
(100 μg/ml)
ウシIgG1
コントロール抗体
(100 μg/ml)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
5D2 (μg/ml)
ch5D2 (μg/ml)
細胞数
抗PD-1抗体の結合量

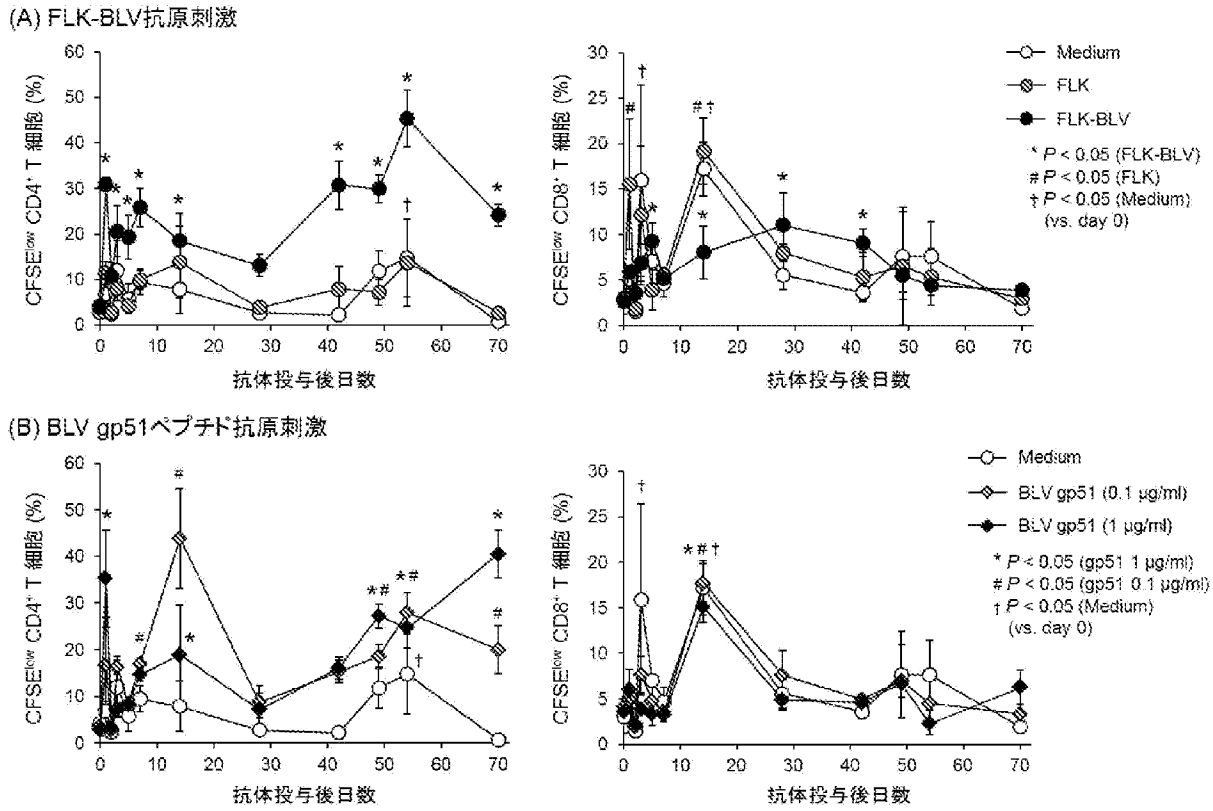
[図5]


ウシ PD-1-Ig結合量の相対比 (%)
110
100
90
80
70
60
50
0
0
10
20
30
40
50
ブロック抗体濃度 (μg/ml)
ラットIgG2aコントロール抗体
5D2
ウシIgG1コントロール抗体
ch5D2

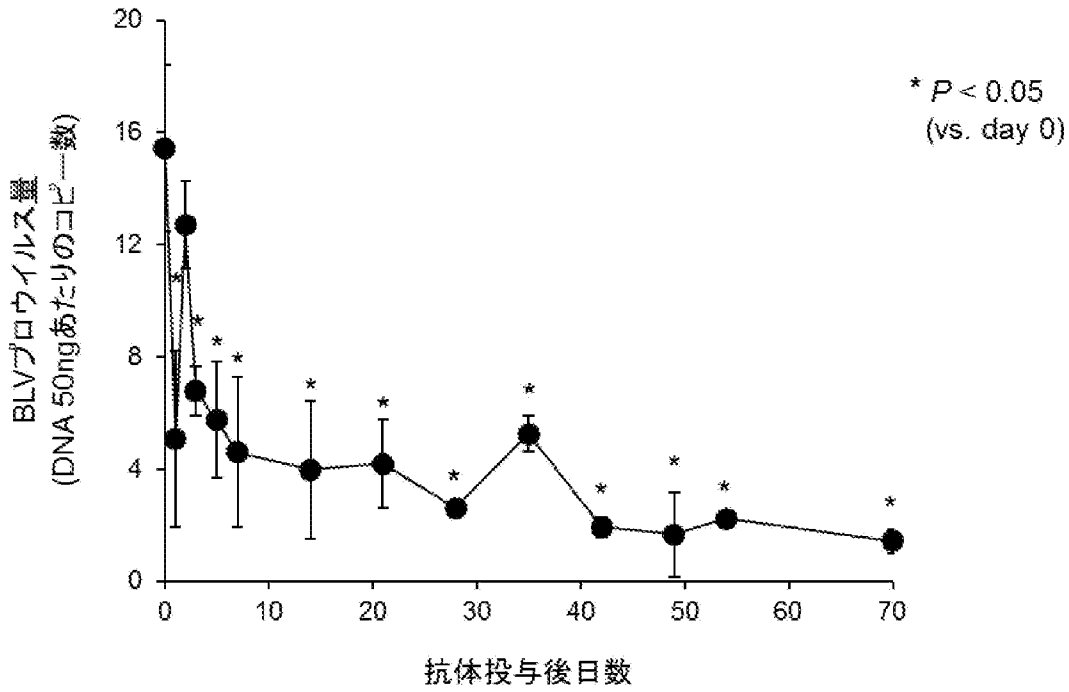
[図6]


抗ウシPD-1抗体 (吸光度 450 nm)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
抗体投与後日数

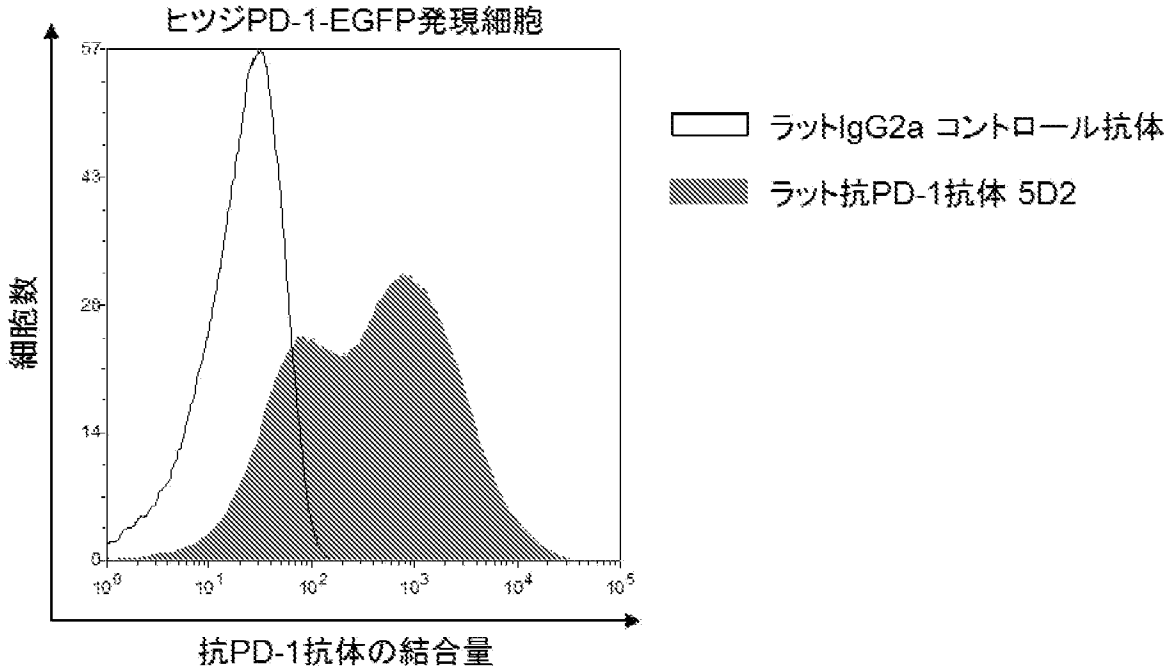
[図7]


(A) FLK-BLV抗原刺激
CFSE^low CD4+ T 細胞 (%)
CFSE^low CD8+ T 細胞 (%)
抗体投与後日数
Medium
FLK
FLK-BLV
* P < 0.05 (FLK-BLV)
# P < 0.05 (FLK)
† P < 0.05 (Medium) (vs. day 0)
(B) BLV gp51ペプチド抗原刺激
Medium
BLV gp51 (0.1 μg/ml)
BLV gp51 (1 μg/ml)
* P < 0.05 (gp51 1 μg/ml)
# P < 0.05 (gp51 0.1 μg/ml)
† P < 0.05 (Medium) (vs. day 0)

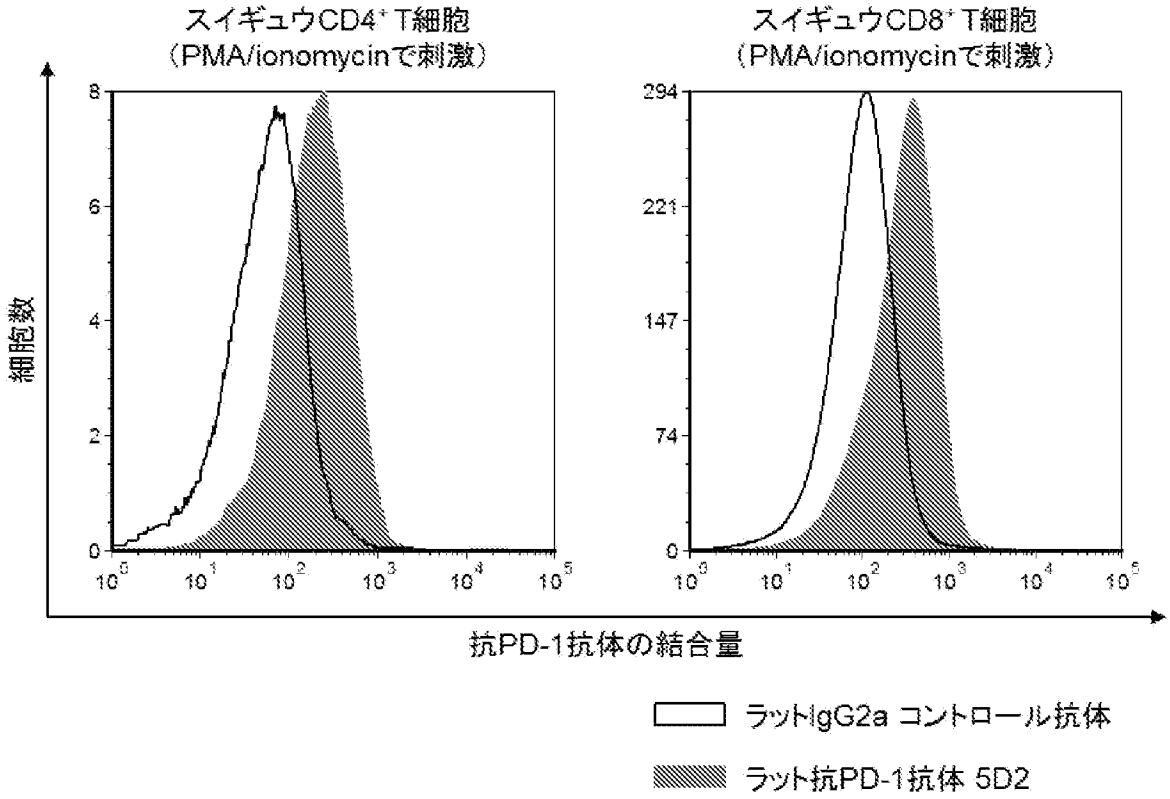
[図8]


BLVプロウイルス量
(DNA 50ngあたりのコピー数)
抗体投与後日数
* P < 0.05
(vs. day 0)

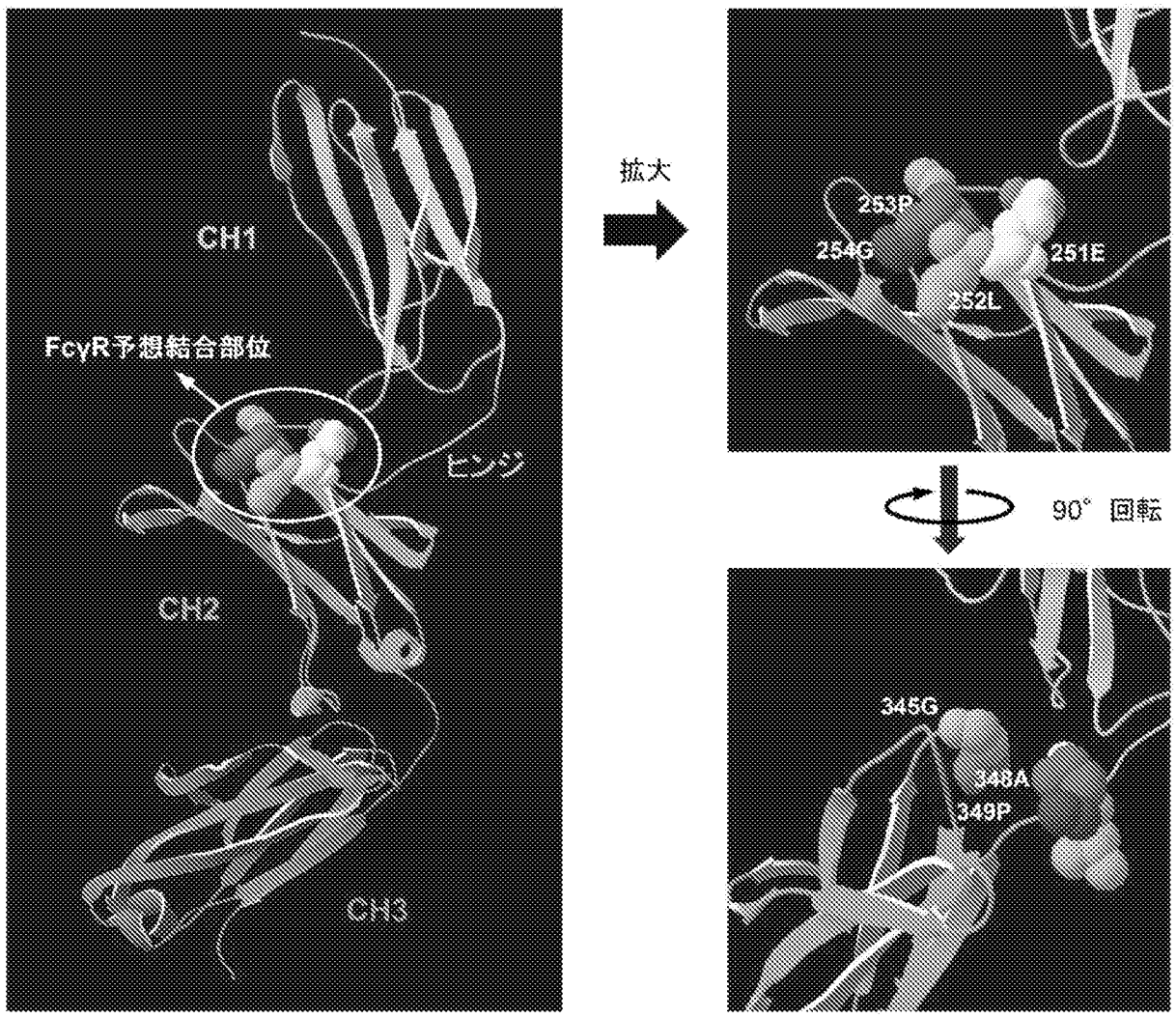
[図9]


ヒツジPD-1-EGFP発現細胞
細胞数
57
43
28
14
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
抗PD-1抗体の結合量
ラットIgG2a コントロール抗体
ラット抗PD-1抗体 5D2

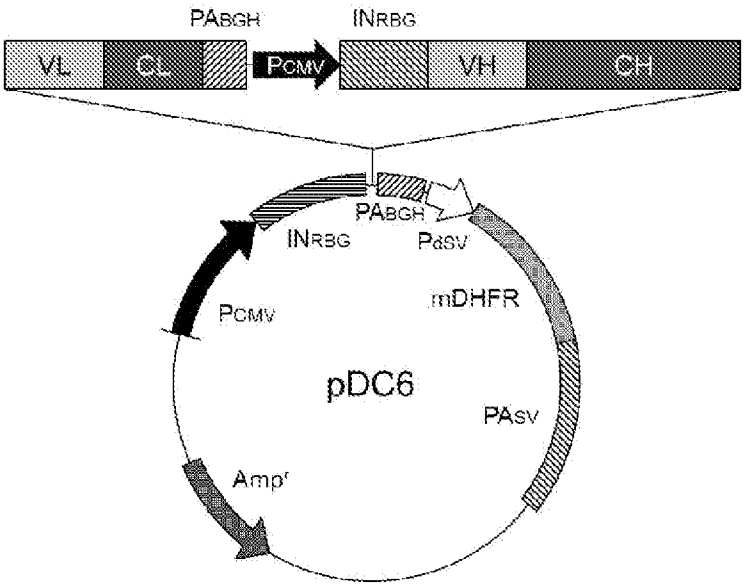
[図10]


スイギュウCD4⁺ T細胞
（PMA/ionomycinで刺激）
スイギュウCD8⁺ T細胞
（PMA/ionomycinで刺激）
細胞数
8
6
4
2
0
294
221
147
74
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
抗PD-1抗体の結合量
ラットIgG2a コントロール抗体
ラット抗PD-1抗体 5D2

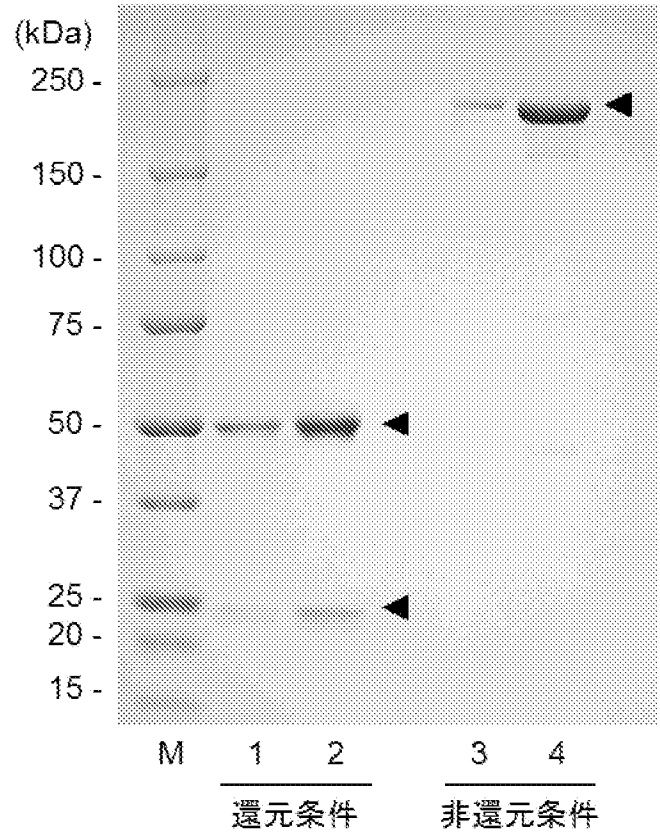
[図11]


CH1
FcγR予想結合部位
ヒンジ
CH2
CH3
拡大
253P
254G
251E
252L
90° 回転
345G
348A
349P

[図12]

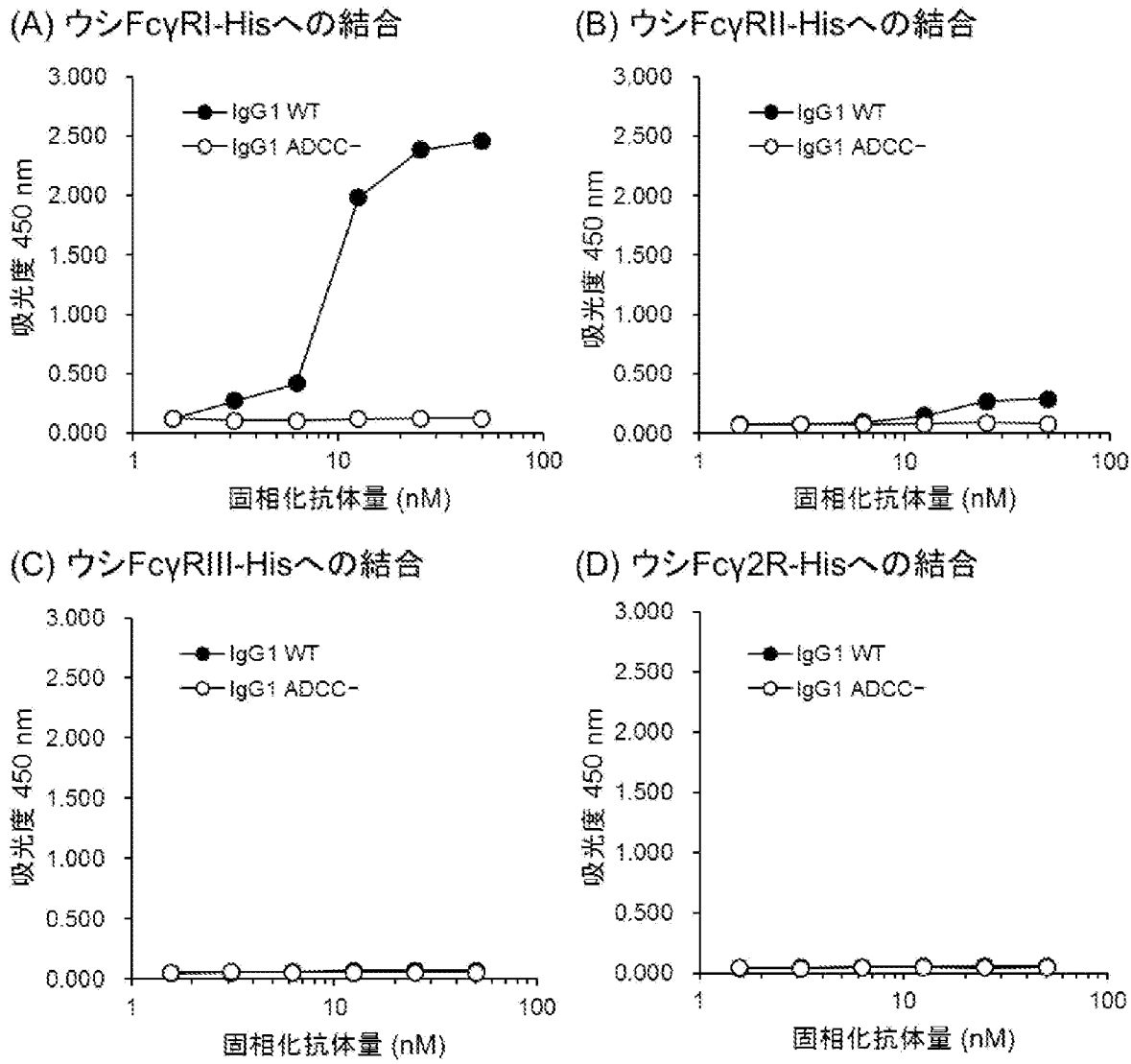

PABGH
INRBG
VL
CL
PCMV
VH
CH
PABGH
INRBG
PdSV
mDHFR
PCMV
pDC6
PASV
Ampr

[図13]



M: マーカー
1, 3: ch5D2 IgG1 WT
2, 4: ch5D2 IgG1 ADCC−

[図14]


(A) ウシFcγRI-Hisへの結合
(B) ウシFcγRII-Hisへの結合
(C) ウシFcγRIII-Hisへの結合
(D) ウシFcγ2R-Hisへの結合
IgG1 WT
IgG1 ADCC-
吸光度 450 nm
固相化抗体量 (nM)
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
1
10
100

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/029056

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P31/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07K16/18*(2006.01)i, *C07K16/28*(2006.01)i, *C07K16/46*(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, A61K39/395, A61P31/00, A61P35/00, C07K16/18, C07K16/28, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	2013 Fiscal Year Annual Research Report Ushi no Men'eki Yokusei Juyotai no Kino Kaiseki Oyobi Nanjisei Shippei no Shinki Seigyoho eno Oyo Kenkyu [online], 25 June 2015 (25.06.2015), [retrieval date: 23 October 2017 (23.10.2017)], Internet:<https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-13J01442/13J014422013jisseki/>	1-18
Y	IKEBUCHI, R. et al., Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro, Veterinary Research, 2013, Vol.44, No.59, p.1-15, a whole article, particularly, pages 6 to 7	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 October 2017 (26.10.17)	07 November 2017 (07.11.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/029056

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-509091 A (The Scripps Research Institute), 26 March 2015 (26.03.2015), SEQ ID NO:483 & US 2014/0050720 A1 & WO 2013/106489 A1 SEQ ID NO:483 & EP 2802601 A1 & CN 104411717 A	7-13
Y	IKEBUCHI, R. et al., Influence of PD-L1 cross-linking on cell death in PD-L1-expressing cell lines and bovine lymphocytes, Immunology, 2014, Vol.142, p.551-561, particularly, page 553	7-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/029056

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N1/21(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12P21/08*(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／０２９０５６

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, A61K39/395, A61P31/00, A61P35/00, C07K16/18, C07K16/28, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	2013 年度 実績報告書 ウシの免疫抑制受容体の機能解析および難治性疾病の新規制御法への応用研究[オンライン], 2015.06.25, [検索日：２０１７年１０月２３日]、インターネット：＜https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-13J01442/13J014422013jisseki/＞	1-18
Y	IKEBUCHI, R. et al., Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro, Veterinary Research, 2013, Vol.44, No.59, p.1-15, 全	1-18

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２６．１０．２０１７	０７．１１．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４５０８
上村　直子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	体。特に、第６頁～第７頁	
Y	JP 2015-509091 A (ザ　スクリプス　リサーチ　インスティテュート) 2015.03.26, 配列番号４８３ & US 2014/0050720 A1 & WO 2013/106489 A1 配列番号４８３ & EP 2802601 A1 & CN 104411717 A	7-13
Y	IKEBUCHI, R. et al., Influence of PD-L1 cross-linking on cell death in PD-L1-expressing cell lines and bovine lymphocytes, Immunology, 2014, Vol.142, p.551-561, 特に、第５５３頁	7-13