

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5766598号
(P5766598)

(45) 発行日 平成27年8月19日 (2015. 8. 19)

(24) 登録日 平成27年6月26日 (2015. 6. 26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 0 7 K 16/24 (2006. 01)

C 1 2 N 15/02 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 16/24 Z N A

C 1 2 N 15/00 C

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 U

請求項の数 13 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-507904 (P2011-507904)
 (86) (22) 出願日 平成21年5月6日 (2009. 5. 6)
 (65) 公表番号 特表2011-519571 (P2011-519571A)
 (43) 公表日 平成23年7月14日 (2011. 7. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/055448
 (87) 国際公開番号 W02009/135861
 (87) 国際公開日 平成21年11月12日 (2009. 11. 12)
 審査請求日 平成24年5月2日 (2012. 5. 2)
 (31) 優先権主張番号 08103847.3
 (32) 優先日 平成20年5月7日 (2008. 5. 7)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 311006593
 アーガス セラピューティクス インコー
 ポレイテッド
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
 7704 ダーラム テクノロジー ドラ
 イヴ 4233
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトインターフェロン- α に対するヒト化抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト化抗 I F N - 抗体又はその抗原結合断片であって、
 該ヒト化抗体は、
 マウス抗体 A C O - 1 のヒト化バージョンであり、
 ヒトインターフェロン - (I F N -) のサブタイプ A、2、B 2、C、F、G、H
 2、I、J 1、K、4 a、4 b および W A に特異的に結合し、かつ、該ヒト化抗体又はそ
 の抗原結合断片は、

以下の (a)、(b) 及び (c) :

(a) 配列番号 1 5 を含む C D R H 1 配列、

(b) 配列番号 2 1 を含む C D R H 2 配列、

(c) 配列番号 1 7 を含む C D R H 3 配列、

である V H C D R 配列を含み、

更に以下の (d)、(e) 及び (f) :

(d) 以下の (i) 又は (ii) :

(i) 配列番号 1 8、

(ii) 変異 Y 3 2 E により配列番号 1 8 とは異なる配列 (S A G S S V D S S E L Y)、
 を含む C D R L 1 配列、

(e) 配列番号 1 9 を含む C D R L 2 配列、

(f) 配列番号 2 0 を含む C D R L 3 配列

10

20

である V L C D R 配列を含む、
ヒト化抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

I F N - サブタイプ上で A C O - 1 抗体と同じエピトープを競合および / 又は同じエ
ピトープに結合する、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記抗体又はその抗原結合断片が I g G 4 サブタイプである、請求項 1 又は 2 に記載の
抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

配列番号 3 に対応する V H 配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体又は
その抗原結合断片。

【請求項 5】

変異 T 3 0 R 及び A 9 3 V のいずれか又は両方により配列番号 3 に示される配列とは異
なる V H 配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

配列番号 6 に対応する V L 配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体又は
その抗原結合断片。

【請求項 7】

変異 Y 3 2 E により配列番号 6 に示される配列とは異なる V L 配列を含む、請求項 1 ~
4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

配列番号 3 を含む V H ドメイン及び配列番号 6 を含む V L ドメインを含む、請求項 1 ~
3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

C D R L 1 配列が、変異 Y 3 2 E により配列番号 1 8 とは異なる配列 (S A G S S V
D S S E L Y) を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片
。

【請求項 1 0】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体を含む、治療組成物。

【請求項 1 1】

サブタイプの A、2、B 2、C、F、G、H 2、I、J 1、K、4 a、4 b 及び W A か
らなる群から選択された少なくとも 1 つの I F N - サブタイプの異常な発現と関連する
自己免疫性又は炎症性の疾患又は障害の治療に適した医薬を製造するための、請求項 1 ~
9 のいずれか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 1 2】

疾患又は障害が、S L E、関節リウマチ及び乾癬からなる群より選ばれる、請求項 1 1
に記載の使用。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片であって、

以下の (a)、(b) 及び (c) :

(a) 配列番号 1 5 (N Y W M H) を含む C D R H 1 配列、

(b) 配列番号 2 1 を含む C D R H 2 配列、

(c) 配列番号 1 7 を含む C D R H 3 配列

である V H C D R 配列を含み、

更に以下の (d)、(e) 及び (f) :

(d) 配列番号 1 8 (S A G S S V D S S Y L Y) を含む C D R L 1 配列、

(e) 配列番号 1 9 (S T S N L A S) を含む C D R L 2 配列、

(f) 配列番号 2 0 を含む C D R L 3 配列

である V L C D R 配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトインターフェロン（IFN-）に対するヒト化抗体、およびヒト患者の様々な疾患および障害の処置または防止におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

様々な異なる観察に基づけば、インターフェロン（IFN-）は多数の自己免疫性疾患に関与すると考えられるサイトカインである。全身性エリテマトーデス（SLE）患者のIFN-の血中濃度はしばしば測定可能ではないが、患者は明瞭なIFN-遺伝子シグネチャーを有するよう見える。さらに、SLE患者の血清での樹状細胞（DC）の処理によるDC成熟の誘導は、抗IFN-抗体によって阻害することができる。SLE表現型を有するニュージーランド・ブラック（NZB）マウスにおけるIFN- / 受容体のノックアウトが、ほとんど正常な表現型をもたらすことも示されている（Santago-Raber et al., J Exp Med. 2003;197(6):777-88）。

【0003】

したがって、IFN-に対する抗体は、単独でまたは組み合わせで、かかる自己免疫性疾患の処置のためにこのサイトカインの活性を中和するツールとして示唆されている。広範囲の異なるIFN-サブタイプを認識する特異的なマウス抗体（ACO-1～ACO-6）は、WO20060086586として公開済み国際特許出願中で記載されるように、生成および特性評価された。しかしながら、マウス抗体は免疫原性のためにヒトにおける使用には適切ではなく、したがってマウスCDRがヒトスキャフォールド抗体上にグラフトされたヒト化抗体を生成することが望ましい。しかしながら、ヒト化抗体は、しばしば、マウス親抗体と比較して、例えば、より低い親和性および/または安定性および/または所望されない免疫原性などの機能的欠損が短所である。ヒト化抗体中のかかる欠損は、いくつかの事例では、1つまたは少数の復帰点変異を生じさせることによって補うことができる。あまりにも多くの復帰変異の存在は所望されない低い安定性および/または所望されない程度の免疫原性をもたらす傾向があるので、復帰点変異を全く行わないか、または非常に少数の復帰点変異のみを行なうことが通常望ましい。したがって、例えば、非常に多数のIFN-サブタイプへのヒト化抗IFN-抗体の親和性および力価の保持などの望ましい生物学的特性を有する安全で安定性のあるヒト化抗IFN-抗体の供与が望ましい。

【0004】

したがって、例えば、安定性、特異性、安全性、免疫原性などのような特色に関して望ましい特色を有するヒト化抗IFN-抗体が当技術分野において必要とされる。さらに、かかる抗体を産生する効率的な方法が当技術分野において必要である。

【発明の概要】

【0005】

第1の態様において、本発明は、ヒトインターフェロン-（IFN-）を特異的に結合するヒト化抗体またはその抗原結合断片であって、ヒト化抗体がKababに從うマウス相補性決定領域（CDR）よりも少ないドナーアミノ酸残基を含む、マウス抗体のACO-1もしくはACO-2またはその組み合わせのヒト化バージョンである、ヒト化抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0006】

別の態様において、さらに本発明は、IFN-を特異的に結合するヒト化抗体またはその抗原結合断片であって、該抗体がIFN-サブタイプのA、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4bおよびWAを結合することが可能であるが、サブタイプの1またはDを結合することが可能ではなく、該抗体がKababに從う非ヒトCDRよりも少ないドナーアミノ酸残基を含む、ヒト化抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0007】

さらに本発明は、かかる抗体を得る方法に加えて、治療目的のためのかかる抗体の使用

10

20

30

40

50

およびかかる抗体を含む組成物に関する。

【0008】

本発明に従う抗体は様々な炎症性疾患の処置に適切でありえる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1A】ヒト化(hz = ヒト化)のためのマウスACO - 1 VH配列の解析を示した図であり、マスクは網掛け文字で示され、Kabatt CDRは太字で示され、マウス配列とヒト生殖細胞系列配列との間の違いは下線を引いた文字で示され、可能な体細胞超変異残基は太字の下線を引いた文字で、および可能な復帰変異残基は網掛けの下線を引いた文字で示される。ACO - 1 VH = 配列番号: 1; ヒト生殖細胞系列のVH1__46 / JH4 = 配列番号: 2; hzACO - 1 VH = 配列番号: 3。

10

【図1B】ヒト化(hz = ヒト化)のためのマウスACO - 1 VL配列の解析を示した図であり、マスクは網掛け文字で示され、Kabatt CDRは太字で示され、マウス配列とヒト生殖細胞系列配列との間の違いは下線を引いた文字で示され、可能な体細胞超変異残基は太字の下線を引いた文字で、および可能な復帰変異残基は網掛けの下線を引いた文字で示される。ACO - 1 VL = 配列番号: 4; ヒト生殖細胞系列のVKIIIL6 / JK2 = 配列番号: 5; hzACO - 1 VL = 配列番号: 6。

【図2A】ACO - 1とACO - 2との間のVH配列アライメントに加えて、対応するマウス生殖細胞系列配列を示した図である。ACO - 2 VH = 配列番号: 7; マウス生殖細胞系列J558.33 / D__ / JH3__1 = 配列番号: 8。

20

【図2B】ACO - 1とACO - 2との間のVL配列アライメントに加えて、対応するマウス生殖細胞系列配列を示した図である。ACO - 2 VL = 配列番号: 9; マウス生殖細胞系列ae4 / JK4__1 = 配列番号: 10。

【図3A】hzACO - 1の中への導入のために選択されたACO - 2残基の位置を示した図である。

【図3B】hzACO - 1の中への導入のために選択されたACO - 2残基の位置を示した図である。

【図4】CPE分析中のIFN - DおよびIFN - 1以外の試験されたすべてのインターフェロンサブタイプの保護的効果についてのhzACO - 1阻害を示した図である。

【図5】レポーター遺伝子(RG)分析による12個のIFN - 種のhzACO - 1阻害を示した図である。各々の抗体濃度の値を正規化し、4個の繰り返しの平均を計算した。データは平均 + / - 標準誤差として示される。最もフィットしたシグモイド応答曲線をプリズムソフトウェアを使用して計算した。R2値は0.98を超えたすべてのデータセットのためであった(曲線のフィッティングをしなかったIFN - Dを除く)。

30

【図6A】IFN - Aを使用する、ACO - 2に由来する単一変異A93Vを有するhzACO - 1バリエーションとhzACO - 1のRG分析の比較を示した図である。図5について記載されるようにデータ計算を行なった。

【図6B】IFN - Fを使用する、ACO - 2に由来する単一変異A93Vを有するhzACO - 1バリエーションとhzACO - 1のRG分析の比較を示した図である。図5について記載されるようにデータ計算を行なった。

40

【図7A】添加剤なしの、pH3.5でのhzACO - 1およびバリエーションの移行温度を示した図である。

【図7B】添加剤なしの、pH4.5でのhzACO - 1およびバリエーションの移行温度を示した図である。

【図7C】添加剤なしの、pH5.5でのhzACO - 1およびバリエーションの移行温度を示した図である。

【図8】X線結晶解析によって決定された、IFN - 8に結合したhzACO - 1のFab断片鎖(H、L)の構造を示した図である。

【図9】IFN - 8配列下の着色したボックスによって示されるように、IFNAR1およびIFNAR2についてのIFN - 8の結合エピトープを示した図である(Quadt-

50

Akabayov S.R. et al. Protein Sci. 15, 2656-2668, 2006 and Roisman L.C et al. J. Mol. Biol. 353, 271-281, 2005)。灰色のボックスによって示された残基はすべての I F N - サブタイプ間で部分的に保存されるが、黒のボックスによって示された残基は完全に保存される。4 の距離カットオフを使用する I F N - 8 の上の h z A C O - 1 結合エピトープは、I F N - 8 のアミノ酸配列の上に「*」によって示される。

【図10】R G 分析において、h z A C O - 1に加えてその2つのバリエーションに対してマウス A C O - 1 モノクローナル抗体を比較した図である。1つのバリエーションは完全な C D R H 2 を保有するヒト化 A C O - 1 (h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 と表記される)であるが、h z A C O - 1 は実施例2において記載されるように短い C D R H 2 で構築された。さらに、図は、合理的デザインを介して、複数の I F N - との相互作用に最適化した別の変異 h z A C O - 1 (h z A C O - 1 Y 3 2 E , T 3 0 R) を示す。図示されるように、これらの4つの組換えモノクローナル抗体バリエーションを5つの異なる代表的な I F N - サブタイプの阻害に関して比較した。

10

【図11】ヒトの I g G 1、I g G 2 および I g G 4 のアイソタイプで発現された h z A C O - 1 のタンパク質安定性の研究を示した図である。5週間のヒスチジンバッファー中のインキュベーション後に、H P L C によって凝集を決定した。

【図12】異なるエフェクター細胞：標的細胞比 (E : T) での、h z A C O - 1 I g G 4、I F N - およびその異なる組み合わせによる A D C C の欠如を示す、⁵¹C r 放出分析を示した図である。I F N - p r h z A C O - 1 なしの細胞 + P B M C 単独はバックグラウンド溶解を決定し、トリトン - X 1 0 0 は最大の溶解を示す。リツキサンは陽性対照として含まれており、すべての E : T 比で検出可能な細胞溶解を誘導する。

20

【図13】E L I S A による補体結合の研究を示した図である。I F N - に結合された場合、I g G 4 として発現された h z A C O - 1 は補体を固定することができなかった。陽性対照として、h z A C O - 1 は抗 I g G 4 ポリクローナル抗体と交差結合し、抗 I g G 4 に対する C 4 の明瞭な用量依存的結合が検出された。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、例えば S L E などの例えば狼瘡疾患または障害；移植片対宿主病；1型糖尿病、A I D S、自己免疫性甲状腺炎、乾癬、若年性皮膚筋炎およびシェーグレン症候群などの I F N - に関連する症状または疾患を患うヒト患者の処置のために適切な特性を持つ抗 I F N - 抗体に部分的に基づく。抗体は、典型的にはマウス A C O - 1 抗体および/またはマウス A C O - 2 抗体のヒト化バージョンに基づく。

30

【0011】

13の組換え I F N - サブタイプに加えてウイルス感染の際に産生される2つの複雑な I F N の混合物の生物活性をブロックできるとして A C O - 1 および A C O - 2 が同定された (W O 2 0 0 6 0 8 6 5 8 6 を参照)。A C O - 1 および A C O - 2 は、マイクロアレイ解析によって I F N - シグネチャーを示した S L E 患者からの血清の生物活性も一貫してブロックした。A C O - 1 および A C O - 2 は、I F N - タンパク質サブタイプの D および 1 の生物活性を有意に中和しなかったが、S L E 血清の I F N - 生物活性を中和した。理論で限定されるものではないが、したがって、サブタイプの D および 1 が S L E の病因に有意に関与しない可能性がある。

40

【0012】

実施例において記載されるように、可変領域の構造的なモデル化は、K a b a t C D R よりも少ないドナー (マウス) 残基を使用して A C O - 1 および A C O - 2 をヒト化し、したがってヒト患者における有害な免疫応答のリスクをさらに減少させることが可能であることを明らかにした。この解析は復帰変異に有利な部位も同定した。恐らく A C O - 1 可変領域と A C O - 2 可変領域との間の高い配列相同性 (13の部位でのみ異なる) のために、対応する位置の A C O - 2 残基によってヒト化 A C O - 1 (h z A C O - 1) 配列中の特定のアミノ酸残基を置き換えることができることがさらに見出された。C D R 領域内では、通常、抗体配列をあまりヒトにはせずに変異を生じさせることができる。この

50

ヒト化手順は、ヒト化抗体の親和性、安定性、発現レベルおよびIFN- 阻害活性などの機能特性の改善をもたらした。

【0013】

ヒト化ACO-1抗体において、hzACO-1 VH(配列番号:3)中の例示的な変異は、Kababナンバリングを使用して、V5Q、T28S、M69L、R71V、T73K、S76I、S76N、T77I、V78A、Y79FおよびA93Vに加えて、その任意の組み合わせを含む。hzACO-1 VL(配列番号:6)中の例示的な変異は、E1Q、D29G、L33F、L47W、S50G、I58VおよびF71Yに加えて、その任意の組み合わせを含む。1つの実施形態において、hzACO-1 VH領域は、T28S、N31SおよびA93Vから選択された変異を含む。別の実施形態において、hzACO-1 VH領域は、T28S、N31SおよびA93Vから選択された変異、ならびに例えばT28SおよびN31S、T28SおよびA93V、ならびにN31SおよびA93Vなどのその任意の組み合わせを含む。別の実施形態において、hzACO-1 VH領域は、T28S、N31SおよびA93Vから選択された変異、または例えばT28SおよびN31S、T28SおよびA93V、もしくはN31SおよびA93Vなどのその組み合わせ;ならびに少なくとも1つの追加の変異を含む。

定義

【0014】

本発明の理解を促進するために、多数の用語を以下に定義する。

【0015】

「ACO-1抗体およびACO-2抗体」はWO20060086586中で特徴づけられ記載される。ACO-1はATCCアクセッション番号PTA-6557(WO2006086586)で寄託され、ACO-2はATCCアクセッション番号PTA-7778(WO2008021976)として寄託される。本発明に記載の抗体はACO-1およびACO-2のヒト化バリエーションである。しかしながら、本発明に記載のACO-1およびACO-2のヒト化バージョンは、全長マウスKabab配列を含まない。好ましい実施形態において、CDR配列の少なくとも1つは、約3~10個のアミノ酸、好ましくは3~8個、より好ましくは4~7個のアミノ酸の短縮を含む。抗体は、好ましくはCDRH2中に短縮を含み、好ましくは該CDRH2は、3~10個、好ましくは3~8個、より好ましくは4~7個、最も好ましくは6個のアミノ酸で短縮される。そしてさらに続いて1つまたは複数のCDR配列中に加えて、ヒトスキャフォールド抗体内に点変異をたんに導入することができる。しかしながら、用語「ACO-1抗体およびACO-2抗体」は、IFN- サブタイプのA、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4bおよびWAの結合が可能であるがサブタイプの1またはDの結合が可能でない任意のIFN- 抗体をさらに包含することができる。しかしながらCDR配列中の差が少数のアミノ酸のみであるので、ACO-1およびACO-2それ自体がただ1つの抗体として認識できることが理解されるべきである。したがってACO-1およびACO-2が同じ抗体の生体内の体細胞超変異の2つの段階を表わすことはもっともらしいことである。本発明に記載のACO-1抗体/ACO-2抗体は、したがって、ACO-1およびACO-2のCDR配列と少なくとも90%、より好ましくは少なくとも92%、最も好ましくは少なくとも95%の同一性を有するCDR配列を含むヒト化抗体である。

【0016】

用語:「CDR短縮」、「前進変異」および「CDRを短くすること」は、文献の全体にわたって同じ意味で使用することができる。かかる用語は、一般的には本発明と関連してCDR短縮が多数の連続した前進変異として認識できるという事実を指し、短くされたマウスCDR断片がヒトフレームワーク上にグラフトされうることを意味する。短いCDRのグラフトが免疫原性の程度が減少した抗体をもたらす傾向があることは意外ではないが、例えば安定性、特異性などのようなヒト化抗体の他の有利な特色を保持することができるのは実際には意外である。「復帰変異」は、フレームワーク中の(すなわちCDR中ではない)変異を常に指し、典型的には、復帰変異は、例えば抗体構造を安定させるため

に選択された部位での１つまたは複数の「マウス」アミノ酸残基の導入である。

【 0 0 1 7 】

用語「インターフェロン」（ＩＦＮ－）は、本明細書において使用される時、先天免疫の主要なエフェクターのいくつかを含むタンパク質のファミリーを指す。ヒトＩＦＮ－について少なくとも１５の公知のサブタイプがある。ＩＦＮ－タンパク質サブタイプおよび対応するコード遺伝子の名称は、表１中で以下にリストされる。

表１ ＩＦＮ－タンパク質サブタイプおよび遺伝子

【表１】

ＩＦＮ－ α タンパク質サブタイプ	対応するＩＦＮ－ α 遺伝子
A	2 a
2	2 b
B 2	8
C	1 0
D (V a l ¹¹⁴)	1
F	2 1
G	5
H 2	1 4
I	1 7
J 1	7
K	6
4 a	4 a
4 b	4 b
WA	1 6
1 (A l a ¹¹⁴)	1

10

20

【 0 0 1 8 】

Pestka et al. (1997) 「Interferon Standardization and Designations」 J Interferon Cytokine Res 17: Supplement 1, S9-S14を参照。ＩＦＮ－Ｂ２は時にはＩＦＮ－Ｂとも呼ばれ、ＩＦＮ－と混同すべきではない。白血球からの天然のＩＦＮ－（白血球ＩＦＮ－）に加えて、組換えヒトＩＦＮ－タンパク質サブタイプは、ＰＢＬバイオメディカル・ラボラトリーズ（ＰＢＬ Biomedical Labs）社、ピスカタウェイ、ニュージャージー（interferonsource.com）から入手可能である。天然のＩＦＮ－はＩＦＮ－サブタイプの複雑な混合物である。ＥＬＩＳＡおよびＲＩＡなどのこれらのインターフェロンを検出および定量する方法は、当技術分野において公知である。

30

【 0 0 1 9 】

用語「抗体」は、最も広い意味で本明細書において使用され、全長モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ならびに特別の指示が無いかまたは文脈によって否定されない限り、所望の生物学的活性を示すならば、抗原結合断片、抗体バリエーションおよびその多重特異性分子を具体的には含む。一般的には、全長抗体は、ジスルフィド結合によって相互に連結した少なくとも２個の重（Ｈ）鎖および２個の軽（Ｌ）鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分である。各々の重鎖は、重鎖可変領域（ＶＨとして本明細書において略される）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は３個のドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３）を含む。各々の軽鎖は、軽鎖可変領域（ＶＬとして本明細書において略される）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は１個のドメイン（ＣＬ）を含む。ＶＨ領域およびＶＬ領域は、より保存された領域（フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる）が散在する超可変性の領域（相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる）へとさらに細分することができる。各々のＶＨおよびＶＬは３個のＣＤＲおよび４個のＦＲからなり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４の順序でアミノ末端からカル

40

50

ボキシ末端にアレンジされている。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。

【 0 0 2 0 】

抗体の「抗原結合断片」は、抗原に検出可能に結合できる全長抗体の一部を含む分子である。抗原結合断片は、1、2、3またはそれ以上の抗体の抗原結合部分を含む多価分子、ならびに合成リンカーによってまたは機能的な抗原結合分子を形成する組換え方法によってV L領域およびV H領域またはその選択された部分が連結される一本鎖コンストラクトを含む。

【 0 0 2 1 】

用語「抗体誘導体」および「免疫コンジュゲート」は、全長抗体またはその抗原結合断片を含み、例えば第2の分子に抗体を連結するための、例えばアルキル化、P E G化、アシル化、エステル形成もしくはアミド形成または同種のものによって、1つまたは複数のアミノ酸が化学的に修飾される分子を示すように、本明細書において同じ意味で使用される。例示的な修飾は、P E G化、システイン - P E G化、ビオチン化、放射能標識、および検出可能薬剤または細胞傷害剤などの第2の薬剤とのコンジュゲーションを含む。

【 0 0 2 2 】

「多重特異性分子」は、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する分子を生成するために、少なくとも1つの他の機能分子（例えば別の抗体または受容体のリガンドなどの別のペプチドまたはタンパク質）と結合または連結される、抗体またはその抗原結合断片を含む。例示的な多重特異性分子は、二重特異性抗体、および可溶性受容体断片またはリガンドに連結された抗体を含む。

【 0 0 2 3 】

「ヒト化」抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列（C D R領域）を含有するヒト/非ヒトキメラ抗体である。ヒト化抗体は、したがって所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域の残基によって、レシピエントの超可変領域の残基が置き換えられるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの実例において、ヒト免疫グロブリンのF R残基は対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体、またはドナー抗体において見出されない残基を含むことができる。これらの修飾は抗体性能をさらに改良するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、すべてまたは実質的にすべての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、すべてまたは実質的にすべてのF R残基がヒト免疫グロブリン配列のF R残基である、少なくとも1つのおよび典型的には2つの可変ドメインを実質的にすべて含む。ヒト化抗体は、少なくとも免疫グロブリン定常領域（F c）（典型的にはヒト免疫グロブリンのF c）の一部も随意に含むことができる。

【 0 0 2 4 】

本明細書において使用される場合、用語「超可変領域」は、抗原結合に關与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般的には「相補性決定領域」または「C D R」からのアミノ酸残基（軽鎖可変ドメイン中の24 ~ 34（L1）、50 ~ 56（L2）および89 ~ 97（L3）ならびに重鎖可変ドメイン中の31 ~ 35（H1）、50 ~ 65（H2）および95 ~ 102（H3）の残基；Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、米国保健社会福祉省、N I H公開番号91 - 3242）および/または「超可変ループ」からのアミノ酸残基（軽鎖可変ドメイン中の26 ~ 32（L1）、50 ~ 52（L2）および91 ~ 96（L3）ならびに重鎖可変ドメイン中の26 ~ 32（H1）、53 ~ 55（H2）および96 ~ 101（H3）の残基；Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987;196:901-917）を含む。典型的には、この領域中のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat et al.（前出）中で記載される方法によって行なわれる。「K a b a t位置」、「K a b a t残基」および「K a b a tに従う」、などの語句は、本明細書において重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインのためのこのナンバリングシステムを指す。K a b a tナンバリングシステムを使用して、ペプチドの実

10

20

30

40

50

際の直線的アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはCDRの短縮またはその中への挿入に対応して、アミノ酸の減少またはアミノ酸の追加を含有することができる。例えば、重鎖可変ドメインはCDRH2の残基の52後のアミノ酸挿入(Kabatに従う残基52a、52bおよび52c)、および重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばKabatに従う残基82a、82bおよび82cなど)を含むことができる。残基のKabatナンバリングは、「スタンダード」のKabatでナンバリングされた配列を持つ抗体の配列の相同領域でのアライメントによって、与えられた抗体について決定することができる。

【0025】

「フレームワーク領域」残基または「FR」残基は、本明細書において定義されるようなCDR以外のVH残基またはVL残基である。

10

【0026】

2つの実質的に同一のアミノ酸配列中の「対応する」アミノ酸位置は、典型的にはデフォルトパラメーターを使用して、本明細書において参照された任意のタンパク質分析ソフトウェアによってアライメントさせた位置である。

【0027】

「単離された」分子は、それが属する分子のクラスに関して見出される組成物中で優勢種である分子である(すなわち、組成物中の分子のタイプのうちの少なくとも約50%を占め、典型的には組成物中の分子種(例えばペプチド)の少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、またはそれ以上を占める)。一般に、抗体分子の組成物は、組成物中に存在するすべてのペプチド種状況における抗体分子について、または少なくとも提案された使用状況において実質的に活性のあるペプチド種に関して、98%、98%または99%の均一性を示す。

20

【0028】

用語、「選択的に中和する」および「選択的に中和すること」は、本明細書において使用される時、1つまたは複数のIFN- γ タンパク質サブタイプの生物活性の少なくとも約40%、少なくとも約50%、または少なくとも約60%を選択的に中和するが別のIFN- γ タンパク質サブタイプの少なくとも1つの生物活性を有意に中和しない、単離され精製された抗体(モノクローナル抗体などであるがこれらに限定されない)、またはその抗原結合断片を指し、ここで生物活性は例えばMxAプロモーターの活性化および/または抗ウイルス活性でありえる。

30

【0029】

本発明の文脈において、「処置」または「処置すること」は、文脈によって否定されない限り、1つまたは複数の病徴、または疾患もしくは障害の臨床的に関係のある兆候を防止、緩和、管理、治癒または減少させることを指す。例えば、病徴、または臨床的に関係のある疾患もしくは障害の兆候が同定されていない患者の「処置」は、防止的または予防的な治療法であるが、病徴、または臨床的に関係のある疾患もしくは障害の兆候が同定された患者の「処置」は、一般的には防止的または予防的な治療法ではない。

【0030】

語句「IFN- γ に関連する症状または疾患」は、本明細書において使用される時、患者の血清中のIFN- γ レベルの上昇と関連づけられる異常な症状、疾患または前臨床疾患の状態を指す。かかるものの実例は、SLEなどの狼瘡疾患または障害、移植片対宿主病(GVHD)、1型糖尿病、AIDS(ヒト免疫不全ウイルス(HIV)によって引き起こされる)、自己免疫性甲状腺炎および乾癬を含むが、これらに限定されない。IFN- γ のレベルを決定する方法は、当技術分野において公知である。

40

ヒト化抗IFN- γ 抗体

【0031】

本発明の抗体は、抗IFN- γ マウス抗体のACO-1またはACO-2のヒト化バージョン、そのバリエーション、および/または、特定の機能的および/または構造的な特色または特性によって特徴づけられるその抗原結合断片である。以下に記載されるように、組

50

換え抗体は標準的技術によって適切な宿主細胞株において産生され、それらの機能的活性を評価する様々な分析によって特徴づけることができる。実際は、本発明に記載の I F N - 抗体が従来の方法のヒト化 I F N - 抗体と比較して、有意に改善された収率で産生されることが判明する。

【 0 0 3 2 】

いわゆる「ベストフィット」法に従って、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を、公知のヒト可変ドメイン配列またはヒト生殖細胞系列配列のライブラリーなどのライブラリーに対してスクリーニングする。次いで、げっ歯類の配列に最も近いヒト配列は、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク領域として認めることができる (Sims et al., J. Immunol. 1993;151:2296 et seq.; Chothia et al, Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987;196 :901-917)。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークを複数の異なるヒト化抗体のために使用することができる。

【 0 0 3 3 】

本発明の抗体における使用のために好ましいフレームワーク配列は、A C O - 1またはA C O - 2によって使用されるフレームワーク配列に構造的に類似したものである。したがって、1つの実施形態において、本発明は、ヒト V H 1 __ 4 6 遺伝子およびヒト J H 4 遺伝子に由来する V H フレームワーク残基、およびヒト V K I I I __ L 6 遺伝子およびヒト J K 2 遺伝子に由来する V L フレームワーク残基を含み、ヒト I F N - を特異的に結合する、ヒト化 A C O - 1 抗体またはヒト化 A C O - 2 抗体を提供する。

【 0 0 3 4 】

下記の実施例 1 は、かかるフレームワーク配列を含む例示的なヒト化 A C O - 1 抗体 (h z A C O - 1) のデザインを記載する。

機能特性

【 0 0 3 5 】

本発明のヒト化抗体は、特異的に I F N - サブタイプの A、2、B 2、C、F、G、H 2、I、J 1、K、4 a、4 b および W A に結合する (表 2)。1つの実施形態において、本発明のヒト化 A C O - 1 抗体またはヒト化 A C O - 2 抗体は、I F N - A などの I F N - タンパク質サブタイプに高親和性、例えば約 10^{-7} M 以下の K D、約 10^{-8} M 以下の K D、約 5×10^{-9} M 以下の K D、または約 2×10^{-9} M 以下の K D で結合する。1つの実施形態において、ヒト化抗体は、h z A C O - 1 の親和性に同等かまたはそれよりも高い親和性で、I F N - A、I F N - F、および / または別の I F N - タンパク質サブタイプに結合する h z A C O - 1 バリエーションである。

表 2。広範囲にわたるヒト I F N - サブタイプについての h z A C O - 1 の動力学的パラメーター

【表 2】

Sample	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
hIFN- α A	2.97E+05	3.94E-04	1.33E-09
hIFN- α 1	No binding	-	-
hIFN- α 2	3.58E+05	3.51E-04	9.81E-10
hIFN- α 4b	3.74E+05	6.22E-04	1.67E-09
hIFN- α G	4.63E+05	4.26E-04	9.20E-10
hIFN- α H2	3.78E+05	1.21E-03	3.21E-09
hIFN- α I	7.23E+05	2.03E-03	2.81E-09
hIFN- α J1	6.81E+05	3.27E-03	4.81E-09
hIFN- α WA	7.09E+05	2.91E-03	4.10E-09
hIFN- α 4a	3.33E+04	1.15E-04	3.45E-09
hIFN- α C	7.19E+05	7.53E-04	1.05E-09
hIFN- α K	5.74E+05	8.27E-04	1.44E-09

結合なし

【0036】

例えば、IFN- α タンパク質サブタイプに対するh z ACO-1バリエーションのKDとh z ACO-1のKDとの間の比は、約1.0、約0.8、約0.7、または約0.6でありえる。別の実施形態において、ヒト化抗体は、組換えにより産生されたACO-1の親和性に同等かまたはそれよりも高い親和性で、IFN- α 、IFN- β 、および/または別のIFN- α タンパク質サブタイプに結合するh z ACO-1バリエーションである。別の実施形態において、ヒト化抗体は、ハイブリドーマにより産生されたACO-1の親和性に同等かまたはそれよりも高い親和性で、IFN- α 、IFN- β 、および/または別のIFN- α タンパク質サブタイプに結合するh z ACO-1バリエーションである。

10

【0037】

さらに、本発明のヒト化抗体は、1つまたは複数のIFN- α タンパク質サブタイプの生物活性を選択的に中和することができる。例えば、対照と比較して、ヒト化ACO-1バリエーションまたはヒト化ACO-2バリエーションは、IFN- α タンパク質サブタイプのA、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4bまたはWA、またはその任意の組み合わせの生物活性の少なくとも約40%、少なくとも約50%、または少なくとも約60%を選択的に中和することができる。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、IFN- α サブタイプのDおよび/または1の生物活性を有意に中和しない。例示的な生物活性は、MxAプロモーターもしくは抗ウイルス活性、または両者の活性化を含むが、これらに限定されない。ヒト化抗体がかかるIFN- α 生物活性を中和する能力は、例えば、本明細書において記載されたレポーター遺伝子(RG)および細胞変性の阻害(CPE)分析を使用して評価することができる。1つの実施形態において、ヒト化抗体は、RG分析においてh z ACO-1のIC50に同等かまたはそれよりも低いIC50を有するh z ACO-1バリエーションである。特定の実施形態において、h z ACO-1バリエーションは、RG分析においてh z ACO-1よりも低いIC50を有する。

20

【0038】

1つの実施形態において、本発明のヒト化抗体は、IFN- α タンパク質サブタイプ上でACO-1および/またはACO-2と同じエピトープを競合および/または同じエピトープに結合する。かかる抗体は、本明細書において記載されるように標準的なIFN- α 結合分析においてACO-1および/またはACO-2と交差競合する能力に基づいて同定することができる。ACO-1またはACO-2が1つまたは複数のIFN- α タンパク質サブタイプに結合することを試験ヒト化抗体が阻害する能力は、試験抗体がACO-1またはACO-2とIFN- α への結合を競合し、したがってIFN- α タンパク質サブタイプ上でACO-1および/またはACO-2と同じエピトープに結合できることを実証する(WO 02066649およびWO 2005059106)。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、マウスモノクローナル抗体の9F3、MMHA-1、MMHA-2、MMHA-3、MMHA-6、MMHA-8、MMHA-9、MMHA-11、MMHA-13およびMMHA-17(PBLバイオメディカル・ラボラトリーズ(Bio medicinal Laboratories)社、ニュージャージー、アメリカ)、および/またはヒトモノクローナル抗体の13H5、13H7および7H9のいずれかと異なるヒトIFN- α エピトープに結合し、および/または1つまたは複数のリストされたマウスモノクローナル抗体およびヒトモノクローナル抗体以上にACO-1またはACO-2と交差競合する。

30

40

【0039】

1つの実施形態において、本発明によって提供されるh z ACO-1、h z ACO-2、h z ACO-1バリエーションまたはh z ACO-2バリエーションは、Kabataに従うマウスCDR(Kabata ACO-1)を含むヒト化ACO-1抗体またはヒト化ACO-2抗体と同等かまたはそれらよりも低い免疫原性を有する。ヒト化抗体の免疫原性はWadwa et al., Dev Biol (Basel) 2005;122:155-70中で記載される1つまたは複数の方法に

50

よって例えば評価することができ、その全体は参照することにより本明細書に組み入れられる。

【0040】

さらなる態様において、本発明のヒト化抗体はヒト患者に投与のために適切な製剤中で安定である。1つの実施形態において、本発明に記載のヒト化 ACO - 1 抗体またはヒト化 ACO - 2 抗体は、全長マウス Kabat 配列を含む従来の方法におけるヒト化 IFN - 抗体と少なくとも同じくらいの安定性がある。抗体の安定性は、実施例 11 で記載されるサーマフロウル (thermaflo) 分析を含む当技術分野において公知の方法を使用して評価することができる。

【0041】

本発明の好ましいヒト化抗体は、以下の特性のうちの少なくとも 1、好ましくは、2、3、4、5、またはそれ以上のものを示す。(a) IFN - サブタイプの A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b および WA に特異的に結合する；(b) IFN - タンパク質サブタイプの A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b もしくは WA；その任意の組み合わせ、またはそのすべての 1 つまたは複数の生物活性を選択的に中和する；(c) IFN - 1 または IFN - D の生物活性を有意に中和しない；(d) IFN - タンパク質サブタイプ上で ACO - 1 および / または ACO - 2 と同じエピトープを競合および / または同じエピトープに結合する；(e) 9F3、13H5、13H7 および 7H9 のいずれか以上に ACO - 1 または ACO - 2 と競合する；(f) Kabat に従うマウス CDR を含む hz ACO - 1 抗体または hz ACO - 2 抗体よりも免疫応答を誘発する可能性が低い；(g) 医薬用製剤中で安定である；(h) 10^{-8} M 以下の KD で、IFN - タンパク質サブタイプの A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b または WA の少なくとも 1 つに結合する。

構造特性

【0042】

本発明の好ましい抗体はマウスモノクローナル抗体の ACO - 1 および ACO - 2 のヒト化バージョンである。実施例中で記載されるように、かかる抗体は産生され、単離され、構造的および機能的に特徴づけることができる。ACO - 1 および hz ACO - 1 および ACO - 2 の全長の可変領域および Kabat CDR 配列を、表 3 中で説明し、図 1 ~ 3 中で記載する。

表 3 プライマー、タンパク質および抗体のための配列ナンバリング

10

20

30

【表 3】

抗体部分	配列組成	配列	配列番号:
ACO-1 VH	タンパク質		1
VH1_46/JH4	タンパク質		2
h z ACO-1 VH	タンパク質		3
ACO-1 VL	タンパク質		4
VKIII_L6/JK2	タンパク質		5
h z ACO-1 VL	タンパク質		6
ACO-2 VH	タンパク質		7
J558.33/D_/JH3_1	タンパク質		8
ACO-2 VL	タンパク質		9
a e 4/ JK4_1	タンパク質		10
PCRプライマーACO-1クローニング	DNA		11
PCRプライマーACO-1クローニング	DNA		12
ACO-1 VH	DNA		13
ACO-1 VL	DNA		14
ACO-1 CDR_H1	タンパク質	NYWMH	15
ACO-1 CDR_H2	タンパク質	EINPSHGRITYNEN FKS	16
ACO-1 CDR_H3	タンパク質	GGLGPAWFAY	17
ACO-1 CDR_L1	タンパク質	SAGSSVDSSSYLY	18
ACO-1 CDR_L2	タンパク質	STSNLAS	19
ACO-1 CDR_L3	タンパク質	HQWSSYPFT	20
h z ACO-1 CDR_H2	タンパク質	EINPSHGRITYAQK FQG	21
ACO-2 CDR_H1	タンパク質	SYWMH	22
ACO-2 CDR_H2	タンパク質	EINPSHGRITYNEN FKS	23
ACO-2 CDR_L1	タンパク質	SAGSSVGSSSYFY	24
ACO-2 CDR_L2	タンパク質	GTSNLAS	25
PCRプライマーACO-2クローニング	DNA		26
PCRプライマーACO-2クローニング	DNA		27
ACO-2 VH	DNA		28
ACO-2 VL	DNA		29
h IFN- α 8	タンパク質		30
h z ACO-1 Fab HC	タンパク質		31
h z ACO-1 LC	タンパク質		32

【0043】

h z ACO-1 CDR H1、H3、L1、L2およびL3の配列は、対応するACO-1配列と同一である。ACO-2 CDR H3およびL3は対応するACO-1 CDR配列と同一である。h z ACO-1 CDR_H2配列中のイタリック体で示されるアミノ酸は、ヒトフレームワーク配列に対応し、従来のヒト化抗体では全長Kabat配列はACO-1 CDR_H2配列（アミノ酸はすべてマウス抗体に由来する）に対応する。

【0044】

1つの態様において、本発明は、Kabat CDRよりも少ないドナー残基（すなわちkabat CDRのグラフトによって産生されたヒト化ACO-1抗体またはヒト化ACO-2抗体よりも少ないマウス残基）を持つマウスACO-1抗体およびマウスACO-2抗体のヒト化バージョンを提供する。

【0045】

1つの実施形態において、ヒト化抗体はヒトIFN- γ を特異的に結合し、Kabatに従うマウス相補性決定領域(CDR)よりも少ないドナーアミノ酸残基を含むマウス抗体のACO-1もしくはACO-2またはその組み合わせのヒト化バージョンである。CDRH2配列は、例えば、Kabat残基の50~65、50~64、50~63、50~62、50~61または50~60に対応する残基よりも少ないドナーアミノ酸残基を含みうる。CDRH2ドナー残基はKabat残基50~59を含むことができる。さらにまたはあるいは、CDRH2ドナーアミノ酸残基はKabat残基50~59からなることができる。Kabat残基50~59は、配列番号：16、21および23の残基1~11に対応する。1つの実施形態において、残りのVH CDRは、Kabat CDR(図1~3を参照)、すなわち、Kabat残基31~35に対応するドナーアミノ酸残基を含むCDRH1配列、およびKabat残基95~102に対応するドナーアミノ酸残基を含むCDRH3配列を含むかまたはそれらからなることができる。

10

【0046】

1つの実施形態において、ヒト化ACO-1抗体またはヒト化ACO-2抗体は、ACO-1軽鎖の可変(VL)領域のKabat残基24~34に対応するドナーアミノ酸残基を含むCDRL1、ACO-1 VL領域のKabat残基50~56に対応するドナーアミノ酸残基を含むCDRL2、およびACO-1 VL領域(配列番号：4)またはACO-2 VL領域(配列番号：9)のKabat残基89~97に対応するドナーアミノ酸残基を含むCDRL3を含むことができる。さらにまたはあるいは、抗体は、Kabat残基24~34からなるCDRL1ドナーアミノ酸残基、Kabat残基50~56からなるCDRL2ドナー残基、およびKabat残基89~97からなるCDRL3ドナーアミノ酸残基を含むことができる。対応するアミノ酸配列を表3中を示す。

20

【0047】

1つの態様において、本発明は特異的なヒト化ACO-1抗体を提供する。ヒト化ACO-1抗体は、ヒトIFN- γ を特異的に結合し、随意のN31S変異を持つ、配列番号：3のKabat残基の31~35、50~65および95~102の配列に実質的に同一のVH CDR配列を含む。抗体は、例えば、配列番号：15を含むCDRH1配列；配列番号：21を含むCDRH2配列；および配列番号：17を含むCDRH3配列を含むことができる。さらにまたはあるいは、抗体は、配列番号：15からなるCDRH1配列；配列番号：21からなるCDRH2配列；および配列番号：17からなるCDRH3配列を含むことができる。1つの実施形態において、ヒト化ACO-1は、ヒトVH1__46遺伝子に由来するVHフレームワーク残基および/またはヒトJH4遺伝子、好ましくは両方を含む。特定の実施形態において、ヒト化抗体は配列番号：3に対応するVH配列を含む。

30

【0048】

ヒト化ACO-1抗体は配列番号：6のKabat残基の24~34、50~56および89~97の配列に実質的に同一のVL CDR配列をさらに含むことができる。抗体は、例えば、配列番号：18を含むCDRL__L1配列；配列番号：19を含むCDRL__L2配列；および配列番号：20を含むCDRL__L3配列を含むことができる。さらにまたはあるいは、配列番号：18からなるCDRL__L1配列；配列番号：19からなるCDRL__L2配列；および配列番号：20からなるCDRL__L3配列を含むことができる。1つの実施形態において、ヒト化ACO-1抗体は、ヒトVKII__L6遺伝子に由来するVLフレームワーク残基および/またはヒトJK2遺伝子、好ましくは両方を含む。特定の実施形態において、ヒト化抗体は配列番号：6に対応するVL配列を含む。

40

【0049】

1つの態様において、本発明は、ACO-2のCDR配列を含む抗体を提供する。抗体は、ヒトIFN- γ を特異的に結合することができ、配列番号：7のKabat残基の31~35、50~59および95~102の配列に実質的に同一のVH CDR配列を含む。1つの実施形態において、抗体は、配列番号：22を含むCDRH__H1配列；配列番

50

号：23を含むCDR_{H2}配列；および配列番号：17を含むCDR_{H3}配列を含む。追加または代替の実施形態において、抗体は、配列番号：22からなるCDR_{H1}配列；配列番号：23からなるCDR_{H2}配列；および配列番号：17からなるCDR_{H3}配列を含む。抗体は、配列番号：9の残基K a b a t残基の24～34、50～56および89～97の配列に実質的に同一のVL CDR配列をさらに含むことができる。1つの実施形態において、抗体は、配列番号：24を含むCDR_{L1}配列；配列番号：25を含むCDR_{L2}配列；および配列番号：20を含むCDR_{L3}配列を含む。さらにまたはあるいは、抗体は、配列番号：24からなるCDR_{L1}配列；配列番号：25からなるCDR_{L2}配列；および配列番号：20からなるCDR_{L3}配列を含む。1つの態様において、抗体はヒト化ACO-2抗体でありえる。

10

【0050】

ヒト化ACO-1抗体またはヒト化ACO-2抗体は、少なくともヒトFc領域の一部をさらに含むことができる（抗体が任意のFc部分を含まない抗原結合断片でない限り）。典型的には、Fc領域のサイズは抗体の所望の薬物動態学的特性（Fc部分が大きいほどクリアランスは遅い）を達成するように選択される。1つの実施形態において、ヒト化抗体は、好ましくはIgG4アイソタイプFc領域を含む全長抗体である。特定の実施形態において、IgG4 Fc領域はK a b a tに従うナンバリングでS241P変異（EUのナンバリングシステム（Edelman G.M. et AL., Proc. Natl. Acad. USA 63, 78-85 (1969)）で残基228に対応する）を含む。

【0051】

20

ACO-1およびACO-2の両方がIFN- γ に結合することができ、類似しているならば、ヒト化VH配列およびVL配列は、本発明の他の抗IFN- γ 結合分子を作成するために「ミックスおよびマッチ」させることができる。本明細書において記載された結合分析（例えばフローサイトメトリー、ピアコア（Biacore）、ELISA）を使用して、および/または本明細書において記載されるような1つまたは複数の機能分析を使用して、かかる「ミックスおよびマッチ」させた抗体のIFN- γ 結合を、検査することができる。好ましくは、VH鎖およびVL鎖をミックスおよびマッチさせる場合、特定のVH/VL対からのVH配列は、構造的に類似したVH配列により置換される。同様に、特定のVH/VL対からのVL配列は、構造的に類似したVL配列により好ましくは置換される。

30

【0052】

したがって、1つの態様において、本発明は、(a) ACO-1またはACO-2のVH CDRを含むVH領域および(b) ACO-1またはACO-2のVL CDRを含むVL領域を含み；IFN- γ を特異的に結合する、ヒト化モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。好ましい重鎖および軽鎖の組み合わせは、(a) 配列番号：16の5個のC末端アミノ酸のいくつかまたはすべてを随意に省く、配列番号：15～17を含むVH領域および(b) 配列番号：18～20を含む軽鎖可変領域；(a) 配列番号：16の5個のC末端アミノ酸のいくつかまたはすべてを随意に省く、配列番号：15～17を含むVH領域および(b) 配列番号：24、25および20を含む軽鎖可変領域；(a) 配列番号：23の5個のC末端アミノ酸のいくつかまたはすべてを随意に省く、配列番号：22、23および17を含むVH領域および(b) 配列番号：18～20を含む軽鎖可変領域；ならびに(a) 配列番号：23の5個のC末端アミノ酸のいくつかまたはすべてを随意に省く、配列番号：22、23および17を含むVH領域および(b) 配列番号：24、25および20を含む軽鎖可変領域を含む。他の好ましい重鎖および軽鎖の組み合わせは、(a) 配列番号：3の配列を含むVH領域および(b) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むVL領域；(a) 配列番号：15、21および17を含むVH、および(b) 配列番号：18～20を含むVL；ならびに(a) 配列番号：15、21および17を含むVH、および(b) 配列番号：24および25および20を含むVLを含む。

40

【0053】

別の態様において、本発明は、ACO-1またはACO-2の重鎖および軽鎖のCDR

50

1、CDR2および/またはCDR3を含む抗体、またはその組み合わせを提供する。これらの抗体の各々がIFN- γ に結合することができ、その抗原結合特異性が主としてCDR1領域、CDR2領域およびCDR3領域によって提供されるならば、本発明の他の抗IFN- γ 結合分子を作成するために、CDRH1配列、H2配列、およびH3配列ならびにCDRL1配列、L2配列およびL3配列はミックスおよびマッチさせることができる(すなわち、各々の抗体はCDRH1、H2およびH3ならびにCDRL1、L2およびL3を含有できるが、異なる抗体からのCDRをミックスおよびマッチさせることができる)。以下におよび実施例中に記載される結合分析を使用して、「ミックスおよびマッチ」させたかかるとの抗体のIFN- γ 結合を検査することができる(例えばフローサイトメトリー、ピアコアまたはELISA)。好ましくは、VHCDR配列がミックスおよびマッチされる場合、特定のVH配列からのCDRH1配列、H2配列および/またはH3配列は、構造的に類似したCDR配列により置換される。同様に、VLCDR配列がミックスおよびマッチさせる場合、特定のVL配列からのCDRL1配列、L2配列および/またはL3配列は、構造的に類似したCDR配列により好ましくは置換される。例えば、ACO-1およびACO-2のCDRは実質的な構造類似性を共有し、したがってミックスおよびマッチを適用可能である。

【0054】

したがって、別の態様において、本発明は、(a)配列番号：15および22からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDRH1；(b)少なくとも配列番号：16および23の残基1～12からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDRH2、(c)配列番号：17を含むCDRH3；(d)配列番号：18および24からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDRL1；(e)配列番号：19および25からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDRL2；ならびに(f)配列番号：20を含むCDRL3を含み；IFN- γ を特異的に結合する、ヒト化モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0055】

好ましい実施形態において、抗体は、(a)配列番号：15を含むCDRH1；(b)少なくとも配列番号：16の残基1～12を含むCDRH2；(c)配列番号：17を含むCDRH3；(d)配列番号：18を含むCDRL1；(e)配列番号：19を含むCDRL2；および(f)配列番号：20を含むCDRL3を含む。

【0056】

別の好ましい実施形態において、抗体は、(a)配列番号：22を含むCDRH1；(b)少なくとも配列番号：23の残基1～12を含むCDRH2；(c)配列番号：17を含むCDRH3；(d)配列番号：24を含むCDRL1；(e)配列番号：25を含むCDRL2；および(f)配列番号：20を含むCDRL3を含む。

【0057】

好ましい実施形態において、抗体は、(a)配列番号：15を含むCDRH1；(b)配列番号：21を含むCDRH2；(c)配列番号：17を含むCDRH3；(d)配列番号：18を含むCDRL1；(e)配列番号：19を含むCDRL2；および(f)配列番号：20を含むCDRL3を含む。

【0058】

好ましい実施形態において、抗体は、(a)配列番号：22を含むCDRH1；(b)少なくとも配列番号：16の残基1～12を含むCDRH2；(c)配列番号：17を含むCDRH3；(d)配列番号：18を含むCDRL1；(e)配列番号：19を含むCDRL2；および(f)配列番号：20を含むCDRL3を含む。

【0059】

好ましい実施形態において、抗体は、(a)配列番号：15を含むCDRH1；(b)少なくとも配列番号：16の残基1～12を含むCDRH2；(c)配列番号：17を含むCDRH3；(d)配列番号：24を含むCDRL1；(e)配列番号：19を含むCDRL2；および(f)配列番号：20を含むCDRL3を含む。

【0060】

好ましい実施形態において、抗体は、(a) 配列番号：15を含むCDR H1；(b) 少なくとも配列番号：16の残基1～12を含むCDR H2；(c) 配列番号：17を含むCDR H3；(d) 配列番号：18を含むCDR L1；(e) 配列番号：25を含むCDR L2；および(f) 配列番号：20を含むCDR L3を含む。

ヒト化抗IFN- 抗体バリエーション

【0061】

典型的には抗体のバリエーションまたは誘導体は、親抗体と比較して少なくとも1つの改変された特性を有するが、抗体のバリエーションまたは誘導体は、以下のものを含むが、これらに限定されない本特許の抗IFN- 抗体の機能特性の1つ、いくつか、大部分またはすべてを保持することができる。(a) IFN- サブタイプA、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4bおよびWAに特異的に結合する；(b) IFN- タンパク質サブタイプA、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4bもしくはWA；その任意の組み合わせ、またはそのすべての1つまたは複数の生物活性を選択的に中和する；(c) IFN- 1またはIFN- Dの生物活性を有意に中和しない；(d) IFN- タンパク質サブタイプ上でACO- 1および/またはACO- 2と同じエピトープを競合および/または同じエピトープに結合する；(e) 9F3、13H5、13H7および7H9のいずれか以上にACO- 1またはACO- 2と競合する；(f) Kabatに従うマウスCDRを含むh z ACO- 1抗体またはh z ACO- 2抗体よりも免疫応答を誘発する可能性が低い；(g) 医薬用製剤中で安定である；(h) 10^{-8} M以下のKDで、IFN- タンパク質サブタイプA、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4bまたはWAの少なくとも1つに結合する。上で記載された機能特色、および/または実施例中で記載されるような機能特色の任意の組み合わせは、本発明の抗体によって示されうる。

【0062】

特定の実施形態において、本発明のヒト化抗体は、CDR H1～H3配列を含むVH領域およびCDR L1～L3配列を含むVL領域を含み、1つまたは複数のこれらのCDR配列は、本明細書において記載された好ましい抗体(ACO- 1およびACO- 2またはその保存的修飾物)に基づいて指定されたアミノ酸配列を含み、当該抗体は、本発明の抗IFN- 抗体の所望の機能特性を保持または改善する。したがって、本発明は、CDR H1、CDR H2およびCDR H3配列を含む重鎖可変領域ならびにCDR H1、CDR H2およびCDR H3配列を含む軽鎖可変領域を含み、それらが、(a) 配列番号：15および22からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDR H1ならびにその保存的修飾物；(b) 少なくとも配列番号：16および23の残基1～12からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDR H2ならびにその保存的修飾物、(c) 配列番号：17を含むCDR H3およびその保存的修飾物；(d) 配列番号：18および24からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDR L1ならびにその保存的修飾物；(e) 配列番号：19および25からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDR L2ならびにその保存的修飾物；ならびに(f) 配列番号：20を含むCDR L3およびその保存的修飾物であり；IFN- を特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0063】

したがって、本発明の抗体のCDRまたはFRの領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基により置換することができ、本明細書において記載された機能分析を使用して、保持された機能(すなわち、(c)、(d)および(e)中で説明された機能)について改変された抗体を検査することができる。

【0064】

抗体バリエーションの機能特性は、当技術分野において利用可能なおよび/または本明細書において記載された標準的な分析を使用して評価することができる。例えば、抗体がIFN- を結合する能力は、実施例中で説明されたもの(例えばピアコア、またはELIS

10

20

30

40

50

A)などの、標準的な結合分析および生物学的効果(例えばレポーター遺伝子)分析を使用して決定することができる。

可変領域修飾

【0065】

1つの態様において、本発明は、CDRまたはフレームワーク領域中に変異を持つヒト化ACO-1抗体またはヒト化ACO-2抗体を提供する。

【0066】

ヒト化ACO-1中の特定の例示的な変異およびそれらの同定は実施例2および3中に記載される(図1および3も参照)。これらは両方の復帰変異(ヒト化ACO-1の中へのACO-1残基の導入に加えて、ACO-2に由来する残基をヒト化ACO-1の中へ導入する変異)を含む。h z ACO-1 VH(配列番号:3)における例示的な復帰変異は、K a b a tナンバリングを使用して、V5Q、M69L、R71V、T73K、S76IおよびV78Aに加えて、その任意の組み合わせを含む。h z ACO-1 VL(配列番号:6)における例示的な復帰変異は、E1Q、L47W、I58VおよびF71Yに加えて、その任意の組み合わせを含む。h z ACO-1 VH(配列番号:3)における例示的なACO-2由来変異は、T28S、N31S、I58S、S76N、T77IおよびA93Vに加えて、その任意の組み合わせを含む。h z ACO-1 VL(配列番号:6)における例示的なACO-2由来変異は、D29G、L33FおよびS50Gに加えて、その任意の組み合わせを含む。

【0067】

さらに、様々なh z ACO-1 VHおよびVLのバリエーション配列は、本発明のh z ACO-1バリエーションのライブラリーを作成するために、バリエーション配列または親配列と「ミックスおよびマッチ」させることができる。本明細書において記載された結合分析(例えばピアコア、ELISA)を使用して、および/または本明細書において記載されるような1つまたは複数の機能分析を使用して、「ミックスおよびマッチ」させたかかると抗体のIFN-結合を検査することができる。

【0068】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトIFN-を特異的に結合し、ヒトIFN-を結合するドナー非ヒト抗体からヒト抗体可変ドメインの中へ取り込まれたアミノ酸を有する可変ドメインを含有し、重鎖可変ドメイン中の5、28、31、58、69、71、73、76、78、79および93からの選択された1つまたは複数の部位でドナー抗体アミノ酸残基を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0069】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトIFN-を特異的に結合し、ヒトIFN-を結合するドナー非ヒト抗体からヒト抗体可変ドメインの中へ取り込まれたアミノ酸を有する可変ドメインを含有し、軽鎖可変ドメイン中の1、29、33、47、50、58および71から選択された1つまたは複数の部位でドナー抗体アミノ酸残基を含む、ヒト化抗体を提供する。

【0070】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトIFN-を特異的に結合し、ヒトIFN-を結合するACO-1からヒト抗体可変ドメインの中へ取り込まれたCDR配列を有する可変ドメインを含有し、重鎖可変ドメイン中の28、31、58、76、77、78、79および93から選択された1つまたは複数の部位でACO-2アミノ酸残基をさらに含む、ヒト化ACO-1抗体を提供する。特定の実施形態において、ACO-2アミノ酸残基は、28、31および93から選択された1つまたは複数の部位である。

【0071】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトIFN-を特異的に結合し、ヒトIFN-を結合するACO-1からヒト抗体可変ドメインの中へ取り込まれたCDR配列を有する可変ドメインを含有し、軽鎖可変ドメイン中の29、33および50から選択された1つまたは複数の部位でACO-2アミノ酸残基をさらに含む、ヒト化ACO-1抗体を提

供する。

【0072】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトIFN- γ を特異的に結合し、配列番号：3のKabat残基の31～35、50～65および95～102の配列に実質的に同一のVH CDR配列を含み、N31S変異を持つ、hzACO-1バリエーションを提供する。抗体は、例えば、N31S変異を持つ配列番号：15を含むCDR H1配列；配列番号：21を含むCDR H2配列；および配列番号：17を含むCDR H3配列を含むことができる。さらにまたはあるいは、抗体は、N31S変異を持つ配列番号：15からなるCDR H1配列；配列番号：21からなるCDR H2配列；および配列番号：17からなるCDR H3配列を含むことができる。1つの実施形態において、ヒト化ACO-1は、ヒトVH1__46遺伝子に由来するVHフレームワーク残基および/またはヒトJH4遺伝子、好ましくは両方を含む。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、Kabat位置31でNからSの変異を持つ配列番号：3に対応するVH配列を含む。実施例中で示されるように、hzACO-1中のN31S変異は、ACO-1と同等のレベルにIFN- γ Aへの結合親和性を増加させ、pH3.5および4.5での安定性を増加させた。さらに、残基31が「ドナー」CDR残基中にあるので、さらなるマウス残基は変異によってhzACO-1配列の中へ導入されず、したがってヒトに投与された場合に抗体に対する免疫応答のリスクを増加させない。同じ利点を持った他のCDR変異は、hzACO-1 VL中にD29GおよびS50Gを含む。

10

【0073】

1つの実施形態において、本発明はヒトIFN- γ を特異的に結合し、T28S変異を持つ配列番号：3のKabat残基の31～35、50～65および95～102の配列に実質的に同一のVH CDR配列を含むhzACO-1バリエーションを提供する。抗体は、例えば、配列番号：15を含むCDR H1配列；配列番号：21を含むCDR H2配列；および配列番号：17を含むCDR H3配列を含むことができる。さらにまたはあるいは、抗体は、配列番号：15からなるCDR H1配列；配列番号：21からなるCDR H2配列；および配列番号：17からなるCDR H3配列を含むことができる。1つの実施形態において、ヒト化ACO-1は、T28S変異をさらに含む、ヒトVH1__46遺伝子に由来するVHフレームワーク残基を含む。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、Kabat位置28でTからSの変異を持つ配列番号：3に対応するVH配列を含む。実施例中で示されるように、hzACO-1中のT28S変異は、ACO-1と同等のレベルにIFN- γ Aへの結合親和性を増加させ、pH3.5および4.5での安定性を増加させた。

20

30

【0074】

1つの実施形態において、本発明はヒトIFN- γ を特異的に結合し、A93V変異を持つ配列番号：3のKabat残基31～35、50～65および95～102の配列に実質的に同一のVH CDR配列を含むhzACO-1バリエーションを提供する。抗体は、例えば、配列番号：15を含むCDR H1配列；配列番号：21を含むCDR H2配列；および配列番号：17を含むCDR H3配列を含むことができる。さらにまたはあるいは、抗体は、配列番号：15からなるCDR H1配列；配列番号：21からなるCDR H2配列；および配列番号：17からなるCDR H3配列を含むことができる。1つの実施形態において、ヒト化ACO-1は、A93V変異をさらに含む、ヒトVH1__46遺伝子に由来するVHフレームワーク残基およびヒトJH4遺伝子を含む。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、Kabat位置93でAからVの変異を持つ配列番号：3に対応するVH配列を含む。実施例中で示されるように、hzACO-1中のA93V変異は、ACO-1に同等のレベルにIFN- γ Aに結合親和性を増加させ、RG分析において測定されるようにIFN効果の阻害の力価を増加させ、pH3.5および4.5で安定性を増加させた。

40

【0075】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトIFN- γ を特異的に結合し、配列番号：3

50

のK a b a t 残基の31～35、50～65および95～102の配列に実質的に同一のV H C D R 配列を含み、V H C D R 配列のうちの1つの中に変異をさらに含み、K a b a t 残基58には変異がないh z A C O - 1 バリエーションを提供する。抗体は、例えば、配列番号：3のK a b a t 残基の31～35、50～65および95～102からなるV H C D R を含み、V H C D R 配列のうちの1つの中に変異をさらに含み、K a b a t 残基58はIである。1つの実施形態において、ヒト化A C O - 1 は、ヒトV H 1 __ 4 6 遺伝子に由来するV H フレームワーク残基およびヒトJ H 4 遺伝子を含む。実施例中で示されるように、h z A C O - 1 中のI 5 8 S 変異は、I F N - A への結合親和性を実質的に低下させ、R G 分析中に測定されたI F N 効果の阻害の力価を低下させた。

【0076】

別のタイプのフレームワーク修飾は、T細胞エпитープを除去し、それによって抗体の免疫原性の可能性を減少させるために、フレームワーク領域内の、またはさらに1つまたは複数のC D R 領域内の、1つまたは複数の残基を変異させることを含む。このアプローチは「脱免疫化」とも呼ばれ、Carr et al.によって米国特許公報番号20030153043中にさらに詳細に記載される。

F c 修飾

【0077】

さらにまたはフレームワークもしくはC D R の領域内で行われた修飾の代替として、本発明の抗体は、F c 領域内に修飾を含むように、典型的には、血清半減期、補体固定、F c 受容体結合、タンパク質安定性、および/または抗原依存的細胞性細胞傷害などの抗体の1つまたは複数の機能特性を改変するか、またはそれらを欠如するように、操作することができる。さらに、本発明の抗体は、化学的に修飾することができる（例えば、1つまたは複数の化学的モイエティを抗体に付加することができる）か、または糖鎖付加を改変するために、さらに抗体の1つまたは複数の機能特性の改変するために修飾することができる。これらの実施形態の各々は、さらに詳細に以下に記載される。F c 領域中の残基はK a b a t に従ってナンバリングされる。

【0078】

所望されるならば、抗体のクラスは公知の技術によって「スイッチ」することができる。かかる技術は、例えば、直接組換え技術（例えば米国特許4,816,397を参照）および細胞-細胞融合技術（例えば米国特許5,916,771を参照）の使用を含む。例えば、I g M 分子としてもともと産生された抗体は、I g G 抗体にクラススイッチすることができる。クラススイッチ技術も1つのI g G サブクラスを別のサブクラスに変換するために（例えばI g G 1 からI g G 2 に）使用することができる。したがって、本発明の抗体のエフェクター機能は、例えば、様々な治療使用のためにI g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体、I g G 4 抗体、I g D 抗体、I g A 抗体、I g E 抗体またはI g M 抗体にアイソタイプスイッチすることによって変化させることができる。定常領域のために例示的なc D N A 配列は、例えば、G e n B a n k（その各々はその全体を参照することによって組み入れられる）によって利用可能であり、以下のとおりである。

ヒトI g G 1 定常重鎖領域：G e n B a n k アクセッション番号：J 0 0 2 2 8 ；

ヒトI g G 2 定常重鎖領域：G e n B a n k アクセッション番号：J 0 0 2 3 0 ；

ヒトI g G 3 定常重鎖領域：G e n B a n k アクセッション番号：X 0 4 6 4 6 ；

ヒトI g G 4 定常重鎖領域：G e n B a n k アクセッション番号：K 0 1 3 1 6 ；および
ヒト 軽鎖定常領域：G e n B a n k アクセッション番号：J 0 0 2 4 1 。

【0079】

1つの実施形態において、C H 1 のヒンジ領域は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数を改変（例えば、増加または減少）するように修飾される。このアプローチはBodmer et al.による米国特許第5,677,425号中でさらに説明される。C H 1 のヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の集合を促進するかまたは抗体の安定性を増加するかもしくは低下させるために改変される。

【0080】

別の実施形態において、抗体のFcヒンジ領域は、抗体の生物学的半減期を低下させるために変異される。より具体的には、1つまたは複数のアミノ酸変異は、天然のFcヒンジドメインとブドウ球菌プロテインA (SpA) の結合と比較して、SpA結合が減少するように、Fcヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン境界領域の中へ導入される。このアプローチは、Ward et al.による米国特許第6,165,745号中でさらに詳細に記載される。別の実施形態において、抗体は生物学的半減期を増加するために修飾される。様々なアプローチが可能である。例えば、T252L、T254S、T256FとしてWardによる米国特許第6,277,375号中で記載された1つまたは複数の以下の変異を導入することができる。あるいは、生物学的半減期を増加するために、抗体は、Presta et al.による米国特許第5,869,046号および第6,121,022号中で記載されるように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから取ったサルベージ受容体結合エピートープを含有するようにCH1領域またはCL領域内で改変することができる。さらに他の実施形態において、Fc領域は、抗体の複数のエフェクター機能を改変するように、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することによって改変される。例えば、アミノ酸残基の234、235、236、237、297、318、320および322から選択された1つまたは複数のアミノ酸は、異なるアミノ酸残基を持つ抗体がエフェクターリガンドについて改変された親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、置換することができる。親和性が改変されたエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分でありえる。このアプローチは、どちらもWinter et al.による米国特許第5,624,821号および第5,648,260号中でさらに詳細に記載される。別の実施例において、アミノ酸残基329、331および322から選択された1つまたは複数のアミノ酸は、異なるアミノ酸残基を持つ抗体が改変されたC1q結合を有するようにおよび/または補体依存性細胞傷害(CDC)を減少または消失させるように置換することができる。このアプローチは、Idusogie et al.による米国特許第6,194,551号中でさらに詳細に記載される。別の実施例において、アミノ酸位置231および239内の1つまたは複数のアミノ酸残基が改変され、その結果として抗体が補体を固定する能力を改変する。このアプローチはBodmer et al.によるPCT公報WO94/29351中でさらに説明される。さらに別の実施例において、Fc領域は、238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438または439の位置で、1つまたは複数のアミノ酸を修飾することによって、抗体が抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を仲介する能力を増加するように、および/またはFcγ受容体に対する抗体の親和性を増加するように、修飾される。このアプローチはPrestaによるPCT公報WO00/42072中でさらに説明される。さらに、FcγRI、FcγRII、FcγRIIIおよびFcRnに対するヒトIgG1上の結合部位はマッピングされ、改善された結合を持つバリエーションが記載されている(Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照)。位置256、290、298、333、334および339での特異的変異は、FcRIIIに対する結合を改善することが示された。さらに、T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224AおよびS298A/E333A/K334Aの組み合わせの変異体はFcγRIII結合を改善することが示された。

【0081】

定常領域は、抗体を安定化させるように、例えば、二価抗体が2個の一価VH-VL断片へと分かれるリスクを減少させるように、さらに修飾することができる。例えば、IgG4定常領域において、ヒンジでの完全なジスルフィド架橋形成を可能にするように、残

10

20

30

40

50

基 S 2 4 1 はプロリン (P) 残基に変異させることができる (例えば、Angal et al., Mol Immunol. 1993;30:105-8を参照)。

糖鎖付加修飾

【 0 0 8 2 】

さらに別の実施形態において、抗体の糖鎖付加は修飾される。例えば、糖鎖付加されない抗体を作製することができる (すなわち糖鎖付加が欠如した抗体)。糖鎖付加は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加するように改変することができる。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の糖鎖付加の 1 つまたは複数の部位の改変によって遂行することができる。

抗原結合断片

【 0 0 8 3 】

本発明の抗 I F N - 抗体は、全長抗体またはその抗原結合断片として調製することができる。抗原結合断片の実例は、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b) 2 断片、F (a b ') 2 断片、F (a b) 3 断片、F v 断片 (典型的には抗体の単腕の V L ドメインおよび V H ドメイン)、一本鎖 F v 断片 (s c F v ; 例えば、Bird et al., Science 1988;242:423-426;およびHuston et al. PNAS 1988;85:5879-5883を参照)、d s F v、F d (典型的には V H ドメインおよび C H 1 ドメイン)、および d A b 断片 (典型的には V H ドメイン) ; V H ドメイン、V L ドメイン、V h H ドメインおよび V - N A R ドメイン ; 単一の V H 鎖および単一の V L 鎖を含む一価分子 ; ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディおよび ボディ (例えば、Ill et al., Protein Eng 1997;10:949-57を参照) ; ラクダ I g G ; I g N A R ; これらに加えて単離 C D R または抗原結合残基もしくは抗原結合ポリペプチドが、機能的抗体断片を形成するようにともに結合または連結される 1 つまたは複数の単離 C D R または機能的パラトープを含む。様々なタイプの抗体断片は、例えば、Holliger and Hudson, Nat Biotechnol 2005;23:1126-1136 ; W O 2 0 0 5 0 4 0 2 1 9、ならびに公開済み米国特許出願 2 0 0 5 0 2 3 8 6 4 6 および 2 0 0 2 0 1 6 1 2 0 1 中で記載または概説された。

【 0 0 8 4 】

抗体断片は従来の組換え技術またはタンパク質工学技術を使用して得ることができ、断片はインタクトな抗体と同じ方式で抗原結合機能または他の機能についてスクリーニングすることができる。

【 0 0 8 5 】

様々な技術は抗体断片の産生のために開発されている。従来、これらの断片は全長抗体のタンパク分解によって得られた (例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992) ; およびBrennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照)。しかしながら、今やこれらの断片は組換え宿主細胞によって直接生産することができる。あるいは、F a b ' - S H 断片を大腸菌 (E . c o l i) から直接回収し、F (a b ') 2 断片を形成するために化学的にカップリングすることができる (Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992))。別のアプローチによれば、F (a b ') 2 断片は組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。他の実施形態において、選択した抗体は一本鎖 F v 断片 (s c F v) である。W O 1 9 9 3 / 1 6 1 8 5 ; 米国特許第 5 , 5 7 1 , 8 9 4 号 ; および米国特許第 5 , 5 8 7 , 4 5 8 号を参照。例えば、抗体断片は、例えば米国特許第 5 , 6 4 1 , 8 7 0 号中で記載されるような「直鎖状抗体」でもありえる。かかる直鎖状抗体断片は単一特異性または二重特異性でありえる。

多重特異性分子

【 0 0 8 6 】

別の態様において、本発明は、本発明の抗 I F N - 抗体またはその抗原断片を含む多重特異性分子を特色とする。かかる多重特異性分子は、I F N - に対する少なくとも 1 つの第 1 の結合特異性および第 2 の標的エピトープに対する第 2 の結合特異性を含む二重特異性分子を含む。

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

50

1つのタイプの二重特異性分子は二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。二重特異性抗体を調製する方法は、当技術分野において公知であり、全長の二重特異性抗体の従来の産生は、2鎖が異なる特異性を有する2個の免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖ペアの共発現に通常は基づく (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983))。二重特異性抗体は、全長抗体もしくは抗体断片 (例えば F (a b ') 2 二重特異性抗体) または本明細書において記載される他の抗原結合断片として調製することができる。

【 0 0 8 8 】

他の多重特異性分子は、I F N - 結合抗体モイエティを1つまたは複数の他の非抗体タンパクへ融合することから産生されたものを含む。かかる多重特異性タンパク質およびそれらの構築法は当技術分野において記載されている。例えば、Dreier et al. (Bioconjug. Chem. 9(4): 482-489 (1998)) ; 米国特許第 6 , 0 4 6 , 3 1 0 号 ; 米国特許公開番号第 2 0 0 3 0 1 0 3 9 8 4 号 ; ヨーロッパ特許出願第 1 4 1 3 3 1 6 号 ; 米国特許公報番号第 2 0 0 4 0 0 3 8 3 3 9 号 ; von Strandmann et al., Blood (2006;107:1955-1962)、および WO 2 0 0 4 0 5 6 8 7 3 を参照。

【 0 0 8 9 】

2以上の価数を持つ多重特異性分子も意図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al., J. Immunol, 147:60 (1991)。

【 0 0 9 0 】

本発明の多重特異性分子は当技術分野において公知の方法を使用して、成分結合特異性をコンジュゲートすることによって調製することができる。例えば、多重特異性分子の結合特異性は各々個別に生成され、次いで互いへコンジュゲートすることができる。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、様々なカップリングまたは架橋剤を共有結合性コンジュゲーションのために使用することができる。架橋剤の実例は、プロテイン A、カルボジイミド、N - スクシンイミジル - S - アセチル - チオ酢酸 (S A T A)、5 , 5 ' - ジチオビス (2 - ニトロ安息香酸) (D T N B)、o - フェニレンジマレイミド (o P D M)、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P)、およびスルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - S M C C) を含む (例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648 を参照)。他の方法は、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83、およびGlennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 23 67-2375中で記載されたものを含む。好ましいコンジュゲート剤は S A T A およびスルホ - S M C C であり、両方ともピアース・ケミカル (P i e r c e C h e m i c a l) 社 (ロックフォード、イリノイ) から利用可能である。

【 0 0 9 1 】

結合特異性が抗体である場合、それらは、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルチドリル (s u l t h y d r y l) 結合によってコンジュゲートすることができる。特に好ましい実施形態において、ヒンジ領域は、コンジュゲーションの前に奇数のスルフヒドリル残基 (好ましくは1つ) を含有するように修飾される。

【 0 0 9 2 】

あるいは、両方の結合特異性を同じベクター中にコードし、同じ宿主細胞中で発現させ、集合させることができる。二重特異性分子が、モノクローナル抗体 x モノクローナル抗体、モノクローナル抗体 x F a b、F a b x F (a b ') 2、またはリガンド x F a b 融合タンパク質である場合、この方法は特に有用である。本発明の二重特異性分子は、1つの一本鎖抗体および結合決定基を含む一本鎖分子、または2つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子でありえる。二重特異性分子は少なくとも2つの一本鎖分子を含むことができる。二重特異性分子を調製する方法は、例えば、米国特許第 5 , 2 6 0 , 2 0 3 号 ; 米国特許第 5 , 4 5 5 , 0 3 0 号 ; 米国特許第 4 , 8 8 1 , 1 7 5 号 ; 米国特許第 5 , 1 3 2 , 4 0 5 号 ; 米国特許第 5 , 0 9 1 , 5 1 3 号 ; 米国特許第 5 , 4 7 6 , 7 8 6 号 ;

米国特許第 5, 0 1 3, 6 5 3 号; 米国特許第 5, 2 5 8, 4 9 8 号; 米国特許第 5, 4 8 2, 8 5 8 号; 米国特許出願公報第 2 0 0 3 0 0 7 8 3 8 5 号、Kontermann et al., (2005) Acta Pharmacological Sinica 26(1):1-9; Kostelny et al., (1992) J. Immunol. 148(5):1547-1553; Hollinger et al., (1993) PNAS (USA) 90:6444-6448; および Gruber et al. (1994) J. Immunol. 152: 5368。中で記載または概説される。

抗体誘導体

【0093】

本発明の範囲内の抗体誘導体（または免疫コンジュゲート）は、第 2 の薬剤にコンジュゲートまたは共有結合された抗 I F N - 抗体を含む。

【0094】

例えば、1つの態様において、本発明は、細胞傷害剤にコンジュゲートまたは共有結合された抗体を含む免疫コンジュゲートを提供し、当該細胞傷害剤は、治療用放射性同位体、毒性タンパク質、薬物などの毒性低分子、毒素、免疫修飾物質、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、酵素阻害剤、治療用放射性核種、血管新生阻害剤、化学療法薬、ピンカアルカロイド、アントラサイクリン、エピドフィロトキシン、タキサン、抗代謝物質、アルキル化剤、抗生物質、COX-2 阻害剤、SN-38、抗有糸分裂物質、抗血管新生剤およびアポトーシス剤、特にドキソルビシン、メトトレキサート、タキソール、CPT-11、カンプトテカン、ナイトロジェンマスタード、ゲムシタピン、アルキルスルホナート、ニトロソウレア、トリアゼン、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、プラチナ配位錯体、緑膿菌外毒素、リシン、アブリン、5-フルオロウリジン、リボヌクレアーゼ (RNase)、DNase I、ブドウ球菌腸毒素 A、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素および緑膿菌内毒素ならびに他のものから選択することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第 19 版（マック出版社 (MacK Publishing Co.)、1995）; Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (マグローヒル (McGraw Hill) 社、2001 年); Pastan et al. (1986) Cell 47:641; Goldenberg (1994) Cancer Journal for Clinicians 44:43; 米国特許第 6, 0 7 7, 4 9 9 号を参照; その開示全体は参照することにより本明細書に組み入れられる)。毒素は、動物起源、植物起源、真菌起源もしくは微生物起源でありえるか、または化学合成によってデノボに作成できることが認識される。

【0095】

別の実施形態において、抗体は、治療用放射性核種または検出目的に適切な放射性核種などの放射性同位体で誘導体化される。多数の適切な放射性同位体のいずれかは、I-131、インジウム-111、ルテチウム-171、ビスマス-212、ビスマス-213、アスタチン-211、銅-62、銅-64、銅-67、イットリウム-90、ヨウ素-125、ヨウ素-131、リン-32、リン-33、スカンジウム-47、銀-111、ガリウム-67、プラセオジウム-142、サマリウム-153、テルビウム-161、ジスプロシウム-166、ホルミウム-166、レニウム-186、レニウム-188、レニウム-189、鉛-212、ラジウム-223、アクチニウム-225、鉄-59、セレン-75、ヒ素-77、ストロンチウム-89、モリブデン-99、ロジウム-105、パラジウム-109、プラセオジウム-143、プロメチウム-149、エルビウム-169、イリディウム-194、金-198、金-199 および鉛-211を含むが、これらに限定されずに使用することができる。一般に、放射性核種は、好ましくはオージェ放射体については 20 乃至 6,000 keV の範囲、好ましくは 60 乃至 200 keV の範囲、放射体については 100 ~ 2,500 keV、および放射体については 4,000 ~ 6,000 keV の崩壊エネルギーを有する。さらに、粒子を生成して実質的に崩壊する放射性核種が好ましい。

【0096】

本発明の抗体コンジュゲートは既定の生物学的応答を修飾するために使用することができ、薬物モイエティは古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されるべきでない。例え

10

20

30

40

50

ば、薬物モイエティは所望の生物学的活性を保持するタンパク質またはポリペプチドでありえる。かかるタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素もしくはジフテリア毒素などの酵素的に活性な毒素もしくはその活性断片；腫瘍壊死因子もしくはインターフェロン- γ などのタンパク質；または、例えば、リンホカイン、インターロイキン1（「IL-1」）、インターロイキン2（「IL-2」）、インターロイキン6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）もしくは他の増殖因子などの生物応答修飾因子を含むことができる。

【0097】

第2の薬剤は、非常に多数の利用可能な方法のいずれかを使用して、抗体に対して直接または間接的に連結することができる。例えば、薬剤は、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロプリオネートなどの架橋剤を使用するジスルフィド結合形成を介して還元された抗体成分のヒンジ領域で、または抗体のFc領域中の炭水化物モイエティを介して付加することができる（例えば、Yu et al. (1994) *Int. J. Cancer* 56: 244; Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking* (CRC出版 (CRC Press) 社1991); *Monoclonal antibodies: principles and applications*, Birch et al. (編) 中のUpeslacis et al., 「Modification of Antibodies by Chemical Methods」、187~230ページ (ワイリー-リス社 (Wiley-Liss Inc.) 1995); *Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application*, Ritter et al. (編) 中のPrice, 「Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」、60~84ページ (ケンブリッジ大学出版 (Cambridge University Press) 社1995)、Cattel et al. (1989) *Chemistry today* 7:51-58, Delprino et al. (1993) *J. Pharm. Sci* 82:699-704; Arpicco et al. (1997) *Bioconjugate Chemistry* 8:3; Reisfeld et al. (1989) *Antibody, Immunicon. Radiopharm.* 2:217を参照；その各々の開示全体は参照することにより本明細書に組み入れられる）。例えば、*Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* Reisfeld et al. (編) 中のArnon et al., 「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、243~56ページ (アランR.リス社 (Alan R. Liss, Inc.) 1985; *Controlled Drug Delivery* (第2版)、Robinson et al. (編) 中のHellstrom et al., 「Antibodies For Drug Delivery」、623~53ページ (マルセルデッカー社 (Marcel Dekker, Inc.) 1987); *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (編) 中のThorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、475~506ページ (1985); *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (編) 中の「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、303~16ページ (アカデミックプレス (Academic Press) 社1985)、およびThorpe et al., 「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、*Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)も参照。

【0098】

細胞毒素のタイプ、リンカー、および抗体への治療剤のコンジュゲート法のさらなる考察については、Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264も参照。

【0099】

他の実施形態では、第2の薬剤は検出可能なモイエティであり、定量的にまたは定性的に観察または測定できる任意の分子でありえる。本発明のコンジュゲートされた抗体において有用な検出可能なマーカーの実例は、放射性同位体、蛍光色素、または抗原/抗体（

IFN- に対する抗体以外)、レクチン/炭水化物;アビジン/ビオチン;受容体/リガンド;もしくは分子インプリントポリマー/プリント分子システムのうちの任意の1つのメンバーのような相補的結合ペアのメンバーである。

【0100】

第2の薬剤は、さらにまたはあるいは、ポリマーでありえ、例えば抗体の血中循環半減期を増加するように意図される。例示的なポリマーおよびペプチドへのかかるポリマーを付加する方法は、例えば、米国特許第4,766,106号;第4,179,337号;第4,495,285号;および第4,609,546号中で示される。追加の例示的なポリマーは、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリエチレングリコール(PEG)モイエティを含む。本明細書において使用される時、用語「ポリエチレングリコール」は、他のタンパク質を誘導体化するために使用されるPEGの任意の形態(モノ(C1-C10)アルコキシ-ポリエチレングリコールもしくはアリアルコキシ-ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドなど)を包含することを意図する。例えば、全長抗体または抗体断片を、約1,000乃至約40,000の間(約2000乃至約20,000の間、例えば約3,000~12,000など)の分子量を持つ1つまたは複数のPEG分子にコンジュゲートすることができる。抗体またはその断片をPEG付加するために、典型的には、1つまたは複数のPEG基が抗体または抗体断片に対して付加されるようになる条件下で、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール(PEG)と抗体または断片を反応させる。好ましくは、PEG付加は、反応性PEG分子(または類似した反応性水溶性高分子)によるアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。特定の実施形態において、PEG付加された抗体は糖鎖付加されない抗体である。タンパク質をPEG付加する方法は、当技術分野において公知であり、本発明の抗体に適用することができる。例えば、Nishimura et al.によるEP 0 154 316およびIshikawa et al.によるEP 0 401 384を参照する。

抗体の特性評価

【0101】

産生もしくは精製の後に、またはスクリーニング手順または選択手順の一部として、本発明の抗IFN- 抗体の機能特性を調べることができる。

【0102】

以下は抗体の特性評価のための例示的な分析の簡潔な説明である。いくつかは他のセクション中でさらに記載され、および/または実施例中で記載される。

結合分析

【0103】

本発明は、IFN- を結合する抗体ならびに抗原結合断片およびその免疫コンジュゲートを提供する。IFN- への抗体の結合を評価するために任意の様々な分析を使用することができる。ELISA、放射免疫分析、ウエスタンブロッティング、ピアコアおよび競合分析に基づいたプロトコールは、とりわけ使用に適切であり、当技術分野において周知である。

【0104】

例えば、単純な結合分析を使用することができ、その分析において、標的タンパク質または標的エピトープ(例えば、A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b、WA、1およびDから選択されたIFN- タンパク質サブタイプ、その部分、またはその任意の組み合わせ)の存在下で、試験抗体をインキュベーションし、未結合抗体を洗浄し、結合抗体の存在を、例えばRIAおよびELISAなどを使用して評価する。かかる方法は当業者に周知である。対照の非特異的抗体で見られる量を上回る任意の結合量は、抗体が標的に特異的に結合することを示す。

【0105】

かかる分析において、試験抗体がヒトIFN- に結合する能力は、(陰性)対照タンパク質(例えば、構造的に無関係な抗原に対して作製された抗体、または非Igペプチド

10

20

30

40

50

もしくはタンパク質)が、同じ標的に結合する能力と比較することができる。任意の適切な分析を使用して、対照タンパク質に比べて、25%、50%、100%、200%、1000%、またはそれ以上増加した親和能力を持つ、IFN- γ に結合する抗体または断片は、標的に「特異的に結合する」、または標的と「特異的に相互作用する」と考えられ、以下で記載される治療方法における使用に好ましい。試験抗体が、IFN- γ に対する(陽性)対照抗体(例えばヒト化ACO-1抗体またはヒト化ACO-2抗体)の結合を影響する能力も評価することができる。

【0106】

1つの態様において、本発明は、ヒト化ACO-1抗体またはヒト化ACO-2抗体と、生物学の特徴および/または実質的なVH配列および/またはVL配列を共有する、ヒト化された抗IFN- γ 抗体を提供する。1つの例示的な生物学の特徴は、ACO-1エピトープまたはACO-2エピトープ(すなわち、ACO-1抗体およびACO-2抗体が結合する特定のIFN- γ タンパク質サブタイプの細胞外ドメイン中のそれぞれの領域)への結合である。ACO-1エピトープまたはACO-2エピトープに結合する抗体についてスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)、Ed Harlow and David Lane(1988)中で記載されたものなどのルーチンの交差ブロック分析を行なうことができる。

【0107】

例示的な交差ブロック分析または競合分析において、ACO-1またはACO-2の(対照)抗体、および試験抗体を混合(またはあらかじめ吸着)し、IFN- γ を含有するサンプルに適用する。特定の実施形態において、IFN- γ 含有サンプルに適用する前の期間に、対照抗体を様々な量の試験抗体(例えば1:10または1:100)とあらかじめ混合する。他の実施形態において、対照抗体および様々な量の試験抗体を、抗原/標的サンプルへの曝露の間に単純に混合することができる。結合した抗体から遊離抗体を区別することができる限り(例えば未結合抗体を除去するために分離技術または洗浄技術を使用することによって)、および試験抗体から対照抗体を区別することができる限り(例えば、種特異的二次抗体もしくはアイソタイプ特異的二次抗体の使用によって、検出可能な標識で対照抗体を特異的に標識することによって、または異なる化合物間を区別する質量分析などの物理的方法の使用によって)、試験抗体が抗原に対する対照抗体の結合を減少させ、試験抗体が対照抗体と実質的に同じエピトープを認識することを示すかどうかを決定することができる。この分析において、完全に無関係な抗体の存在下における(標識)対照抗体の結合は、対照の高値である。対照の低値は、未標識対照抗体と共に標識(陽性)対照抗体をインキュベーションし、競合させて標識抗体の結合を減少させることによって得られる。

【0108】

試験分析において、試験抗体の存在下における標識抗体反応性の有意な減少は、同じエピトープを認識する試験抗体(すなわち標識対照抗体と「交差反応する」抗体)を表す。抗原/標的に対する標識対照の結合を、約1:10乃至約1:100の間の対照:試験の抗体または化合物の任意の比で、少なくとも50%、またはより好ましくは70%まで減少させる任意の試験抗体または化合物は、対照と実質的に同じエピトープまたは決定基に対して結合する抗体または化合物であると見なされる。好ましくは、かかる試験抗体または化合物は、抗原/標的に対する対照の結合を少なくとも90%まで減少させる。しかしながら、対照抗体または化合物の結合を測定可能な程度まで減少させる任意の化合物または抗体を、本発明において使用することができる。

生物学の活性

【0109】

単球の分化。活性化されたTリンパ球およびBリンパ球の生成は、抗原提示細胞(「APC」)の動員および成熟を必要とする。これらのAPCはB細胞、単球/マクロファージおよび樹状細胞を含む。SLE患者の血清は、DCを活性化することができるIFN- γ

10

20

30

40

50

を含有し、活性化された活性は、本発明に従うヒト化抗体調製物によりブロックすることができる。この活性を検出および定量する方法は科学文献および特許文献中に記載される（例えば特許公報第US 2 0 0 4 0 0 6 7 2 3 2 A 1号のパラグラフ0 1 3 6乃至0 1 5 0を参照、その関係する部分は参照することにより本明細書に組み入れられる）。

【0 1 1 0】

M x Aプロモーターの活性化。IFN- γ がM x Aプロモーターを活性化する能力、およびこの活性化をブロックする本発明の抗IFN- γ モノクローナル抗体の能力は、レポーター遺伝子(RG)分析(M x Aプロモーターはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)またはルシフェラーゼ(luc)などのレポーター遺伝子、好ましくはルシフェラーゼに融合されている)を使用して、測定することができる。CATおよびルシフェラーゼのための分析は当業者に公知である。好ましくは、M x Aプロモーターの活性は、M x Aプロモーター/レポーター遺伝子融合コンストラクトにより安定的に形質転換されたA 5 4 9細胞において測定される。A 5 4 9細胞は、ATCC(製品番号C C 1 - 1 8 5)を介して入手可能な肺癌細胞株である。M x A(別名M x 1)プロモーターはヒト、マウスまたはラットでありえる。ヒトM x Aプロモーターの配列および構造は、Genbankアクセッション番号X 5 5 6 3 9、Chang et al. (1991) Arch Virol. 117:1-15;およびRonni et al. (1998) J Interferon Cytokine Res. 18:773-781中で開示される。ヒトM x Aプロモーター/ルシフェラーゼ融合コンストラクトおよびルシフェラーゼ分析は、特許公報US 2 0 0 4 0 2 0 9 8 0 0およびRosmorduc et al. (1999) J of Gen Virol 80:1253-1262中で開示される。ヒトM x Aプロモーター/CAT融合コンストラクトおよびCATアッセイは、Fernandez et al. (2003) J Gen Virol 84:2073-2082 and Fray et al. (2001) J Immunol Methods 249:235-244中で開示される。マウスM x A(M x 1)プロモーターはGenbankアクセッション番号M 2 1 1 0 4; Hug et al. (1988) Mol Cell Biol 8:3065-3079;およびLleonart et al. (1990) Biotechnology 8:1263-1267中で開示される。マウスM x Aプロモーター/ルシフェラーゼ融合コンストラクトおよびルシフェラーゼ分析は、Canosi et al. (1996) J Immunol Methods 199:69-67中で開示される。

【0 1 1 1】

細胞変性効果阻害(CPE)分析。CPE分析はインターフェロンの抗ウイルス活性に基づく。一般に、適切な細胞株をインターフェロンの存在下においてウイルスに感染させ、インターフェロンの阻害活性をウイルス増殖プロセスまたは複製プロセスで定量する。分析の計測値は、ウイルス収率の減少、ウイルスの細胞変性効果の減少、RNA合成のウイルスタンパク質の減少、ウイルスプラーク形成の減少に基づく。細胞変性の分析は、インターフェロンの活性に対する抗体の中和効果を決定するために使用することができる。例示的なCPE分析は、Clemens, M.J., Morris, A.G., Gearing, A.J.H.(編)、Lymphokines and interferons: A Practical Approach中のMeager, A. 1987、Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization、IRL出版(IRL Press)社、オックスフォード、1 2 9ページおよびBilliau, A.(編) Interferon、1巻: General and Applied Aspects中のGrossberg and Sedmak、1984、Assays of interferons、エルゼビア(Elsevier)社、アムステルダム、1 8 9ページ、ならびにPCT公開WO 2 0 0 6 0 8 6 5 8 6の実施例6、パラグラフ1 5 7 ~ 1 6 4および図1中で記載される。

医薬用製剤

【0 1 1 2】

本発明の別の目的は、1 0 ~ 5 0 0 mg/ml(例えば2 0 ~ 3 0 0 mg/ml、好ましくは3 0 ~ 1 0 0 mg/ml、および最も好ましくは5 0 ~ 1 0 0 mg/mlなど)の濃度で存在する[タンパク質]化合物を含み、2 . 0乃至1 0 . 0のpHを有する医薬用製剤を提供することである。製剤は、バッファースystem、防腐剤(複数可)、等張化剤(複数可)、キレート剤(複数可)、安定剤および界面活性剤をさらに含むことができる。本発明の1つの実施形態において、医薬用製剤は、水性製剤(すなわち水を含む製剤)

である。かかる製剤は典型的には溶液または懸濁物である。本発明のさらなる実施形態において、医薬用製剤は水性溶液である。用語「水性製剤」は、少なくとも50% w/wの水を含む製剤として定義される。同様に、用語「水性溶液」は、少なくとも50% w/wの水を含む溶液として定義され、用語「水性懸濁物」は、少なくとも50% w/wの水を含む懸濁物として定義される。

【0113】

別の実施形態において、医薬用製剤は凍結乾燥した製剤であり、医師または患者は、使用の前に溶媒および/または希釈剤をそれへ加える。

【0114】

別の実施形態において、医薬用製剤は、事前の溶解を伴わない使用のための準備済みの乾燥した製剤（例えば、凍結乾燥または噴霧乾燥された）である。

診断適用

【0115】

本発明のIFN-抗体は非治療適用も有する。例えば、抗IFN-抗体は、IFN-タンパク質についての診断分析（例えば、特定の細胞、組織または血清中のIFN-タンパク質の発現を検出する）においても有用でありえる。例えば、抗IFN-処置のために患者を選択する分析において抗IFN-抗体を使用することができる。かかる目的のために、血清または組織標本中のIFN-の存在の分析に抗IFN-抗体を使用することができる。診断適用のために、抗体は典型的には検出可能なモイエティにより標識される。

治療適用

【0116】

本明細書において記載されるようなヒト化抗IFN-抗体を使用して、患者を処置する方法も本発明によって提供される。1つの実施形態において、本発明は、ヒト患者への投与のための医薬組成物の調製物中での本明細書において記載されるようなヒト化抗体の使用を提供する。典型的には、患者は、サブタイプのA、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4bおよびWAからなる群から選択された少なくとも1つのIFN-サブタイプの異常な発現と関連する自己免疫性または炎症性の疾患または障害を患うか、またはそれらに罹患するリスクがある。

【0117】

本発明の抗体により処置される例示的な症状または障害は、狼瘡（例えば全身性エリテマトーデス（SLE））、関節リウマチ、若年性慢性関節炎、骨関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症（硬皮症）、特発性炎症性筋疾患（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、脈管炎、全身性血管炎、サーコイドーシス、自己免疫溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）、自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫介在性血小板減少症）、甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、糖尿病、免疫介在性腎臓疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢神経系および末梢神経系の脱髄症（多発性硬化症、特発性脱髄性多発ニューロパシーまたはギランバレー症候群、および慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーなど）、伝染性肝炎などの肝胆道系疾患（A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、E型肝炎および他の非肝指向性ウイルス）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎および硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）、セリアック病、グルテン過敏性腸疾患およびウィッブル病、自己免疫性皮膚病または免疫介在性皮膚病（水疱性の皮膚病、多形性紅斑および接触性皮膚炎を含む）、乾癬、アレルギー性疾患（喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症および蕁麻疹など）、肺の免疫疾患（好酸球性肺炎、特発性肺線維症および過敏性肺炎など）、ならびに移植関連疾患（移植拒絶および移植片対宿主病を含む）を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態において、疾患、症状または障害は、狼瘡、シェーグレン症候群、乾癬、糖尿病、関節リウマチおよび若年性皮膚筋炎から選択される。別の特定の実施形態において、疾患、症状または障害はSLEである。例えば、1つの態様において、抗IFN-抗体は

、鎮痛剤、免疫抑制物質、コルチコステロイド、抗TNF薬剤または他の抗サイトカイン剤もしくは抗サイトカイン受容体剤を含むが、これらに限定されない1つまたは複数の他の抗炎症剤ならびに抗血管新生剤と組み合わせて使用される。特定の実施例は、メトトレキサート、TS G - 6、リツキサン（登録商標）およびCTLA 4 - Fc融合タンパク質を含む。組合せ療法のさらなる事例は以下で提供される。

製造品

【0118】

本発明の別の実施形態において、上記の障害の処置のために有用な材料を含有する製造品が提供される。例えば、製造品は、ヒトにおける自己免疫性または炎症性の疾患または障害などの障害を効果のある量の抗体で処置するように使用者を導く説明書と共に、本明細書において記載されるようなヒト化抗IFN - 抗体を含有する容器を含むことができる。製造品は、典型的には、容器、および容器上のまたは容器に付けられたラベルまたはパッケージ挿入物を含む。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどを含んでいる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されうる。容器は、症状の処置のために効果的な組成物を保持し、滅菌済み接近ポート（例えば、容器は皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静注溶液バッグまたはバイアルでありえる）を有することができる。組成物中の少なくとも1つの活性薬剤は、本明細書のヒト化抗IFN - 抗体、またはかかる抗体を含む抗原結合断片もしくは抗体誘導体（例えば免疫コンジュゲート）である。ラベルまたはパッケージ挿入物は、例えばSLEなどの選択した症状の処置のために組成物が使用されることを示す。

【0119】

さらに、製造品は、（a）本明細書のヒト抗体またはヒト化抗体を含み、容器中に含有される組成物を持つ第1の容器と、（b）ヒト抗体またはヒト化抗体以外の治療剤を含み、容器中に含有される組成物を持つ第2の容器とを含むことができる。本発明のこの実施形態における製造品は、自己免疫性または炎症性の疾患または障害を処置するために第1の組成物および第2の組成物を併用して使用できることを示すパッケージ挿入物をさらに含むことができる。かかる治療剤は、前のセクション中で記載される任意の補助治療法でありえる。あるいはまたはさらに、製造品は、静菌注射用水（BWFI）、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液およびデキストロス溶液などの薬学的に許容されるバッファーを含む第2の（または第3の）容器をさらに含むことができる。製造品は、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針およびシリンジを含む、商業的見地および使用者の見地から望ましい他の材料をさらに含むことができる。

【0120】

第1の態様において、したがって、本発明は、ヒトインターフェロン - （IFN - ）を特異的に結合するヒト化抗体またはその抗原結合断片であって、ヒト化抗体がKabattに従うマウス相補性決定領域（CDR）よりも少ないドナーアミノ酸残基を含むマウス抗体のACO - 1もしくはACO - 2またはその組み合わせのヒト化バージョンである、ヒト化抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0121】

第2の態様において、したがって、本発明は、IFN - を特異的に結合するヒト化抗体またはその抗原結合断片であって、該抗体がIFN - サブタイプのA、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4bおよびWAを結合することが可能であるが、サブタイプの1またはDを結合することが可能ではなく、該抗体がKabattに従う非ヒトCDRよりも少ないドナーアミノ酸残基を含む、ヒト化抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0122】

1つの実施形態によれば、CDR H2ドナー残基はKabatt残基50～59を含む。別の実施形態において、該抗体は、IFN - サブタイプ上でACO - 1抗体および/またはACO - 2抗体と同じエピトープを競合および/または同じエピトープに結合する。好ましい実施形態によれば、抗体はIgG4サブタイプである。

好ましい実施形態において、抗体は配列番号： 2 1 に従う C D R H 2 配列を含む。

【 0 1 2 4 】

第3の態様において、本発明は本発明に従って抗体を生産する方法であって、適切な条件下で該抗体をコードする宿主細胞をインキュベーションすることおよび続いて該抗体を単離することを含む方法に関する。本発明は、かかる方法によって、得られる抗体または得ることが可能な抗体にさらに関する。

【 0 1 2 5 】

第3の態様において、本発明は、本発明に従う抗体を含む組成物に関する。本発明は、本発明に従う組成物の調製物のためのプロセスであって、該方法が抗体またはその断片を賦形剤と混合することを含むプロセスにさらに関する。本発明は、かかる方法によって、得られる組成物または得ることが可能な組成物にさらに関する。

【 0 1 2 6 】

第 5 の態様において、本発明は、IFN- γ に関連する IFN inflammatory 疾患 (IFN inflammatory disease) または障害を防止、管理、処置、または寛解する方法であって、それを必要とする被験者に予防的または治療的に効果のある量の本発明に従う抗体を投与することを含む方法に関する。

【 0 1 2 7 】

最後に、本発明は、炎症性疾患の処置のために適切な医薬品の調製のための本発明に従う抗体の使用に関する。

【实施例】

【 0 1 2 8 】

本発明のさらなる詳細は、以下の非限定的実施例によって示される。

実施例 1 - マウス ACO - 1 抗体およびマウス ACO - 2 抗体の配列決定

【 0 1 2 9 】

この実施例は、W O 2 0 0 6 0 0 8 6 5 8 6 中で記載される、マウス抗体 A C O - 1 および A C O - 2 の配列決定および組換え発現に加えて、A C O - 2 の V H 配列および V L 配列の B L A S T 検索を記載する。

抗体クローニングおよび配列決定

【 0 1 3 0 】

キアゲン (Q i a g e n) 社からの R N e a s y (# 6 3 4 9 1 4) を使用して、ハイブリドーマ (A C O - 1 . 5 . 2 および A C O - 2 . 2 . 1) から全 R N A を抽出した。クロンテック (C l o n e t e c h) 社からの S M A R T - R A C E c D N A 増幅キットを使用して 1 μ g の全 R N A から c D N A を合成した。反応を 4 2 で 1 . 5 時間実行し、7 5 μ l のトリシン - E D T A 中でサンプルを希釈した。鋳型として 5 μ l の c D N A を使用して 5 0 μ l の反応中で標的の P C R 増幅を実行した。重鎖および軽鎖の両方のためのフォワードプライマーは、S M A R T R A C E キット中に含まれるユニバーサルプライマー混合物 (U P M) であった。A C O - 1 重鎖 (H C) のためのリバースプライマー配列は以下のようにデザインされた。

5' - CTGGGCCAGGTGCTGGAGG (配列番号：11) および、ACO-1
軽鎖 (LC) のためのものは

5' - C T A A C A C T C A T T C C T G T T G A A G C T C (配列番号: 12)。

A C O - 2 重鎖 (H C) のためのリバースプライマー配列は以下のようにデザインされた

5' - C T A G C T A G C T C A T T T A C C C G G A G A C C G G G A G A T G G (配列番号: 26) および、ACO-2 軽鎖 (LC) のためのものは、5' - G C T C T A A C A C T C A T T C C T G T T G A A G C T C T T G (配列番号: 27)。

【 0 1 3 1 】

クロンテック社からのアドバンテージHF PCRキットを使用してPCR反応を実行し、PCRプログラムは、94 / 2分の1回の変性工程、続いて94 / 30秒：55

／ 30 秒； 72 / 1.5 分の 24 サイクルで実行した。最終伸長工程は 72 / 10 分であった。エチジウムブロマイドを含有する 1 % のアガロースゲルで PCR 産物を同定した。GE ヘルスケア (GE Healthcare) 社からの GFX 精製キットを使用して PCR 産物をゲルから精製し、続いてゼロ・ブラント TOPO PCR クローニングキット (#K2875-40) へとクローニングし、インビトロゲン (Invitrogen) 社からの TOP10 大腸菌細胞の中に形質転換した。

【0132】

キアゲン社からのミニプレップ・キット (#27106) を使用して大腸菌コロニーから DNA を抽出した。プラスミドは、配列決定用プライマーの M13 rev (-29) および M13 uni (-21) を使用して、MWG バイオテック (MWG Biotech) 社、マルティンスリート、ドイツで配列決定した。ベクター NTI の使用によって、同定された配列から HC および LC を確認した。キットに基づくすべての手順は、製造業者の指示に従って行なわれた。

【0133】

ACO-1.5.2 ハイブリドーマ細胞から、以下の核酸およびアミノ酸配列を有する、単一の LC および単一の IGg2a HC をクローン化した。

【0134】

ACO-1 VH 配列 (配列番号: 13 (シグナルペプチドを含む)):

```

a t g g g a t g g a g c t a t a t c a t g c t c t t t t t g g t a g c a a c a g
c t a c a g a t g t c c a c t c c c a g g t c c a a c t g c a g c a g c c t g g
g g c t g a a c t g g t g a a g c c t g g g g c t t c a g t g a a g c t g t c c
t g t a a g g c t t c t g g c t a c a c c t t c a c c a a c t a c t g g a t g c
a c t g g g t g a a g c a g a g g c c t g g a c a a g g c c t t g a g t g g a t
t g g a g a g a t t a a t c c t a g c c a c g g t c g t a c t a t c t a c a a t
g a a a a c t t c a a g a g c a a g g c c a c a c t g a c t g t a g a c a a a t
c c t c c a t c a c a g c c t t c a t g c a a c t c a g c a g c c t g a c a t c
t g a g g a c t c t g c g g t c t a t t t c t g t g c a a g a g g g g a c t g
g g a c c c g c c t g g t t t g c t t a c t g g g g c c a a g g g a c t c t g g
t c a c t g t c t c t g c a

```

【0135】

ACO-1 VL 配列 (配列番号: 14 (シグナルペプチドを含む)):

```

a t g g a t t t t c a a g t g c a g a t t t t c a g c t t c c t g c t a a t c a
g t g t c t c a g t c a t a a t g t c c a g a g g a c a a a t t g t t c t c a c
c c a g t c t c c a g c a a t c a t g t c t g c t t c t c c t g g g g a g a a g
g t c a c c t t g a c c t g c a g t g c c g g c t c a a g t g t a g a t t c c a
g c t a t t t g t a c t g g t a c c a g c a g a a g c c a g g a t c c t c c c c
c a a a c t c t g g a t t t a t a g c a c a t c c a a c c t g g c t t c t g g a
g t c c c t g c t c g c t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g g a c c t c t t
a c t c t c t c a c a a t c a g c a g c a t g g a g g c t g a a g a t g c t g c
c t c t t a t t t c t g c c a t c a g t g g a g t a g t t a c c c a t t c a c g
t t c g g c t c g g g g a c a a a a t t g g a a a t a a a a c g g

```

【0136】

ACO-1 VH (配列番号: 1 (シグナルペプチドは除外されている))

```

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

```

【0137】

ACO-1 VL (配列番号: 4 (シグナルペプチドは除外されている))

```

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

```


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

【0138】

ACO - 2 . 2 . 1 ハイブリドーマ細胞から、以下の核酸およびアミノ酸配列を持つ、単一の タイプ ACO - 2 軽鎖および単一の I G g 2 b ACO - 2 重鎖をクローン化した。

【0139】

ACO - 2 VH 配列 (配列番号 28 (シグナルペプチドを含む))

a t g g g a t g g a g c t a t a t c a t c c t c t t t t t g g t a g c a g c a g
c t a c a g a t g t c c a c t c c c a g g t c c a a c t g c a g c a g c c t g g
g g c t g a a c t g g t g a a g c c t g g g g c t t c a g t g a a g c t g t c c
t g c a a g g c c t c t g g c t a c a g c t t c a c c a g c t a c t g g a t g c
a c t g g g t g a a g c a g a g g c c t g g a c a a g g c c t t g a g t g g a t
t g g a g a g a t t a a t c c t a g c c a c g g t c g t a c t a g c t a c a a t
g a g a a c t t c a a g a g c a a g g c c a c a c t g a c t g t a g a c a a a t
c c t c c a a c a t a g t c t a c a t g c a a c t c a g c a g c c t g a c a t c
t g a g g a c t c t g c g g t c t a t t a c t g t g t a a g a g g g g a c t g
g g a c c c g c c t g g t t t g c t t a c t g g g g c c a a g g g a c t c t g g
t c a c t g t c t c t g t a

10

【0140】

ACO - 2 VL 配列 (配列番号 : 29 (シグナルペプチドを含む))

a t g g a t t t t c a a g t g c a g a t t t t c a g c t t c c t g c t a a t c a
g t g t c t c a g t c a t a a t g t c c a g a g g a c a a a t t g t t c t c a c
c c a g t c t c c a g c a a t c a t g t c t g c a t c t c c t g g g g a g a a g
g t c a c c t t g a c c t g c a g t g c c g g c t c a a g t g t a g g t t c c a
g c t a c t t t t a c t g g t a c c a g c a g a a g c c a g g a t c c t c c c c
c a a a c t c t g g a t t t a t g g c a c a t c c a a c c t g g c t t c t g g a
g t c c c t g c t c g c t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g g a c c t c t t
a c t c t c t c a c a a t c a g c a g c a t g g a g g c t g a a g a t g c t g c
c t c t t a t t t c t g c c a t c a g t g g a g t a g t t a t c c a t t c a c g
t t c g g c t c g g g g a c a a a a t t g g a a a t a a a a c g g

20

30

【0141】

ACO - 2 VH 配列 (配列番号 : 7 (シグナルペプチドは除外されている)) :

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

【0142】

ACO - 2 VL 配列 (配列番号 : 9 (シグナルペプチドは除外されている)) :

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

40

【0143】

K a b a t 定義に従う ACO - 2 CDR 配列は以下のとおりであることが見出された。

CDR - H1 : S Y W M H (配列番号 : 22)

CDR - H2 : E I N P S H G R T S Y N E N F K S (配列番号 : 23)

CDR - H3 : G G L G P A W F A Y (配列番号 : 17)

CDR - L1 : S A G S S V G S S Y F Y (配列番号 : 24)

CDR - L2 : G T S N L A S (配列番号 : 25)

CDR - L3 : H Q W S S Y P F T (配列番号 : 20)

実施例 2 - ヒト化 ACO - 1 のデザインおよび可能な復帰変異残基の同定

50

マウス ACO - 1 CDR の同定および特性評価

【 0 1 4 4 】

K a b a t 定義に従う ACO - 1 CDR 配列は以下のとおりであることが見出された。

CDR - H 1 : N Y W M H (配列番号 : 1 5)

CDR - H 2 : E I N P S H G R T I Y N E N F K S (配列番号 : 1 6)

CDR - H 3 : G G L G P A W F A Y (配列番号 : 1 7)

CDR - L 1 : S A G S S V D S S Y L Y (配列番号 : 1 8)

CDR - L 2 : S T S N L A S (配列番号 : 1 9)

CDR - L 3 : H Q W S S Y P F T (配列番号 : 2 0)

10

ヒト生殖細胞系列の同定

【 0 1 4 5 】

三次元タンパク質構造モデルは、タンパク質データベースバンク (P D B) : 1 Z 3 G からの構造テンプレートと共に、M O E (モレキュラー・オペレイティング・エンバイロメント (M o l e c u l a r O p e r a t i n g E n v i r o n m e n t) ; www.chemcomp.com で入手可能) を使用して確立された。P D B は Berman et al. (Nucl Acids Res 2000;28:235-242) 中で記載され、www.rcsb.org/pdb で入手可能である。P D B データベース中の抗体 - 抗原複合体の解析に基づいて、パラトープの最も可能性の高い残基は、ACO - 1 V H の残基 2 3 ~ 3 5 、4 9 ~ 5 8 、9 3 ~ 1 0 2 、および ACO - 1 V L の残基 2 4 ~ 3 4 、4 9 ~ 5 6 、8 9 ~ 9 7 であることが見

20

【 0 1 4 6 】

ACO - 1 V H および ACO - 1 V L を持つ生殖細胞系列 V データベースの検索から、以下の可能なフレームワーク鑄型を得た (E 値はカッコ中に与えられる) 。

V H : V H 1 _ 4 6 (3 e - 0 3 8) V H 1 _ f (6 e - 0 3 7) 、 V H 1 _ 0 2 (6 e - 0 3 7) 、 V H 1 _ 0 3 (1 e - 0 3 6) 、 V H 1 _ 2 4 (2 e - 0 3 4) 、

V L : V K I I I _ L 6 (9 e - 0 3 5) 、 V K I I I _ A 1 1 (4 e - 0 3 4) 、 V K I I I _ A 2 7 (8 e - 0 3 4) 、 V K I I I _ L 2 5 (1 e - 0 3 3) 、 V K I _ L 8 (1 e - 0 3 3) 。

30

【 0 1 4 7 】

マスクによる生殖細胞系列データベースの検索から以下の可能なフレームワーク鑄型を得た (E 値はカッコ中に与えられる) 。

V H : V H 1 _ 4 6 (3 e - 0 1 1) 、 V H 1 _ 0 2 (6 e - 0 1 1) 、 V H 1 _ f (1 e - 0 1 0) 、 V H 5 _ a (4 e - 0 1 0) 、 V H 1 _ 0 3 (4 e - 0 1 0) 、

V L : V K I I I _ A 1 1 (5 e - 0 0 9) 、 V K I I I _ L 6 (7 e - 0 0 9) 、 V K I I I _ A 2 7 (9 e - 0 0 9) 、 V K I I I _ L 2 5 (3 e - 0 0 8) 、 V K I _ L 9 (6 e - 0 0 8) 。

40

【 0 1 4 8 】

アライメントおよびヒットの手作業の検査後に、V H 1 _ 4 6 および V K I I I _ L 6 をヒトスキャフォールドとして選択した。例えば、ヒト化抗体の物理化学的性質を改変または至適化するために他の鑄型を選択することができる。J H 4 および J K 2 を生殖細胞系列 J - セグメントとして選択した (それぞれ配列番号 : 2 および 5) 。

至適ヒト化 ACO - 1 のデザイン

【 0 1 4 9 】

ヒト化は以下のルールで行なわれた

- マスクの外側の残基はヒトとされた。

- マスクの内側かつ K a b a t CDR の内側の残基はマウスとされた。

- マスクの内側かつマウス / 生殖細胞系列コンセンサスを持つ K a b a t CDR の外側

50

の残基は、コンセンサス配列とされた。

- マスクの内側かつマウス / 生殖細胞系列を持つ K a b a t C D R の外側の残基は、生殖細胞系列配列とされたが、マウスで異なるものは可能な復帰変異が行なわれた。

【 0 1 5 0 】

得られた至適 h z A C O - 1 抗体の C D R は次のとおりだった (K a b a t 定義に従う)。

C D R __ H 1 N Y W M H (配列番号 : 1 5)

C D R __ H 2 E I N P S H G R T I Y A Q K F Q G (配列番号 : 2 1)

C D R __ H 3 G G L G P A W F A Y (配列番号 : 1 7)

C D R __ L 1 S A G S S V D S S Y L Y (配列番号 : 1 8)

C D R __ L 2 S T S N L A S (配列番号 : 1 9)

C D R __ L 3 H Q W S S Y P F T (配列番号 : 2 0)

【 0 1 5 1 】

上記のヒト化方法 (h z A C O - 1 および I F N - A の三次元モデルに基づいたパラトープを制定するために予測された残基のマスクのデザイン) を使用すると、K a b a t 定義に従う A C O - 1 C D R H 2 配列中の対応するペプチドはマウス起原であったが、至適化された h z A C O - 1 C D R H 2 配列 (上記で太字で強調された) の 5 個の C 末端アミノ酸を含むペプチドは対応するヒトフレームワーク配列と同一であったので、単純な C D R グラフトとは対照的に、より少ないマウス残基を持つ h z A C O - 1 抗体が得られた。さらに、本解析において同定されたヒト化 A C O - 1 抗体のための C D R H 1 配列は W O 2 0 0 6 / 0 8 6 5 8 6 中に記載されていたものよりも短かった。至適化された h z A C O - 1 抗体、または少なくとも h z A C O - 1 V H 配列の一部を含む抗体もしくは抗原結合断片は、したがってヒト患者におけるヒト抗マウス抗体 (H A M A) 応答に対するリスクを減少させることができる。さらに、重鎖中の位置 6 0 ~ 6 2 における N E N の代わりに配列 A Q K を置換することは、脱アミド化の受けやすい 2 個のアスパラギン残基を避けるという長所を有する。

可能な復帰変異の同定。

【 0 1 5 2 】

A C O - 1 V H 配列および V L 配列の解析を図 1 中に示す。図 1 において、結果として生じるヒト化 A C O - 1 (h z A C O - 1) の V H 配列 (配列番号 : 3) および V L 配列 (配列番号 : 6) は、ヒトとして復帰変異の可能性のある残基 (すなわち復帰変異なし) と共に示される。フレームワーク領域中の以下の復帰変異バリエーションは、1 つまたは複数の至適化された h z A C O - 1 抗体を得るために同定され、これはしばしばもとのマウス抗体の親和性を保持するために必要とされる。

- h z A C O - 1 V H : 野生型 (すなわち、復帰変異はない)、V 5 Q、M 6 9 L、R 7 1 V、T 7 3 K、S 7 6 I、V 7 8 A およびその任意のものの任意の組み合わせ ;

- h z A C O - 1 V L : 野生型、E 1 Q、L 4 7 W、I 5 8 V、F 7 1 Y およびその任意のものの任意の組み合わせ ;

- 様々な重鎖 - 軽鎖の組み合わせで。

実施例 3 - h z A C O - 1 の親和性成熟のための A C O - 2 ベースの h z A C O - 1 バリエーションのデザイン

【 0 1 5 3 】

図 2 中で示されるように、A C O - 1 および A C O - 2 の V H 配列および V L 配列のアミノ酸配列アライメントは、それぞれの軽鎖および重鎖の間で高い配列同一性を示した。理論により限定されるものではないが、抗体が同じ V - D - J 再構成を有しており、生殖細胞系列配列と比較して 3 個の同一の変異を含有するので、同じ前駆細胞に抗体が由来する可能性がある。さらに、抗体は恐らく後続する体細胞超変異に起因して、1 3 個のアミノ酸残基で異なっていた。

【 0 1 5 4 】

A C O - 1 および A C O - 2 の V H ドメインおよび V L ドメイン中の 1 3 個の同一でな

10

20

30

40

50

いアミノ酸残基のうちの9個の残基が、ヒト化ACO-1抗体の親和性を改善するための変異解析に選択された(図3)。ACO-2に由来する超変異の単一の追加により有害なアミノ酸残基および有利なアミノ酸残基を同定できる可能性があり、有利なアミノ酸のみの導入を許容することによって、もとのマウスACO-1抗体およびACO-2抗体を越えるように親和性を改善する。標的化された残基は、軽鎖または重鎖CDRの1つの内のそれらの位置(Kabat定義に従う)に基づいて、または抗原-抗体三次元モデル化に基づく抗原と相互作用する可能性のある領域として述べられた領域内のそれらの位置に基づいて、選択された。

【0155】

以下のバリエーションは、1つまたは複数の最適化されたh z ACO-1抗体を得るために同定された。

- h z ACO-1 VH: 野生型、T28S、N31S、I58S、S76N、T77IおよびA93V、ならびにT28S、N31S、I58S、S76N、T77IおよびA93Vから選択された少なくとも2つの変異の任意の組み合わせ;
- h z ACO-1 VL: 野生型、D29G、L33F、S50G、ならびにD29G、L33F、S50Gから選択された少なくとも2つの変異の任意の組み合わせ、
- 様々な重鎖-軽鎖の組み合わせで。

【0156】

抗原結合に対する各々の残基の個々の寄与を評価するために、h z ACO-1の軽鎖および重鎖のコンストラクト内のACO-1配列からACO-2配列へと、残基を個別に変異させた。1シリーズの組み合わせ変異体も生成された。

実施例4 - ACO-1、ACO-2、h z ACO-1のクローニングおよび部位特異的変異誘発

ACO-1、ACO-2およびh z ACO-1

【0157】

VH配列およびVL配列は、Durocher et al. (Nucleic Acids Res. 2002;30(2):E9)によって記載されたHEK293-EBNA(HEK293-6E)発現系における一過性発現のために、適切なCMVプロモーターベースの発現ベクター(pTTベクター)に導入された。ベクターは、CMVプロモーターに加えて、pMB1起点、EBV起点およびAmpR遺伝子を含有する。ACO-1およびACO-2のVHは、それぞれ、マウスのIgG2aおよびIgG2bのための定常領域を含有するCMVベースのベクターの中へクローン化された。全長LCは、ACO-1およびACO-2の両方のための空のCMVベースのベクターに導入された。h z ACO-1の可変領域についてのDNA配列は、ジェネアート(Geneart)社、レーゲンスブルク、ドイツに注文した。h z ACO-1 VHについて提供された配列を、ヒトIgG4の定常領域(S241P)(ヒンジ領域中にS241P変異を含有する)を含有する発現ベクターに導入した。提供されたh z ACO-1 VL配列を、ヒト軽鎖の定常領域を含有するベクターに導入した。

h z ACO-1の復帰変異バリエーションの生成

【0158】

実施例2において同定された10個の可能な復帰変異を、抗原結合に対する各々の残基の個々の寄与を測定するために、h z ACO-1 HCコンストラクトおよびh z ACO-1 LCコンストラクトに別々に導入した。少数の組み合わせが同様に含まれていた。マウスCDR H2(配列番号:16)のKabat定義に相当する、延長されたCDR H2(h z ACO-1-Kabat CDR H2)を持つh z ACO-1のバリエーションも、部位特異的変異誘発によって生成された。

【0159】

部位特異的変異誘発は、h z ACO-1 LC発現ベクターおよびh z ACO-1 HC発現ベクターで行なわれた。単一変異を生成するために、ストラタジーン(Stratagene)社(カタログ番号200518)からのクイックチェンジ(QuickChange)(登録商標)部位特異的変異誘発キットを、製品プロトコールに従って使用し

10

20

30

40

50

た。所望の変異の導入は、各々の変異についてのプラスミドDNA調製物（MWGバイオテック社、マルティンスリート、ドイツ）の配列決定によって確認した。

【0160】

変異させたLCコンストラクトは発現のためにhzACO-1 HCと組み合わせ、変異させたHCコンストラクトは抗体発現のためにhzACO-1 LCと組み合わせた。

復帰変異を持つ軽鎖バリエーション：

hzACO-1-E1Q
hzACO-1-L47W
hzACO-1-I58V
hzACO-1-F71Y
hzACO-1-L47W、I58V

10

復帰変異を持つ重鎖バリエーション：

hzACO-1-V5Q
hzACO-1-M69L
hzACO-1-R71V
hzACO-1-T73K
hzACO-1-S76I
hzACO-1-V78A
hzACO-1-R71V、T73K
hzACO-1-M69L、R71V、T73K、S76I、V78A
hzACO-1-Kabat CDRH2

20

ACO-2ベースのhzACO-1バリエーションの生成

【0161】

実施例3において記載されるように、親和性を改善するために、hzACO-1抗体の中へACO-2の特定の残基を導入する部位特異的変異誘発を、hzACO-1 LC発現ベクターおよびhzACO-1 HC発現ベクターで行なった。単一変異を生成するために、ストラタジーン社（カタログ番号200518）からのクイックチェンジ（登録商標）部位特異的変異誘発キットを、製品プロトコールに従って使用した。組み合わせ変異は、製品プロトコール（カタログ番号200513）に従って、クイックチェンジ（登録商標）部位特異的変異誘発およびクイックチェンジ（登録商標）多重部位特異的変異誘発キットの両方を使用して生成した。

30

【0162】

所望の変異の導入は、各々の変異についてのプラスミドDNA調製物（MWGバイオテック社、マルティンスリート、ドイツ）の配列決定によって確認した。

【0163】

変異させた軽鎖コンストラクトは発現のためにhzACO-1重鎖と組み合わせ、変異させた重鎖コンストラクトは抗体発現のためにhzACO-1軽鎖コンストラクトと組み合わせた。

ACO-2に由来する変異を持つ軽鎖バリエーション：

hzACO-1-D29G
hzACO-1-L33F
hzACO-1-S50G hzACO-1-D29G、L33F、S50G

40

ACO-2に由来する変異を持つ重鎖バリエーション：

hzACO-1-T28S
hzACO-1-N31S
hzACO-1-I58S
hzACO-1-S76N
hzACO-1-T77I
hzACO-1-A93V
hzACO-1-N31S、I58S

50

h z A C O - 1 - T 2 8 S、N 3 1 S、I 5 8 S、A 9 3 V
h z A C O - 1 - S 7 6 N、T 7 7 I
h z A C O - 1 - T 2 8 S、N 3 1 S、I 5 8 S、S 7 6 N、T 7 7 I、A 9 3 V
h z A C O - 1 - T 2 8 S、A 9 3 V
h z A C O - 1 - N 3 1 S、A 9 3 V
h z A C O - 1 - T 2 8 S、N 3 1 S、A 9 3 V
h z A C O - 1 - T 2 8 S、N 3 1 S

実施例 5 - 組換え A C O に由来する抗体の発現

【 0 1 6 4 】

A C O - 1、A C O - 2、h z A C O - 1 および h z A C O - 1 のバリエーションは、一般的な抗体発現プロトコールに従って、一過性にトランスフェクションした H E K 2 9 3 細胞で発現させた。以下は、懸濁に適合した H E K 2 9 3 細胞のためのトランスフェクションプロトコールを記載する。

【 0 1 6 5 】

細胞維持：懸濁に適合した H E K 2 9 3 細胞は、25 μ g/ml ジェネティシン (G e n e t i c i n) (登録商標) (インビトロゲン社カタログ番号：10131-019)、0.1% v/v、プルロニック (P l u r o n i c) (登録商標) F-68 (インビトロゲン社カタログ番号：12347-019) 界面活性剤および 1% v/v ペニシリン-ストربتマイシン (随意) (インビトロゲン社カタログ番号 15140-122) で補足した、ギブコ (G I B C O) (登録商標) フリースタイル (F r e e S t y l e) (商標) 293 発現培地 (インビトロゲン社カタログ番号：12338-026) 中で増殖させた。細胞は、37、8% C O₂ および 125 rpm のインキュベーター振盪機において、0.2 ~ 2 $\times 10^6$ 細胞/ml の間の細胞密度でエルレンマイアーの振盪フラスコ中で維持した。

【 0 1 6 6 】

DNA トランスフェクション：トランスフェクションのために使用した培養の細胞密度は 0.8 ~ 1.5 $\times 10^6$ 細胞/ml であった。1 ml 細胞培養あたり 0.5 μ g 軽鎖ベクター DNA + 0.5 μ g 重鎖ベクター DNA を使用した。293 フェクチン (f e c t i n) (商標) (インビトロゲン社カタログ番号：12347-019) を、トランスフェクションされた DNA 1 μ g あたり 1 μ l 試薬の濃度で、トランスフェクション試薬として使用した。293 フェクチン (商標) を 30 \times 体積の O p t i - M E M (登録商標) (インビトロゲン社カタログ番号：51985-034) で希釈し、混合し、室温 (23 ~ 25) で 5 分間放置した。DNA を全 DNA 1 μ g あたり 30 μ l の O p t i - M E M の (登録商標) で希釈し、混合し、室温 (23 ~ 25) で 5 分間放置した。DNA およびトランスフェクション試薬希釈物を 1 : 1 で混合し、室温 (23 ~ 25) で 25 分間放置した。DNA - 293 フェクチン (商標) 混合物を細胞培養に直接加えた。トランスフェクション細胞培養を、37、8% C O₂ および 125 rpm のインキュベーター振盪機に移した。4 ~ 7 日後に、細胞培養上清を遠心分離によって採取し、続いて 0.22 μ m の P E S フィルター (コーニング (C o r n i n g) 社カタログ番号：431098) を介して濾過した。抗体は、上清として分析するか、または標準的なプロテイン A 精製技術を使用して精製した。

h z A C O - 1 および h z A C O - 1 - K a b a t C D R H 2 の発現レベルの比較

【 0 1 6 7 】

細胞が 2 つの抗体バリエーションのいずれかを発現する能力に対して、末端の C D R H 2 残基が効果を有するかどうかを決定するために、H E K 2 9 3 - 6 E 細胞における h z A C O - 1 および h z A C O - 1 - K a b a t C D R H 2 の一過性発現レベルを比較した。

【 0 1 6 8 】

h z A C O - 1 軽鎖および h z A C O - 1 重鎖または h z A C O - 1 - K a b a t C D R H 2 重鎖のための p T T ベースの発現ベクターで、上記されるように、H E K 2 9 3

10

20

30

40

50

- 6 E 細胞をトランスフェクションした。トランスフェクションは三重で行なった。各々の抗体バリエーションについては、ピペティングの不正確さからの影響を最小限にするために DNA - 293 フェクチンのマスター混合物を使用して、3つの培養 (25 ml) をトランスフェクションした。トランスフェクションした培養を、上記されるように、4日間振盪機インキュベーターでインキュベーションした。4日目に、細胞生存率および細胞密度の測定のために培養からサンプルを抽出し、残りの細胞培養上清を遠心分離によって採取した。抗体産生の定量化解析は、フォルテバイオ (ForteBio) 社オクテット・システムおよびプロテイン A バイオセンサーを使用して、清澄化した細胞培養上清に対するバイオレイヤー干渉法によって、直接行なわれた。細胞培養の密度および生存率は、セデックス (Cedex) HiRes 自動化細胞培養アナライザーを使用して測定した。結果を以下の表 4 中に示す。

10

表 4。発現解析

【表 4】

	発現収率 (mg/L)	標準偏差 (発現収率)	生存細胞密度 ($\times 10^5$ 細胞/ml)	標準偏差 (生存細胞密度)	細胞生存率 (%)	標準偏差 (細胞生存率)
h z A C O - 1	41	0.9	19	0.2	65	2.1
h z A C O - 1 - K a b a t a t C D R H 2	22	0.7	18	0.5	65	3.2

20

【0169】

表 4 中の結果は、h z A C O - 1 - K a b a t C D R H 2 (従来の手順を使用してヒト化されたヒト化 I F N - 抗体であり、従って全長 K a b a t 配列) と比較して、h z A C O - 1 (本発明に従うヒト化 I F N - 抗体) の一過性発現レベルの有意な差を予想外に示す。細胞の生存率または密度の差は、2つの h z A C O - 1 バリエーションのいずれかでトランスフェクションされた細胞培養について観察されなかった。h z A C O - 1 - K a b a t C D R H 2 抗体バリエーションの発現レベルに比較して、h z A C O - 1 の発現レベルは 2 倍高かった。

【0170】

K a b a t で定義された C D R H 2 と比較して、C D R H 2 のより短いバージョンをグラフトすることによって、抗体の発現レベルは意外にも有意に増加した。

30

【0171】

理論により束縛されるものではないが、h z A C O - 1 中のヒト生殖細胞系列に由来する残基は、h z A C O - 1 - K a b a t C D R H 2 抗体バリエーション (H C 折り畳みおよび可能性として L C - H C 相互作用に影響する、延長された C D R H 2 (配列番号: 16) を保有する) と比較して、タンパク質安定性およびしたがって発現収率の改善をもたらすという仮説をたてることができる。

【0172】

一過性発現レベルで観察された、改善されたタンパク質安定性から結果として生じるかかる改善されたレベルのタンパク質発現は、安定した C H O ベースの産生細胞株に反映されるだろう。したがって、C D R H 2 (配列番号: 21) の短いバージョンのグラフトによって、高産生の安定した産生細胞株の生成はこのように可能である。

40

h z A C O - 1 の I g G 4、I g G 1 および I g G 2 のバリエーションの発現レベルの比較

【0173】

重鎖サブクラススイッチが抗体発現レベルに対して効果があるかどうかを決定するために、H E K 293 - 6 E 細胞における一過性発現レベルは、h z A C O - 1 のリード I g G 4 (S 241P) バリエーションおよび h z A C O - 1 (I g G 1) および h z A C O - 1 (I g G 2) について比較された。

【0174】

実験は、上記の発現解析と同様であるが、以下の変化で行なわれた。実験は 5 ml の培

50

養において二重で行なった。培養は、37、8%CO₂および250rpmの振盪機インキュベーターにおいてフィルターキャップの50mlのファルコン(falcon)社チューブ中でインキュベーションした。

【0175】

予測外に、hzACO-1(IgG1)およびhzACO-1(IgG2)の平均発現レベルは、hzACO-1(IgG4)の発現レベルの約65%だった。タンパク質発現において観察された減少(~35%)に基づいて、hzACO-1可変ドメインおよびIgG4定常ドメインの組み合わせが他の鎖サブクラスを持つ組み合わせより優れており、この分子の開発が高産生の安定した産生細胞株の生成を大幅に促進する、と結論する。

実施例6: hzACO-1-Fabとの複合体におけるIFN- γ の結晶構造

10

【0176】

hzACO-1のFab断片との複合体におけるIFN- γ の結晶構造は、X線結晶解析を使用して決定し、3.3 Å分解能まで精密化した(図8)。

材料および方法

【0177】

IFN- γ (配列番号: 30のアミノ酸1~166)およびhzACO-1 Fab(配列番号: 32の軽鎖配列および配列番号: 31の残基1~221の重鎖配列を持つ)を、IFN- γ のわずかな過剰量で混合し、複合体をゲル濾過カラムで精製した。タンパク質複合体hzACO-1-Fab/IFN- γ を、25mMヘスバッファー(pH7.5)+25mM NaClのバッファー中に入れ、5mg/mlまで濃縮した。複合体は、100mMヘスバッファー(pH7.5)、15%PEG10,000および15%エチレングリコール(沈殿溶液)中で結晶化された。回折データ収集の前に、結晶を液体N₂中で急速凍結した。結晶を、凍結溶液(25%v/vの99%グリセロールおよび75%の沈殿溶液の混合物)へ最初に移した。回折データは、ビームラインBLI911-3(MAX研究所、ルンド、スウェーデン)で収集した。回折データは、XDSプログラムパッケージ(Kabsch, J. Appl. Crystallogr. 1993;26:795-800)を使用して、インデックスを付け、統合した。

20

【0178】

三次元構造は、CCP4パッケージ(Baily, 1994, Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 50, 760-763)のPHASERプログラム(Read, 2001, Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 57, 1373-1382)を使用する分子置換(MR)法を使用して決定された。複合体化されていないhzACO-1 Fabの結晶構造は、1.52

30

Å分解能(RおよびRフリーはそれぞれ0.18および0.21)まで以前に決定されていた(データ不掲載)。それらの三次元座標は、続いてhzACO-1/IFN- γ 複合体のためのMR計算において使用された。検索モデルは3部分へと分割された。1) hzACO-1 Fabの可変ドメイン、2) hzACO-1 Fabの定常ドメイン、および3) IFN- γ (配列番号: 30)の配列を得るためにCOOTプログラムによって変異させた、PDBに寄託されたIFN- γ モデル(タンパク質データバンク(Berman et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28, 235-242)アクセッションコード1B5L(RADHAKRISHNAN et al, 1999, J.MOL.BIOL.v.286pp.151))。最終的な空間群決定はPHASERプログラムによって行われた。最も高いスコアが、それぞれ10.7、4.4および2.6の回転関数ピーク(RZの)、それぞれ24.1、26.4および8.0の並進ピーク(TZの)、それぞれ383、918および1134の対数尤度比(LLGの)により、ならびに対称関連分子に対するオーバーラップなしで、空間群P4₁について得られた。

40

【0179】

分子置換に続いてCOOT分子グラフィックスプログラムにおけるモデルに対するいくつかの調整をし、その後最大2000Kまでのねじれのシミュレーテッドアニーリングを、個々の温度要因を精密化せずに、2回適用した。もとのR値およびRフリー値はそれぞれ0.416および0.439であり、シミュレーテッドアニーリング後の最終的な値は

50

それぞれ 0.314 および 0.427 であった。次いで、モデルに、REFMAC5 プログラム (Murshudov et al., 1997, Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 53, 240-255) を使用して、COT プログラムに従う精密化における手作業の介入を行ない、それぞれ 0.216 および 0.348 の R 値および R フリー値を得た。モデルは残基 1 ~ 21 を含むが、残基 22 ~ 23 は、Ala 残基、IFN-8 の、28 ~ 101 および 114 ~ 164、h z ACO-1 軽鎖の 1 ~ 215 ならびに h z ACO-1 重鎖の 1 ~ 219 として精密化された。

【0180】

精密化において R と R フリーとの間で見出される比較的大きな差は、データーの限定された分解能 (3.3) のため、および電子密度地図の解釈が完全に欠けている IFN-8 の X 線モデルの実質的な範囲があるためである。電子密度地図は、h z ACO-1 - Fab に対する IFN-8 の安定した接点における残基を明確に定義するが、抗体部位から離れた IFN-8 の X 線構造モデルの詳細は、あまりよく定義されず、したがってあまり正確に決定されない。

結果

【0181】

接触は、Fab と IFN-8 分子との間の 4.0 のカットオフ距離を使用して、C CP4 スイートの CONTACT コンピュータープログラムによって同定された。ヒト h z ACO-1 について結果として生じるエピトープは、IFN-8 (配列番号: 30) の以下の残基を含むことが見出された。Ser 55、His 58、Glu 59、Gln 62、Gln 63、Asn 66、Glu 97、Leu 118、Arg 121、Lys 122、Phe 124、Gln 125、Arg 126、Thr 128、Leu 129、Thr 132。IFN-8 との相互作用に関与する h z ACO-1 の残基 (パラトープ) は、h z ACO-1 の軽 (L) 鎖の Ser 32、Tyr 33、Tyr 35、Tyr 50、Ser 51、Trp 92、Ser 93、Tyr 95 および Phe 97 (Kabat ではなく配列番号: 32 に従うナンバリング)、ならびに重 (H) 鎖 (表 9) の Thr 30、Asn 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Glu 50、Asn 52、Ser 54、His 55、Arg 57、Leu 101、Gly 102、Trp 105 (Kabat ではなく配列番号: 31 に従うナンバリング) を含む。

配列番号: 30

> IFN__a8

CDLPQTHSLGNRRALILL AQMRRISPFSCLKDRHDFEF PQ
EEFDDKQFQKAQAISVLHEM
IQQTFNLFSTKDS SAALDETLLDEFYIELDQQLNDLESCV
MQEVGVIESPLMYEDSILAV
RK YFQRITLYLTEKKYSSCAWEVVRAEIMRSFSL SINLQK
RLKSKE

配列番号: 32

h z ACO-1 LC

1 EIVLTQSPATLSLSLSPGERATLSCSAGSSVDSSYL
WYQQKPGQAPRLLIY
51 STSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDF
AVYYCHQWSSYPFTFG
101 QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWK
151 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQ
201 GLSSPVTKSFNRGEC

配列番号: 31

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

10

【 0 1 8 2 】

図 9 に示されるように、I F N A R 2 結合エピトープは h z C A O - 1 結合エピトープから離れているが、I F N - 8 上の h z A C O - 1 相互作用エピトープは I F N A R 1 結合エピトープに部分的にオーバーラップする。そのことは、h z A C O - 1 による I F N - の中和が、I F N A R 2 ではなく I F N A R 1 への I F N - の結合を中和することによって起こることを示唆する。したがって、h z A C O - 1 は I F N - / I F N A R 2 複合体を結合するが、細胞内シグナル伝達の原因である三成分受容体複合体 I F N - / I F N A R 1 / I F N A R 2 の形成を阻害することを想定できる。

表 5。I F N - 8 のパラメーター：構造決定のための使用された h z A C O - 1 - F a b 複合体結晶

20

【表 5】

空間群：	P 4 ₁		
セルパラメーター [Å]：	a	b	c
	1 1 2. 7 4	1 1 2. 7 4	6 0. 5 5
分子複合体／非対称単位：	1		

表 6。X D S パッケージのプログラム X S C A L E からの X 線データー統計

【表 6】

分解能 [Å]	反射数		R 因子			I/σ	R-meas	Rmrgd-F	S_norm/ S_anom
	観測	独立	可能	完全性	観測	予想	比較		
10.00	984	353	453	77.9%	4.4%	4.9%	984	4.1%	-1%
6.00	4237	1461	1562	93.5%	6.8%	7.2%	4237	7.8%	1%
5.00	3922	1343	1411	95.2%	9.7%	10.1%	3922	11.1%	3%
4.00	8747	3063	3182	96.3%	11.6%	11.9%	8747	13.7%	8%
3.50	8588	3106	3212	96.7%	24.8%	24.9%	8588	31.3%	9%
3.45	1102	397	410	96.8%	36.9%	37.8%	1102	44.4%	7%
3.40	1198	448	464	96.6%	41.8%	41.3%	1198	48.7%	-12%
3.35	1271	468	495	94.5%	56.0%	51.5%	1271	66.9%	1%
3.30	1317	486	502	96.8%	59.6%	51.2%	1317	67.4%	-8%
total	31366	11125	11691	95.2%	14.1%	14.2%	31366	20.2%	6%

10

20

30

40

表 7。REFMAC プログラムの IFN - 8 : h z A C O - 1 - F a b の最後の精密化
サイクルからの統計。

50

【表 7】

精密化において使用されるデーター。		
高分解能範囲（オングストローム）	3.30	
低分解能範囲（オングストローム）	20.23	
データーカットオフ（ σ （F））	無し	
範囲の完全性（%）	95.66	
反射数	10571	
精密化において使用されるデーターへのフィット。		
クロス検証法	全体で	10
フリーR値テストセット選択	ランダム	
R値（ワーキングセット+テストセット）	0.22272	
R値（ワーキングセット）	0.21646	
フリーR値	0.34845	
フリーR値テストセットサイズ（%）	5.0	
フリーR値テストセットカウント	552	
最も高い分解能ビンへのフィット。		
使用されるビンの総数	20	20
高ビン分解能範囲	3.300	
低ビン分解能範囲	3.384	
ビンにおける反射（ワーキングセット）	761	
ビン完全性（ワーキング+テスト）（%）	96.06	
ビンR値（ワーキングセット）	0.290	
ビンフリーR値セットカウント	44	
ビンフリーR値	0.446	
B値。		
ウィルソンプロットから（ A^{**2} ）	ヌル	30
平均のB値（全体、 A^{**2} ）	52.314	
全体の異方性B値。		
B 1 1（ A^{**2} ）	-0.96	
B 2 2（ A^{**2} ）	-0.96	
B 3 3（ A^{**2} ）	1.92	
B 1 2（ A^{**2} ）	0.00	
B 1 3（ A^{**2} ）	0.00	
B 2 3（ A^{**2} ）	0.00	
推定された全体の座標誤差。		40
R値に基づくESU（A）	ヌル	
フリーR値に基づくESU（A）	0.776	
最大尤度に基づくESU（A）	0.574	
最大尤度に基づいたB値についてのESU（ A^{**2} ）	33.433	

相関係数。			
相関係数F O - F C			0.901
相関係数F O - F Cフリー			0.727
理想値からのRMS偏差	カウント	RMS	ウェイト
原子を精密化する結合距離 (Å)	4628	0.014	0.022
原子を精密化する結合角 (度)	6285	1.738	1.953
ねじれ角、ピリオド1 (度)	577	8.885	5.000
ねじれ角、ピリオド2 (度)	195	40.409	24.205
ねじれ角、ピリオド3 (度)	770	23.636	15.000
ねじれ角、ピリオド4 (度)	22	18.930	15.000
キラル中心拘束 (Å**3)	704	0.110	0.200
原子を精密化する一般的な面 (Å)	3478	0.007	0.021

10

表8。IFN - 8 - h z A C O - 1 F a b L 鎖相互作用。

4 . 0 のカットオフを使用した。接触はCCP4スイートのCONTACTコンピュータープログラムによって同定された。最後のカラムにおいて、CONTACTによって計算されるように、「***」は、この接触での水素結合についての高い可能性（距離 < 3 . 3 ）を示し、「*」は、弱い可能性（距離 > 3 . 3 ）を示す。空白は、水素結合の可能性がないとプログラムが判断したことを示す。

20

【表 8】

I F N - α 8 原子	h z A C O - 1 F a b L 原子	距離 (Å)
L e u 1 1 8 I C B	T y r 9 5 L C E 2	3. 7 8
L e u 1 1 8 I C G	T y r 9 5 L C E 2	3. 6 8
	T y r 9 5 L C D 2	3. 9 0
L e u 1 1 8 I C D 1	T y r 9 5 L C G	3. 9 5
	T y r 9 5 L C E 2	3. 5 3
	T y r 9 5 L C D 2	3. 2 1
	S e r 9 3 L O	3. 7 0
	T y r 9 5 L N	3. 9 6
	P h e 9 7 L C E 1	3. 6 2
L e u 1 1 8 I C D 2	T r p 9 2 L O	3. 8 4
A r g 1 2 1 I N H 2	T y r 9 5 L O H	3. 9 3 *
L y s 1 2 2 I C A	T y r 3 3 L O H	3. 3 8
L y s 1 2 2 I C B	T y r 3 3 L O H	3. 1 2
L y s 1 2 2 I C G	T y r 3 3 L C E 1	3. 7 5
	T y r 3 3 L C Z	3. 3 7
	T y r 3 3 L O H	2. 9 3
L y s 1 2 2 I C D	T y r 3 3 L C Z	3. 7 4
	T y r 3 3 L O H	3. 4 0
L y s 1 2 2 I C E	T y r 3 3 L O H	3. 3 3
L y s 1 2 2 I C	T y r 3 3 L O H	3. 7 0
L y s 1 2 2 I O	T y r 3 3 L O H	3. 4 1 *
G l n 1 2 5 I C G	T r p 9 2 L C H 2	3. 1 8
	T y r 3 3 L C E 1	3. 8 0
	T r p 9 2 L C Z 2	3. 6 3
G l n 1 2 5 I C D	T r p 9 2 L C H 2	3. 7 0
	T y r 3 5 L O H	3. 8 1
	T r p 9 2 L C Z 2	3. 5 8
G l n 1 2 5 I O E 1	T y r 3 5 L O H	3. 5 0 *
G l n 1 2 5 I N E 2	S e r 3 2 L O	3. 2 4 * * *
	S e r 5 1 L O G	3. 3 7 *
	T y r 3 3 L C E 1	3. 9 4
	T y r 3 5 L O H	3. 5 9 *
	T r p 9 2 L C Z 2	3. 6 7
A r g 1 2 6 I C D	T y r 3 3 L O H	3. 9 4
L e u 1 2 9 I C D 1	S e r 5 1 L C B	3. 8 0
	S e r 5 1 L O G	3. 7 7
	S e r 3 2 L O G	3. 4 0
L e u 1 2 9 I C D 2	S e r 5 1 L O G	3. 9 0
T h r 1 3 2 I O G 1	T y r 5 0 L O H	3. 9 0 *

表 9。I F N - 8 - h z A C O - 1 F a b H 鎖相互作用。

4. 0 のカットオフを使用した。接触は C C P 4 スイートの C O N T A C T コンピュータープログラムによって同定された。最後のカラムにおいて、C O N T A C T によって計算されるように、「* * *」は、この接触での水素結合についての高い可能性（距離 < 3

10

20

30

40

50

. 3)を示し、「*」は、弱い可能性 (距離 > 3 . 3)を示す。空白は、水素結合の可能性がないとプログラムが判断したことを示す。

【表 9】

I FN- α 8原子	h z ACO-1 F a b H原子	距離 (Å)
S e r 55 I C B	A r g 57 H N H 2	3 . 5 8
S e r 55 I O G	A r g 57 H N E	3 . 1 8 ***
	A r g 57 H C Z	3 . 3 0
	A r g 57 H N H 2	2 . 8 0 ***
H i s 58 I C G	H i s 55 H C D 2	3 . 7 3
H i s 58 I C E 1	A s n 52 H N D 2	3 . 9 4
	S e r 54 H C B	3 . 9 0
	S e r 54 H O G	3 . 7 9
H i s 58 I N E 2	H i s 55 H C D 2	3 . 5 3
	S e r 54 H C B	3 . 6 0
	S e r 54 H O G	3 . 2 0 ***
H i s 58 I C D 2	H i s 55 H C D 2	3 . 1 9
G l u 59 I C D	T r p 33 H N E 1	3 . 9 0
G l u 59 I O E 2	T r p 33 H C D 1	3 . 7 4
	T r p 33 H N E 1	3 . 0 1 ***
G l n 62 I C D	A s n 52 H O D 1	3 . 4 4
	T h r 30 H O	3 . 7 1
G l n 62 I O E 1	A s n 52 H C G	3 . 9 1
	A s n 52 H O D 1	3 . 0 2 ***
	S e r 54 H C B	3 . 6 7
	T h r 30 H C	3 . 6 9
	T h r 30 H O	2 . 5 5 ***
	A s n 31 H C A	3 . 8 7
G l n 62 I N E 2	A s n 52 H C G	3 . 7 7
	A s n 52 H O D 1	3 . 1 3 ***
	A s n 52 H N D 2	3 . 9 5 *
G l n 63 I C D	L e u 101 H C D 1	3 . 8 3
G l n 63 I O E 1	L e u 101 H C G	3 . 8 7
	L e u 101 H C D 1	2 . 9 6
G l n 63 I N E 2	L e u 101 H C D 2	3 . 7 9
A s n 66 I C G	A s n 31 H O	3 . 9 4
A s n 66 I O D 1	T y r 32 H C E 1	3 . 5 4
	A s n 31 H C B	3 . 8 9
	A s n 31 H C	3 . 8 6
	A s n 31 H O	2 . 8 0 ***
	T y r 32 H C Z	3 . 8 2
A s n 66 I N D 2	A s n 31 H O D 1	3 . 7 9 *
G l u 97 I C G	S e r 54 H O G	3 . 8 5
G l u 97 I C D	S e r 54 H O	3 . 9 7
	S e r 54 H O G	3 . 2 4
G l u 97 I O E 1	S e r 54 H O	3 . 5 4 *
G l u 97 I O E 2	S e r 54 H C B	3 . 8 8
	S e r 54 H O G	2 . 5 6 ***

【 0 1 8 3 】

【表 9 - 1】

Arg	121I CZ	Glu	50H CD	3.73
		Glu	50H OE1	3.31
		Glu	50H OE2	3.30
Arg	121I NH1	His	35H CE1	3.89
		Glu	50H CD	3.78
		Glu	50H OE1	3.06 ***
		Glu	50H OE2	3.66 *
		Trp	105H CZ3	3.82
Arg	121I NH2	Glu	50H CD	3.08
		Glu	50H OE1	2.80 ***
		Glu	50H OE2	2.73 ***
		Trp	33H CG	3.66
		Trp	33H CE2	3.33
		Trp	33H CD2	3.51
		Trp	33H CZ2	3.88
		Trp	33H CD1	3.54
		Trp	33H NE1	3.35 *
Phe	124I CB	Leu	101H CD1	3.79
Gln	125I CD	Gly	102H N	3.69
Gln	125I OE1	Leu	101H CA	3.76
		Leu	101H CB	3.38
		Leu	101H C	3.57
		Gly	102H N	2.55 ***
		Gly	102H CA	3.24
Thr	128I OG1	Leu	101H CB	3.84

10

20

実施例 7 : h z A C O - 1 の親和性成熟のための構造に基づく変異のデザイン

【 0 1 8 4 】

抗体 / 抗原複合体のエピトープおよびパラトープが既知でないならば、非常に多数の可能なアミノ酸残基を抗体の親和性を改善するために変異させることができ、さらにそれらは特定の位置での至適残基を同定するために 20 の残りのアミノ酸残基のいずれかに変換することができる。C D R 領域は変異のための利用可能な約 54 の残基を保持する。したがって、相互作用の親和性を改善するために、 $54 \times 20 = 1080$ アナログを C D R 内でのみ生成することができる。さらに、C D R の外側の変異を親和性を改善するために作製することができる。

30

【 0 1 8 5 】

しかしながら、抗体 / 抗原の構造が既知である場合、親和性を改善するにふさわしい、より限定された数の変異を、構造予測に基づいて予測および分析することができる。したがって、h z A C O - 1 の F a b 断片との複合体における I F N - 8 の結晶構造に基づいて、実施例 6 において記載されるように、すべての I F N - サブタイプに対する h z A C O - 1 の結合を改善する 3 つの変異が同定された。3 つの変異は、h z A C O - 1 H C T 30 R、h z A C O - 1 L C Y 32 E、および組み合わせの h z A C O - 1 Y 32 E、T 30 R である (K a b a t に従う残基ナンバリング)。変異の同定は以下で記載される。

40

【 0 1 8 6 】

L C Y 32 E : I F N - 8 の残基 L y s 122 (h z A C O - 1 に結合するエピトープの一部である) についての電子密度が、いくぶん高移動度を示すことが理解できる。さらに、h z A C O - 1 軽鎖の残基 T y r 32 (K a b a t 表記法) の原子 O は、L y s 122 側鎖の C および C の原子へ向けられる。その相互作用は至適の残基 - 残基相互作用ではない。G l u または A s p のような負に荷電した残基に軽鎖 T y r 32 を変異させることは、I F N - 8 の抗体軽鎖 T y r 32 残基と正に荷電した L y s 122 残基との間で強いイオン結合を形成する可能性を生じさせる。その理由のために

50

、h z A C O - 1 抗体の親和性を改善するために、Y を E と交換した。

【 0 1 8 7 】

H C T 3 0 R : X 線構造における I F N - 8 に近い各々の h z A C O - 1 残基について、コアの側鎖原子の数 (c o r e)、周辺の側鎖原子の数 (p e r i)、荷電した相互作用の数 (c h a r)、水素結合の数 (h y b o) および疎水性相互作用の数 (h y p h) の特性を計算し、表 1 0 中で以下に示した。

表 1 0 。 h z A C O - 1 モノクローナル抗体のアミノ酸の特性

【表 1 0 】

軽鎖						
K a b a t	R e s	c o r e	p e r i	c h a r	h y b o	h y p h
2 9	D	1	2	1		
3 1	S	2				1
3 2	Y	5	3			6
3 4	Y	3				2
4 9	Y	3	1		1	2
5 0	S	2				8
5 3	N	1	3			1
9 1	W	5	2			9
9 2	S		1			
9 3	S					4
9 4	Y	6	2			
9 6	F	2	2			
重鎖						
2 8	T		3			
3 0	T		3			
3 1	N	4				1
3 2	Y	6	2			1
3 3	W	1 0				3
3 5	H	2	2			
5 0	E	4	1	1	1	
5 2	N	3	1		1	
5 2 A	P		1			
5 3	S	2			2	
5 4	H	4	2			6
5 6	R	5	2	1	1	
5 8	I	2	2			2
6 4	Q		1			
7 1	R		1	1		
9 7	L	4				3
9 8	G				1	
9 9	P		2			
1 0 0 A	W	2	3			1

【 0 1 8 8 】

コアおよび周辺の原子の数は、 $101 \times 101 \times 101$ ノードの格子点上に X 線の構造を重層することによって計算され、各々の格子点について、ノードから 2 . 5 未満の原子数 (N_{ex}) および 3 . 5 未満の原子数 (N_{in}) を計算した。コアのノードは 0 より多い

N_{ex} を有し、 $hzACO - 1$ および $IFN - 8$ の両方からの原子を包含する。周辺のノードは $N_{ex} = 0$ であり、0より多い N_{in} を有し、 $hzACO - 1$ および $IFN - 8$ の両方からの原子を包含する。コアの側鎖原子はここで任意のノードから2.5未満の原子である。周辺の側鎖原子はここで任意のノードから3.5未満および2.5以上の原子である。

【0189】

最終的に、周辺残基は周辺原子のみを持ち、相互作用のない残基として定義され、したがってこの残基は結合を生じるように修飾することができる。 $LC - S92$ 、 $HC - T28$ 、 $HC - T30$ 、 $HC - P52$ 、 $HC - Q64$ および $HC - P99$ が同定されている。重鎖のプロリンでないものに注目して、変異 $HC - T28R$ が $D90$ との相互作用の可能性を有し、 $HC - T30R$ が $D90$ および $E97$ の両方との相互作用の可能性を有し、 $Q64R$ が $E114$ との相互作用の可能性を有するであろうことは目視検査によって明らかであるが、他の類似した変異も適用することができる。 $E97$ のみがすべてインターフェロンにわたって保存されるので、 $HC - T30R$ は $hzACO - 1$ と類似したプロフィールで最も良く結合することが期待される。

【0190】

特異的変異 $HC - T30R$ は、 $hzACO - 1$ の親和性を改善するために結合部位の周辺における電荷 - 電荷相互作用を確立するようにデザインされた。

【0191】

さらに、 $LC - Y32E$ および $HC - T30R$ の両方の変異を含有する二重変異($hzACO - 1 - Y32E$, $T30R$ と呼ばれる)は、2つの変異が相加効果を有するかどうかを決定するために生成および分析された。実施例8 - $hzACO - 1$ 、 $hzACO - 1$ バリエーションと組換えヒト $IFN -$ サブタイプとの間の相互作用のための動力的パラメータの決定。

【0192】

タンパク質相互作用は、表面プラズモン共鳴(SPR)解析を使用して、リアルタイムでモニタリングすることができる。この研究において、抗 $IFN -$ モノクローナル抗体 $hzACO - 1$ およびそのバリエーションの特性を評価するために、組換えヒトインターフェロン($IFN -$)の様々なサブタイプに対する親和性について、ピアコア3000およびピアコアT100の器械で SRP 解析を行なった。

【0193】

親和性研究は、センサーチップ表面上のカルボキシメチル化されたデキストラン膜($CM5$)に遊離アミン基を介して共有結合でカップリングさせたそれぞれのモノクローナル抗体により、直接結合手順を使用して行なわれた。組換え $IFN -$ サブタイプ(PBL バイオメディカル・ラボラトリーズ社、ニュージャージー、アメリカ)を様々な濃度で注入し、続いてセンサーチップ表面を覆う一定のバッファースローによる解離期間をとった。この実験計画法の使用、固定化されたモノクローナル抗体に対する $IFN -$ の結合は、1つの抗体結合部位に対して1つの $IFN -$ 分子結合で、1:1の結合と見なすことができる。相互作用のための動力的パラメータは、1:1相互作用のラングミュアフィッティングモデルを使用して計算することができる。

【0194】

精製されたモノクローナル抗体は、 $CM5$ タイプのセンサーチップ上の個々のフローセル中で固定化された。固定化は、1000共鳴単位(RU)の固定化レベルを目指して、標準的なアミンカップリング手順を使用して行なわれた。

【0195】

$HBS - EP$ $pH 7.4$ ($10 mM$ ヘプス、 $150 mM$ $NaCl$ 、 $3 mM$ $EDTA$ および0.05%ポリソルベートP20)を、ランニングバッファおよび組換え $IFN -$ についての希釈剤として使用した。会合(注入)は4分であり、続いて12乃至30分の解離期間をとった。流速は $50 \mu l / 分$ であった。実験は25で行なわれた。すべてフローセルの検出は同時に行なわれた。フローセル#1は固定化された抗体を含有

しておらず、バックグラウンドおよびバルクを引くために使用した。

【0196】

動力学的パラメーターは、1:1ラングミュア結合モデルを使用して、与えられた抗体抗原組み合わせについてのデータの全体的なフィッティングによって計算された。データは動力学的パラメーターの計算の前に物質移動律速について検査された。

【0197】

実験はピアコア3000およびピアコアT100の器機で行なわれた。データは、Biaeval 4.1およびピアコアT100評価ソフトウェアを使用して評価した。

【0198】

得られた動力学的パラメーターは、使用したバッファー中で、および組換え型の抗原でのみ妥当である。

結果

【0199】

親和性を保持してヒト化ACO-1抗体を生成するために、異なるストラテジーを使用して、実施例2、3および7中で記載されるように、多数のヒト化バリエーションを生成した。組換えヒトIFN- γ サブタイプとhzACO-1のバリエーションとの間の相互作用についての動力学的パラメーターは、SPR解析によって得られた。表11中で見られるように、たとえばhzACO-1（実施例2中で記載されるように生成された）が短縮したCDRH2を含有し復帰変異がなくても、マウス抗体の2倍以内のhzACO-1のKDによって示されるように、マウスACO-1と比較して、hzACO-1の親和性は保持されていた。したがって、実施例2中で同定および記載されるように、フレームワーク領域中のヒトからマウスACO-1へのそれ以上復帰変異は、ヒト化のために必要とされなかった。さらに、hzACO-1抗体のIFN- γ サブタイププロフィールは、表2に示されるように保持された。

表11。ACO-1およびhzACO-1バリエーションと組換えIFN- γ Aの相互作用についての動力学的パラメーター。

KDは平衡解離定数であり、kaは会合速度定数であり、kdは解離速度定数である。

【表11】

抗IFN- γ (モノクローナル抗体)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KDモノクローナル抗体/KD hzACO-1
ACO-1	3.09E-09	1.24E+05	3.75E-04	0.60
hzACO-1	4.46E-09	1.24E+05	5.56E-04	1
hzACO-1-L33F	4.86E-09	1.89E+05	9.18E-04	1.17
hzACO-1-S50G	4.94E-09	1.98E+05	9.78E-04	1.19
hzACO-1-T28S	2.97E-09	1.58E+05	4.68E-04	0.63
hzACO-1-N31S	2.20E-09	1.16E+05	2.55E-04	0.61
hzACO-1-I58S	1.93E-08	1.93E+05	3.74E-03	4.09
hzACO-1-S76N	5.07E-09	1.16E+05	5.88E-04	1.09
hzACO-1-T77I	6.79E-09	9.80E+04	6.65E-04	1.46
hzACO-1-A93V	2.16E-09	1.08E+05	2.34E-04	0.60
hzACO-1-T28S,N31S	2.22E-09	1.56E+05	3.45E-04	0.77
hzACO-1-N31S,A93V	1.51E-09	1.59E+05	2.40E-04	0.52
hzACO-1-T28S,A93V	1.66E-09	1.61E+05	2.68E-04	0.69
hzACO-1-T28S,N31S,A93V	1.57E-09	1.85E+05	2.91E-04	0.65

【0200】

従来のCDRグラフトによって生成され、したがって大きなマウスCDRH2を含有するヒト化ACO-1分子(hzACO-1-kabat CDRH2と表記される)と比較した、hzACO-1の、組換えヒトIFN- γ Aとの相互作用についての動力学的

パラメーターは、表 12 にリストされる。示されるように、実施例 2 中で記載されるようにヒト化され、h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 分子よりも短い C D R H 2 を含有する h z A C O - 1 分子の親和性は等しく、実施例 2 中で記載されているヒト化プロセスは、単純な C D R グラフトによって生成されたものと同じくらい優れているが、より多くのヒト配列を有するヒト化バリエーションを生成することを示した。

表 12. h z A C O - 1 および h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 と組換え I F N - A の相互作用についての動力的パラメーター。

K D は平衡解離定数であり、k a は会合速度定数であり、k d は解離速度定数である。

【表 12】

抗 I F N - (モノクローナル抗体)	K D (M)	k a (1 / M s)	k d (1 / s)	K D モノクローナル抗体 / K D h z A C O - 1
hzACO-1	1.9E+09	2.22E+05	4.15E-04	1
hzACO-1-kabat CDRH2	1.7E+09	2.05E+05	3.41E-04	0,9

10

【0201】

さらに、h z A C O - 1 および h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 が、ヒト I F N - の様々なサブタイプに対する結合について同等の動力的パラメーターを有するかどうかを調べるために、選択されたヒト I F N - サブタイプに対して解離比較実験を行った (表 13)。このことは、h z A C O - 1 の親和性は、より短いマウス C D R H 2 配列を有するにもかかわらず、h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 と比較して、すべての試験したサブタイプに対して保持されるようであることを示す。

20

表 13. h z A C O - 1 および h z A C O - 1 - k a b a t C R H 2 と組換えヒト I F N - A の様々なサブタイプとの間の相互作用の解離速度定数 (k d) のそれぞれの比較。

【表 13】

モノクローナル抗体 サブタイプ	h z A C O - 1 k d (1 / s)	h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 k d (1 / s)	h z A C O - 1 / h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 比
I F N - α H 2	4.13E-04	3.28E-04	1,26
I F N - α K	2.89E-04	3.41E-04	0,85
I F N - α 4 b	2.17E-04	1.55E-04	1,40
I F N - α W A	2.91E-04	3.66E-04	0,80

30

【0202】

マウス A C O - 1 抗体の親和性を越えて h z A C O - 1 の親和性を改善を試みるために、I F N - A と A C O - 2 配列に基づく変異を含有する異なる h z A C O - 1 バリエーションとの間のパラメーターの動力学が測定された (表 11)。行なわれた個別の実験において得られたパラメーターを相関させるために、個々の抗体の K D 値を同じ実験における h z A C O - 1 の K D 値に対して正規化し、同じ実験における h z A C O - 1 の K D に対する個々のモノクローナル抗体の K D 値の関係を、カラム「K D モノクローナル抗体 / K D h z A C O - 1」中で示す。

40

【0203】

親和性決定は、A C O 2 に由来するすべての h z A C O - 1 抗体バリエーション (h z A C O - 1 - I 5 8 S 以外) の K D 値が低い n M 範囲であることをさらに実証した。K D 値における小さな変化は、大部分は k d の差に関連する。h z A C O - 1 における単一アミノ酸置換の N 3 1 S、A 9 3 V または T 2 8 S およびその組み合わせの導入は、A C O - 1

50

の親和性に類似したレベルまで親和性をわずかに増加させた。h z A C O - 1 - I 5 8 S 変異は k d 値に対して顕著な負の効果があり、h z A C O - 1 / I F N - A 複合体の安定性についてのこの特定のアミノ酸が重要であることを実証する。

【 0 2 0 4 】

h z A C O - 1 F a b / I F N - 8 結晶構造に基づいて、親和性をなおさらに増加させるために、多数のアミノ酸置換を h z A C O - 1 中に導入した（実施例 7 を参照）。これらのうちの、2 つの単一置換（軽鎖の Y 3 2 E および重鎖の T 3 0 R）は親和性に有意な正の効果をもたらし（表 1 4）、I F N - A に対する親和性をそれぞれ約 2 倍および約 6 倍増加させた。顕著なことに、2 つの変異を組み合わせること（Y 3 2 E および T 3 0 R の両方を含有する h z A C O - 1 コンストラクト）によって、I F N - A に対する親和性の約 1 0 倍の増加が観察された（表 1 5）。

表 1 4。h z A C O - 1 および h z A C O - 1 バリエーションと組換え I F N - A の相互作用についてのそれぞれの動力的パラメーター。

K D は平衡解離定数であり、k a は会合速度定数であり、k d は解離速度定数である。

【表 1 4】

モノクローナル抗体	K D (M)	k a (1 / M s)	k d (1 / s)	K D モノクローナル抗体 / K D h z A C O - 1
hzACO-1	3.20E-09	1.39E+05	4.43E-04	1
hzACO-1 LC Y 32E	1.54E-09	2.47E+05	3.81E-04	0.5
hzACO-1 HC T 30R	5.40E-10	1.31E+05	7.08E-05	0.16

表 1 5。h z A C O - 1 および h z A C O - 1 Y 3 2 E , T 3 0 R と組換え I F N - A の相互作用についてのそれぞれの動力的パラメーター。

K D は平衡解離定数であり、k a は会合速度定数であり、k d は解離速度定数である。

【表 1 5】

モノクローナル抗体	K D (M)	k a (1 / M s)	k d (1 / s)	K D モノクローナル抗体 / K D h z A C O - 1
hzACO-1	2.72E-09	1.78E+05	4.85E-04	1
hzACO-1 Y32E,T30R	2.97E-10	1.49E+05	4.43E-05	0.1

【 0 2 0 5 】

合理的デザインアプローチに基づいて生成された h z A C O - 1 Y 3 2 E , T 3 0 R コンストラクトは、I F N - 1 に結合しないが試験された残りのサブタイプに結合するので、I F N - サブタイププロファイルを保持していることを、表 1 6 中の動力学データは例証する。Y 3 2 E、T 3 0 R 変異によって引き起こされた動力的パラメーターに対する効果が、ヒト I F N - の様々なサブタイプへの結合に反映されることを検証するために、選択されたヒト I F N - サブタイプに対して解離比較実験を行なった（表 1 6）。二重変異 h z A C O - 1 コンストラクトの示唆された変異は I F N - 8 の構造に基づいていたが、予測外に、すべての試験されたヒト I F N - サブタイプについて、6 ~ 6 4 倍の間で変動する解離速度の改善が観察された。

表 1 6。h z A C O - 1 および h z A C O - 1 Y 3 2 E , T 3 0 R と組換えヒト I F N - の様々なサブタイプとの間で相互作用の解離速度定数 (k d) のそれぞれの比較。

【表 16】

モノクローナル抗体	h z A C O - 1	h z A C O - 1 Y 3 2 E, T 3 0 R	h z A C O - 1 / h z A C O - 1 Y 3 2 E, T 3 0 R
サブタイプ	k d (1 / s)	k d (1 / s)	比
IFN- α A	6.24E-04	6.85E-05	9, 1
IFN- α I	結合なし	結合なし	-
IFN- α 4b	1.12E-03	1.74E-05	64, 4
IFN- α I	1.55E-03	3.15E-05	49, 2
IFN- α J1	4.54E-03	1.95E-04	23, 3
IFN- α WA	2.47E-03	4.05E-04	6, 1

10

実施例 9 - C P E 分析における h z A C O - 1 コンストラクトの解析

【0206】

この実施例は、h z A C O - 1 が、I F N - 1 および I F N - D (h z A C O - 1 によって影響されなかった) の保護的效果以外の、試験されたすべて I F N - サブタイプの保護的效果を阻害できたことを示す。

材料および方法

【0207】

使用されるこの抗 I F N - 中和分析は、A 5 4 9 細胞に対する E C M ウイルスの細胞溶解効果に基づく。すべての I F N - サブタイプは、A 5 4 9 細胞における E C M ウイルス複製を阻害することができ、細胞生存をもたらし、それは細胞内 D N A 染色として測定することができる。異なる I F N - サブタイプに対する抗 I F N - 抗体の中和効果は、細胞内 D N A 染色の減少 (細胞溶解の増加に対応する) によって測定することができる。

20

【0208】

分析は 9 6 ウェルを持つプレート (ヌンク (N u n c) 社、カタログ番号 1 6 7 0 0 8) 中で行ない、各々のウェルは 2 0 0 μ L の最終体積を含有していた。すべての I F N - 調製物は P B L バイオメディカル・ラボラトリー社、ニュージャージー、アメリカからであった。

30

【0209】

各々のウェルに、それぞれ体積 5 0 μ L の 4 つの溶液 (I F N - 、 h z A C O - 1 、細胞およびウイルス) を加えた。すべての溶液は、1 0 % F C S 含有 F 1 2 K a i g h n 培地 (ギブコ社、カタログ番号 2 1 1 2 7) 中で調製した。各々の I F N - サブタイプの特異的濃度 (表 1 7 に以下にリストされた) は、従来の研究に由来した。例えば、マウス抗体の A C O - 1 . 5 . 2 および A C O - 2 . 2 . の使用から得られた既存のデータに基づいて、分析において使用される抗体濃度は選択された。

【0210】

各々の I F N - サブタイプは、h z A C O - 1 と共に、3 7 $^{\circ}$ C 、 5 % C O ₂ で 2 時間ブレインキュベーションした。抗インターフェロン抗体を表 1 7 中で以下で示されるように希釈した。I F N - との抗体のブレインキュベーション後に、5 0 μ L の細胞溶液 (3 0 0 0 0 0 細胞 / m L) を加えて 1 5 0 0 0 細胞 / ウェルを得た。3 7 $^{\circ}$ C 、 5 % C O ₂ で 4 . 5 時間のインキュベーション後に、1 0 \times 1 0 ⁻³ T C I D ₅₀ の濃度で 5 0 μ L の E C M ウイルスを加え、続いて 3 7 $^{\circ}$ C 、 5 % C O ₂ で 4 8 時間インキュベーションを行なった。

40

【0211】

続いて上清を注意深く除去し、5 0 μ L のクリスタルバイオレット溶液 (0 . 5 % クリスタルバイオレット、2 5 % メタノール) を加えた。室温で 1 5 分のインキュベーション後に、ウェルを水で洗浄し、一晩で乾燥させた。

【0212】

50

次いで、乾燥したプレートに、純粋なメタノールを200 μ L / ウェルで15分間加えて細胞からクリスタルバイオレットを抽出した。抽出後に、100 μ Lの上清を、新しい96ウェルのプレート（ヌンク社、カタログ番号256510）に注意深く移し、100 μ Lのミリ-Q水を各々のウェルに加えた。次いでプレートを590 nmでELISAリーダーで測定した。

【0213】

ELISAリーダーから回収された生データを、解析の前にメタノールおよびプレートバックグラウンドで補正した。

表17。CPE分析パラメーター。

【表17】

IFN α サブタイプ	[IFN α] (pg/ μ L) *	[hZACO-1] (ng/mL)
IFN- α A	1,25x 10 ⁻¹	2.500->0
IFN- α 2	3,125x 10 ⁻²	2.500->0
IFN- α F	6,25x 10 ⁻²	2.500->0
IFN- α K	6,25x 10 ⁻²	2.500->0
IFN- α WA	6,25x 10 ⁻²	2.500->0
IFN- α B2	2,5x 10 ⁻²	2.500->0
IFN- α H2	1,25x 10 ⁻¹	2.500->0
IFN- α I	5,0x 10 ⁻²	2.500->0
IFN- α J1	1,0x 10 ⁻¹	2.500->0
IFN- α 4a	2,5x 10 ⁻¹	250->0
IFN- α C	2,5x 10 ⁻²	250->0
IFN- α G	2,5x 10 ⁻¹	250->0
IFN- α 4b	1,25x 10 ⁻¹	250->0
IFN- α D	3,75	50.000->0
IFN- α 1	1,0	50.000->0

結果および考察

【0214】

分析において観察された細胞変性効果が、抗体および/またはIFN- α の細胞毒性によって引き起こされるのではなく、そしてウイルスに対する細胞のIFN- α 保護の欠損が細胞変性効果を引き起こすのではないことを保証するために、異なる6つの対照（細胞、細胞+抗体、細胞+IFN- α 、細胞+抗体+IFN- α 、細胞+ウイルス、および細胞+IFN- α +ウイルス）を研究におけるすべてプレートで使用した。対照において、有意な細胞毒性効果は分析で観察されず、細胞変性効果の兆候はどんなインターフェロンのレベルでもなかった。

【0215】

図4中で示されるように、このCPE分析は、hZACO-1によってほとんどすべてのインターフェロンサブタイプの保護的効果を阻害できることを示した。しかしながら、IFN- α DおよびIFN- α 1の保護的効果は、50000 ng/mLの抗体濃度のhZACO-1によってさえ阻害されなかった。したがって、マウスACO-1の特異性はhZACO-1コンストラクトにおいて保持されていた。

実施例10 - レポーター遺伝子（RG）生物検定におけるACOに由来する抗体の解析

【0216】

ルシフェラーゼベースのレポーター遺伝子分析を、hZACO-1抗体バリエーションが組換えIFN- α サブタイプの生物学的活性を中和する能力を評価するために利用した。

材料

【0217】

「完全」ダルベッコ変法イーグル培地（フェノールレッド＋１０％ＦＣＳ＋２ｍＭ Ｌ－グルタミン＋ペニシリン＋ストレプトマイシン＋２－メルカプトエタノールを含むＤＭＥＭ）、ヌンク社９６ウェルオブティカルボトムプレート（黒色、組織培養用処理）、１ｍＭ Ca^{2+} および１ｍＭ Mg^{2+} を含むＰＢＳ、ステディー・グロー（Ｓｔｅａｄｙ－Ｇｌｏ）ルシフェラーゼ分析システム（プロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）社）。

【０２１８】

９３Ｄ７細胞株は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を駆動するＭ×プロモーターを保有するＩＦＮ誘導可能コンストラクトによるＡ５４９細胞株（ＣＬＬ－１８５、ＡＴＣＣ）の安定したトランスフェクションに由来する。Ｍ×プロモーターは、ｐＳＰ６４－Ｍ×ｐ（ＰｓｔＩ－ＰｖｕＩＩ）－ｒ ｇ ｌ ｏから切り取られたマウスＭ×ＡプロモーターおよびＩＦＮ応答エレメントを含有する１．６ｋｂのＢａｍＨＩ断片からなる（Ｌleonart e t al. (1990) Biotechnology 8: 1263-1267）。

10

【０２１９】

使用するＩＦＮ－サブタイプ（すべて、ＰＢＬバイオメディカル・ラボラトリーズ社、ニュージャージー、アメリカから）を、図５中にリストする。

方法

【０２２０】

ＲＧ分析は、不透明なヌンク社９６ウェルオブティカルボトムプレート中で、四重のウェルで行なった。すべての分析について、陽性対照のＩＦＮに加えて、非刺激細胞を含有する陰性対照ウェル、およびＩＦＮ刺激の非存在下において抗体により処理された細胞が含まれていた。

20

【０２２１】

具体的には、接着した９３Ｄ７細胞は、培養培地を除去し、ＰＢＳにより一回洗浄し、トリプシン処理することによって、フラスコから採取した。トリプシン処理は完全ＤＭＥＭを使用して停止した。細胞をカウントし、完全ＤＭＥＭ中で６００，０００／ｍｌに調整した。

【０２２２】

精製された抗ＩＦＮ－モノクローナル抗体を、３７＋５％のＣＯ₂で全体積１００μｌの完全ＤＭＥＭ中で１時間組換えＩＦＮサブタイプと共に、ブレインキュベーションした。抗体－ＩＦＮのインキュベーションに続いて、５０μｌの９３Ｄ７細胞を加え、３７＋５％ＣＯ₂で５時間インキュベーションした。

30

【０２２３】

組換えＩＦＮ亜種によるＭ×Ａ駆動ルシフェラーゼ誘導について分析するために、ＩＦＮの濃度は、各々のウェル中に１００μｌで入れる量を含有するように調整された。１００μｌのＩＦＮを四重のウェルの中に入れ、３７＋５％のＣＯ₂で１時間インキュベーションした。続いて、５０μｌの細胞を加え、インキュベーションをさらに５時間継続した。

【０２２４】

精製されたモノクローナル抗体を使用して、組換えＩＦＮ亜種によるＭ×Ａ駆動ルシフェラーゼ誘導の阻害について分析するために、５０μｌの組換えＩＦＮの所望の希釈物を１ウェルあたり加えた。次いで、完全ＤＭＥＭ中で希釈した５０μｌの抗体をウェルに加え、３７＋５％のＣＯ₂で１時間インキュベーションした。このインキュベーション後に、細胞を加え、インキュベーションをさらに５時間継続した。

40

【０２２５】

５時間のインキュベーション後に、マルチチャンネルピペットを使用して、培地を細胞から注意深く除去した。次に、粘着性の黒いブロッカーを９６ウェルプレートのボトムに添付した。１００μｌの Ca^{2+} および Mg^{2+} イオン含有ＰＢＳを各々のウェルに追加した。１００μｌの再構成したステディー・グロー試薬は、各々のウェルに加え、各々のウェルにおける内容物が完全に混合されたことを確かめた。プレートを透明な粘着性のストリップにより密封した。暗所における室温での５分のインキュベーションに続いて、トップ

50

カウント (Top count) ルミネッセンス・カウンター (パーキン・エルマー (Perkin Elmer) 社) で発光を読み取った。

【0226】

抗体により発揮されたIFN誘導性 (MxA駆動性) ルシフェラーゼ活性に対する阻害の程度の計算のために、様々なIFN-サブタイプの抗体阻害を比較する場合、抗体の非存在下における活性レベルに対してカウントを正規化し、この値を100%に設定した。複数の単一のIFN-の抗体のバリエーション型の阻害の比較のために、データは未加工のルシフェラーゼカウントとして示される。EC50、および分析においてプラトーが達成されるIFN濃度を決定するために、IFNは、抗体の非存在下において最初にタイトレーションされた。抗体阻害のために試験する場合、ルシフェラーゼの堅実な誘導に加えて、分析における飽和未満レベルでの作動の両方を保証するために、一般的にはIFNは最大刺激レベルの80%で使用された。プリズム (グラフパッド・ソフトウェア社 (GraphPad Software, Inc.))、サンディエゴ) ソフトウェアを計算およびデータ表示のために使用した。

結果および考察

【0227】

ヒト化されたACO-1コンストラクトは、レポーター遺伝子分析において様々なヒトIFN-サブタイプを阻害する能力について評価された。図5は、hzACO-1抗体によって12のIFN-サブタイプの阻害についての正規化されたデータを示す。抗体の非存在下におけるIFN-刺激を100%に設定したが、モック処理した細胞 (培地のみを与える) を0%に設定した。データポイントを標準誤差と共に示す。曲線はプリズムソフトウェアを使用して、最もフィットしたシグモイド応答曲線として計算された。hzACO-1は、IFN-D以外の試験されたすべてのIFN-の亜種を阻害することができ、したがってマウスACO-1親抗体の特異性は、ヒト化の過程でhzACO-1抗体に保持されていた。阻害は、高い抗体濃度でIFN-活性がバックグラウンドレベルまで減少されたという点で完全であった。様々なIFN-サブタイプの阻害についてのIC50は、この研究において28 ng/ml乃至314 ng/mlにわたった。より高いhzACO-1濃度でさえIFN-Dを阻害することができなかった。

【0228】

図10は、RG分析において、ヒト化されたACO-1 (hzACO-1) に加えて、2つの本明細書のバリエーションに対するマウスACO-1抗体の比較を示す。1つのバリエーションは、完全なCDRH2を保有するヒト化されたACO-1 (hzACO-1-kabat CDRH2と表記される) であるが、hzACO-1は実施例2に記載されるように短いCDRH2により構築された。さらに、図は、実施例7中で記載されるように、合理的デザインを介して複数のIFN-との相互作用について至適化された、別の変異hzACO-1 (hzACO-1-Y32E, T30Rと表記される) を示す。これらの4つの組換えモノクローナル抗体バリエーションを、RG分析において5つの異なる代表的なIFN-サブタイプの阻害に関して比較した。

【0229】

hzACO-1は、実施例8中で報告した観察されたKDによれば、5つのすべてのIFNサブタイプについてマウスACO-1とほとんど同等のIC50値 (定量的に2倍未満のIC50) を示した (相対IC50値についての表18を参照)。ヒト化は、したがって、機能阻害についてはACO-1親抗体の2倍未満の親和性減少で遂行された。結論としては、ACO-1のモノクローナル抗体のヒト化は、複数のIFN-に対して親和性を保持した抗体を産生した。したがって、親和性および力価の両方は、もとのマウスACO-1と比較して、hzACO-1抗体で保持されたと判断され、それ以上の復帰変異は必要とされなかった。

【0230】

実施例2中で記載されるように、一般的な単純なCDRグラフトによるヒト化と比較して、ACO-1のヒト化方法は、CDRH2中に比較的より多くのヒトアミノ酸を持つ

10

20

30

40

50

抗体をもたらした。図10および表18中で示されるように、IFN-サブタイプの中和についてはヒト化されたACO-1で力価の減少をもたらすことが予想できたが、意外にも、hzACO-1およびhzACO-1-kabat CDRH2は、試験したすべてのIFN-サブタイプについて力価が等しいので、これはそうではない。これは、実施例8中で記載されるように、2つのACO-1バリエーションについて報告された親和性と一致している。

表18。hzACO-1バリエーションによるIFN-サブタイプ阻害についてのIC50値。

正規化されたデータ。IC50値は、hzACO-1のIC50値に対して正規化された各々のIFN-種についてであった。したがって、1未満の値は、IFN-活性のhzACO-1による阻害よりも高い力価で阻害する抗体を示すが、反対に1よりも高い値は阻害力価が低いことを示す。

【表18】

モノクローナル抗体バリエーション	hzACO-1に対するIC50値				
	IFN-αA	IFN-αB2	IFN-αF	IFN-αG	IFN-αJ1
hzACO-1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ACO-1	0,60	0,47	0,82	0,56	0,58
hzACO-1 Y32E, T30R	0,03	0,02	0,05	0,06	0,02
hzACO-1-kabat CDRH2	0,95	0,88	0,95	0,78	1,15

【0231】

ACO-2に由来するhzACO-1バリエーションの力価を決定するために、実施例3中で記載されるように、これらをRG分析を使用してhzACO-1に比較した。2つのIFN-亜種(IFN-FおよびIFN-A)を使用して比較を行なった。異なる単一の4つのアミノ酸置換(T28S(すなわち位置28(Kabatに従う)、スレオニンをセリンで置換する)、I58S、N31SおよびA93V)を試験した。

【0232】

I58Sバリエーションは、減少した力価、および恐らくさらに減少した有効性でIFN作用を阻害したが(IFN-A)、T28SおよびN31Sのバリエーションは両方ともhzACO-1の力価に類似した力価を示した。しかしながら、A93V置換のバリエーションは、RG分析において測定されるようにIFN効果の阻害については増加した力価を示した(図6)。異なるIFN-サブタイプ間で置換の効果の差を検出することができたが、傾向はすべての4つの事例で2つの型について同じである。

【0233】

実施例6中の結晶構造を使用する合理的デザインを介して、IFN-への結合を改善するために、実施例7中で記載されるように、2つのアミノ酸を変化させて変異体hzACO-1のHC T30R、LC Y32E(ACO-1 Y32E, T30Rと表記される)を構築した。変異はIFN-8の構造に基づいていたが、図10(A~E)から理解されるように、意外にも、この変異はすべての試験したIFN-の阻害についての力価を増加させた。さらに、表18は、力価の増加量は特異的サブタイプに依存するが、16倍程度乃至最大50倍の力価の改善があることを示す。

【0234】

従って、実施例6中の結晶構造から得られたエピトープ情報は、このエピトープへの改善された結合親和性を持つ他の抗体バリエーションをデザインするために使用することができる。さらに従って、本発明に従うかかるヒト化された抗体バリエーションは、本発明の範囲によって包含される。

実施例11-ヒト化されたACOに由来する抗体のタンパク質特性評価

【0235】

この実施例は、hzACO-1および異なるバリエーションの熱安定性に関する。

材料

【0236】

抗体

ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4のアイソタイプとして発現されたh z A C O - 1

h z A C O - 1 - T 2 8 S

h z A C O - 1 - N 3 1 S

h z A C O - 1 - A 9 3 V

h z A C O - 1 - T 2 8 S - N 3 1 S

【0237】

以下は、研究中の使用されるバッファー（100mM）およびそれらのpH値のリストである。クエン酸/クエン酸ナトリウム、pH3.0および3.5；酢酸ナトリウム、pH4.0、4.5および5.0；ヒスチジン、pH6.0および6.5；イミダゾール、pH7.0；グリシン-グリシンpH8.0、9.0、10.0。

【0238】

以下は、研究中の使用される添加剤のリストおよびそれらの濃度である。NaCl、100mM；ショ糖、0.25M、0.50M；フェノール、0.5%；ツイーン80、0.01%；グリセロール、10%。

サーモフルオロ（thermo fluor）安定性測定

【0239】

10μlの400×サイプロオレンジタンパク質ゲル染色剤5000×濃縮のDMSO中の溶液（インビトロゲン・モレキュラー・プローブス（Invitrogen Molecular Probes）社）、25μlバッファーおよび10μlタンパク質（10μM）を、96ウェルPCRプレート（バイオラッド（Biorad）社）のウェルに追加した。プレートを、マイクロシールBアドヒーズブ・シーラー（Microseal B Adhesive sealer）MSB-1001（バイオラッド社）でシールし、0.5の増加量で25から95でMyiQ単色リアルタイムPCR検出システム（バイオラッド社）中で加熱した。プレートのウェル中の蛍光変化を電荷結合素子（CCD）カメラで同時にモニタリングした。励起および放射のための波長はそれぞれ490nmおよび575nmだった。タンパク質変性移行の中間点温度は、温度の関数の蛍光強度の一次微分最大値として決定された。

【0240】

h z A C O - 1およびバリエーションのサーモフルオログラフは、IgGタンパク質について、2つの主要なドメイン（FcおよびFab）を反映する2つの予想される温度推移を示した。タンパク質は低いpHでの低いTmを示した。pH5.5より上では、移行中間点はむしろ一定であった。

【0241】

添加剤の効果は異なる抗体について同じであった。一般的には、0.5Mのショ糖は最も安定効果を有していたが、NaCl、フェノールおよびツイーン80の添加は、不安定にする効果があるようであった。

【0242】

より低いpH（pH3.5）で、h z A C O - 1と異なるバリエーションとの間で安定性における差が観察された（図7A）。二重変異h z A C O - 1 - T 2 8 S - N 3 1 Sおよび単一の変異h z A C O - 1 - A 9 3 VはこのpHで最も高い安定性を示した。ウイルス不活化工程はpH3.5～4.0でしばしば実行されるので、これは治療抗体産物のための精製プロセスにおいて重要でありえる。より高いpH（pH4.5、5.5；それぞれ図7Bおよび7C）で、この安定性の差は減少した。

溶液安定性の研究

【0243】

15mMヒスチジン（pH6.5）、20mg/mlショ糖および0.01%ツイーン

10

20

30

40

50

80中のh z A C O - 1 - I g G 4、h z A C O - 1 - I g G 1およびh z A C O - 1 - I g G 2の溶液を40 でインキュベーションし、サンプルは、最初におよび5週間後に解析のために採取した。h z A C O - 1のインタクトなタンパク質、可溶性凝集物および/または断片の分布をサイズ排除クロマトグラフィー (S E C - H P L C) を使用して決定した。高速液体クロマトグラフィー (H P L C) システムモデルの1100または1200の液体クロマトグラフィーシステム (アジレント・テクノロジー (A g i l e n t T e c h n o l o g i e s) 社、パロアルト、カリフォルニア) を、0.8 mL / 分の流速で、pH 7.2を使用して、移動相としてリン酸緩衝食塩水 (P B S) で、B I O S E P S E C 3000 (フェノメネクス (P h e n o m e n e x) 社) カラムと共に使用した。タンパク質は215 nmでODをモニタリングすることによって検出された。全タンパク質領域における各々のピークのパーセンテージを計算した。

10

【0244】

h z A C O - 1 - アイソタイプの形成された高分子量型の量は、図11中で示され、I g G 4コンストラクトはインキュベーションの間に凝集物形成を示さなかったが、I g G 1およびI g G 2の両方のアイソタイプは高分子量バリエーションを形成したことを明白に示す。

【0245】

さらに、h z A C O - 1 - I g G 1バリエーションはインキュベーション後に低分子量断片を示した。断片の量は1.3%だった。

【0246】

20

したがって、安定性の観点から見て、h z A C O - 1 I g G 4は、対応するI g G 2抗体およびI g G 1抗体よりも魅力的な治療用分子である。

実施例12 - A D C C 解析。

【0247】

実施例6において記載されるように、本明細書のA C O - 1モノクローナル抗体およびヒト化されたバージョンは、I型インターフェロン 受容体サブユニット1 (I F N A R 1) へのI F N - の結合を阻害することによって、I F N - の活性をブロックすることができる。したがって、ヒト化された治療用A C O - 1モノクローナル抗体は、細胞表面に結合し、抗体、I F N - およびI F N A R 2からなる複合体を作りうる。これは、抗体依存性細胞性細胞傷害 (A D C C) を誘導するA C O - 1のリスクを高める。

30

【0248】

そのために、A D C C実験を行なって、I F N - 2Aの存在下においてI g G 4サブタイプとして発現させたh z A C O - 1抗体の能力を評価した。

材料および方法。

【0249】

ラジ (R a j i) 細胞 (ヒトB細胞株 (A T C C 番号C C L - 86)) を標的細胞として使用した。ラジ細胞を、10%ウシ胎仔血清、10 mMヘペス、1 mMピルビン酸ナトリウム、1 mMグルタミン、2.5 g / l グルコースおよび1%ペニシリン/ストربتマイシンで補足されたR P M I 1640中で培養した。高精製したインターフェロン - 2Aを分析のために使用した。タンパク質は、使用の前に生物学的活性についてレポーター遺伝子分析において試験された。ラジ細胞 (B細胞表面抗原C D - 20を発現するB細胞株) を使用する場合、リツキサン (登録商標) (ノメコ社 (N o m e c o A / S)、デンマーク) を、A D C Cについての陽性対照として使用した。

40

【0250】

標的細胞を採取し、血球計数器においてカウントした。1.5 x 10⁶細胞を15 mLチューブに移し、遠心分離した。上清を完全に除去し、細胞沈殿を10⁶細胞あたり100 μCiの⁵¹Cr (クロム - 51) 中で再懸濁した (崩壊表に従って体積を調整した)。I F N - による37 での1時間のインキュベーション期間の間に、バイアルを15ごとにタッピングした。続いて細胞を培地 (R P M I 1640、10% F C S) 中で2回洗浄し、分析培地の2 mL培地中で再懸濁した。5000の⁵¹Cr 標識細胞を、96ウェ

50

ルプレート（平底）中に体積 50 μ L でプレATINGした。すべてサンプルを三重で分析した。最大放出および最小放出はエフェクター細胞なしのウェル中で決定された。最大放出：5000 の標的細胞 / ウェル + 1 % のトリトン X - 100。最小放出：5000 の標的細胞 / ウェル。エフェクター細胞は、標準的な技術を使用して、フィコール密度遠心分離によって「バフィーコート」から精製した。新たに単離したヒト P B M C を、段階的な数で各々のウェルに加えた。以下のエフェクター細胞対標的細胞（E : T）の比を使用した。10、20、40 および 80。すべて実験において、h z A C O - 1 は 10 μ g / mL（66 nM）の飽和濃度で試験された。I F N - 2 A は、0.5、2.5、5 および 10 nM で試験された。最終的な分析体積は 200 μ L であった。37 °C での 4 時間のインキュベーション後に、30 μ L の上清をルマプレート（L u m a P l a t e）（商標）に移し、一晩風乾させた。トップカウント N X T（パーキン・エルマー社、アメリカ）で放射能を決定した。データーをグラフプリズム（G r a p h P r i s m）（登録商標）プログラムへと入力し、三重のデーターの平均の毎分放射能数および対応する標準偏差を計算した。

結果。

【0251】

図 12 中で見られるように、I F N - の存在下または非存在下において、I g G 4 として発現された h z A C O - 1 分子について、バックグラウンド（細胞、または I F N - と細胞）より上の A D C C の誘導がないことを観察できた。これとは対照的に、リツキスマブ（R i t u x u m a b）（陽性対照として使用される）は、エフェクター細胞および標的細胞の比（E : T）の異なる比で細胞溶解を誘導した。

実施例 13 - 補体結合 E L I S A 分析。

【0252】

実施例 6 中で記載されるように本明細書の A C O - 1 モノクローナル抗体およびヒト化されたバージョンは、I 型インターフェロン 受容体サブユニット 1（I F N A R 1）への I F N - の結合を阻害することによって、I F N - の活性をブロックすることができる。したがって、ヒト化された治療用 A C O - 1 モノクローナル抗体は細胞表面に結合し、抗体、I F N - および I F N A R 2 からなる複合体を作りうる。これは、補体活性化および補体依存性細胞傷害（C D C）の誘導のリスクを高める。

【0253】

本補体結合研究の目的は、ヒト I g G 4 アイソタイプとして発現された h z A C O - 1 が、h I F N - 上の対応するエピトープへ結合しそれと複合体を形成する場合、古典的補体経路が活性化されるかどうかを試験することだった。これは、C 4 へ抗体の結合を測定する E L I S A の使用によって遂行される。C 4 の結合は、C 1 s が変化し、補体活性化経路が開始したことを示す。一旦 C 4 が結合したならば、血漿からの他の補体成分は、次には、活性化され、結合し、カスケードの次の成分を酵素により切断する。

材料および方法。

【0254】

ストレプトアビジンコートマイクロタイタープレート（236001、ヌンク社）を、E L I S A プレートとして使用した。ピオチン化 h I F N - 2 A を抗原ソースとして使用し、プレートを、洗浄バッファー（10 mM N a 3 P O 4 + 145 mM N a C l + 0.05 % ツイーン 20）中で希釈した 0.25 μ g / mL タンパク質によって 100 μ L / ウェルでコートした。この h I F N - 濃度は、E L I S A における至適のコート濃度であることが示された。プレートを室温で 60 分間穏やかに振盪しながらインキュベーションし、次いで洗浄バッファー中で 5 回洗浄し、プレート中で最後の洗浄のバッファーを 30 分間放置して、プレート上の可能な残りの結合部位をブロックした。バッファーをプレートから廃棄し、洗浄バッファー中で希釈した 100 μ L の h z A C O - 1 モノクローナル抗体はを 1 μ g / mL でプレートに加えた。プレートを緩やかに振盪しながら室温で 60 分間インキュベーションした。プレートを洗浄バッファー中で 5 回洗浄した。ポリクローナルの抗 I g G 4 ポリクローナル抗体を、h z A C O - 1 I g G 4 モノクロー

ナル抗体の架橋によって陽性対照として使用した。抗IgG4ポリクローナル抗体 - モノクローナル抗体を洗浄バッファー中で希釈し、100 µl / ウェルで32 µg / ml乃至32 ng / mlの階段希釈でプレートに加えた。抗IgG4ポリクローナル抗体の異なる2つの精製を使用し、1つは親和性精製した抗体および1つはプロテインA精製した抗体であった。プレートを緩やかに振盪しながら室温で60分間インキュベーションした。プレートを洗浄バッファー中で5回洗浄した。血漿バッファー(0.3 mM Ca²⁺、1 mM Mg²⁺ + 含有PBS)中で1:200に希釈したヒト血漿を100 µl / ウェルで加えた。プレートを緩やかに振盪しながら37 °Cで60分間インキュベーションした。プレートを5回洗浄し、洗浄バッファー中で1:2000に希釈したマウス抗ヒトC4(HYB162-02 + HYB162-04、SSI)の各々を100 µl / ウェルでプレートに追加した。プレートを緩やかに振盪しながら室温で60分間インキュベーションした。プレートを洗浄バッファー中で5回洗浄し、その後洗浄バッファー中で1:1000に希釈したHRPウサギ抗マウスIgG(ダコ(DAKO)社P0260)を100 µl / ウェルで加えた。プレートを5回洗浄し、100 µlのTMB基質をすべてウェルに加えた。インキュベーションの約6分後に、100 µlの4M H₃PO₄をすべてウェルに加えて酵素反応を停止した。ヴィクター(Victor)プレートリーダー(ワラック(Wallac)社)による分光測光法で色を測定した。

結果。

【0255】

ヒトIgG4アイソタイプとして発現させたh2ACO-1は、IFN-γでコートしたプレートを使用するELISAによって、補体成分を結合する能力について試験された。これは、古典的補体活性化経路における成分の1つであるC4への結合の検出によって視覚化された。図13中で示されるように、h2ACO-1 IgG4は補体を固定することができなかった。陽性対照として、ポリクローナルの抗IgG4ポリクローナル抗体はh2ACO-1 IgG4抗体の架橋によって結合を誘導するために使用された。h2ACO-1が抗IgG4のポリクローナル抗体と交差結合するならば、抗IgG4へのC4の明らかな用量依存的結合が検出された。

実施例14 - 抗体アイソタイプの選択。

【0256】

ヒト化されたモノクローナル抗体を発現する場合、ヒト抗体アイソタイプを全長ヒト抗体の発現のために選択する必要がある。中和用抗IFN-γ抗体の作成のために、Fc仲介性エフェクター機能は必要とされない。

【0257】

さらに、ACO-1に由来する抗体はIFN-γ活性を中和することができるが(実施例9および実施例10)、ACO-1抗体バリエーションの結合するエピトープは、実施例6中で記載されるように、IFNAR2受容体サブユニットおよびIFN-γの同時結合を両立することができる。したがって治療用h2ACO-1モノクローナル抗体は可溶性IFN-γサイトカインへ結合するが、実際はこのモノクローナル抗体はIFN-γ / IFNAR2複合体を介して細胞表面へ結合し、Fc仲介性エフェクター機能の動員によって細胞毒性を引き起こしうる。これに加えて、抗IFN-γのモノクローナル抗体のFc部分は、実際は、以下に記載されるように、特定の細胞タイプにおいてIFN-γの中和の代わりに増強をもたらす所望されない生物学的効果を引き起こしうるということが記載されているので、I型IFN(IFN-αおよびIFN-β)に対する抗体について、抗体アイソタイプの選択は特に重要である(Mo11 HP. et al J Immunol 180, 1594-604, 2008)。

【0258】

I型IFNの存在下においてヒトのIFN-αまたはIFN-βに対する抗体は通常は他の細胞タイプにおけるIFN活性を中和し、代わりにIFN-αまたはIFN-βの存在下においてヒト内皮細胞およびPMBCにおけるIFN活性を誘導する。これらの研究において使用される抗体はマウスIgG1アイソタイプであり、ヒトFc受容体へ交差結合することが公知である。IFN活性の誘導は同じ抗体のFabまたはFab2断片では

なくインタクトな抗体でのみ見られ、抗体アイソタイプ対照モノクローナル抗体によるFc受容体の遮断によって阻害されるように思われる。したがって、この現象の分子機構は公知ではないが、これらのモノクローナル抗体がFc部分を介して細胞表面の受容体へ結合することを必要とするように思われる。さらに、この現象は、II型IFN(IFN- γ)に対する抗体としてI型IFNに特異的であるようであり、類似した現象はI型IFN受容体(IFNAR)に対する抗体について観察されない。(Moll HP. et al J Immunol 180, 1594-604, 2008)。

【0259】

要約すると、IFN- γ の中和のための治療用抗IFNモノクローナル抗体の開発のために、Fc仲介性エフェクター機能は必要とされず、実際は、抗IFN- α モノクローナル抗体で処置された患者の特定の細胞タイプにおいて細胞毒性を引き起こすことまたはIFN活性を増強することによって、所望されない生物学的効果を引き起こしうる。それゆえ、エフェクター機能を誘導することができないヒト化されたモノクローナル抗体の生成が重要である。

【0260】

4つの異なるヒト抗体アイソタイプ、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4が存在する。これらのうち、IgG1およびIgG3はFc受容体および補体への結合で最も効率的であり、それゆえ依存性細胞性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)などのFc仲介性エフェクター機能の活性化を引き起こす(Salfeld JG. Biotechnol 25, 1369-1372, 2007)。様々なFc受容体およびC1qの結合を停止する変異は文献において記載されている(Hezareh M. et al J Virol 75, 12161-12168, 2001.; Idusogie EE. Et al. J Immunol 164, 4178-4184, 2000.; Lund J. et al J Immunol., 147:2657-6, 1991.およびChappel et al 1991, Canfield MS et al J Exp Med. 173:1483-91, 1991)。しかしながら、例えばIgG1アイソタイプの選択および複数の変異の組入れは、かかる修飾されたFc領域はヒトにおいて天然に存在しないので、免疫原性をもたらす可能性があり、ヒトにおいてFc部分に対する免疫応答を引き起こしうる。

【0261】

その理由のために、h2ACO-1(抗IFN- γ モノクローナル抗体)は、IgG2およびIgG4のアイソタイプ(両方とも多数の治療用抗体において使用される)の両方で発現された(Salfeld JG. Biotechnol 25, 1369-1372, 2007)。予想外に、IgG4コンストラクトの発現レベルは、産生収率をかなり改善するIgG2 h2ACO-1バリエーション(実施例5)の発現レベルよりも有意に高かった。さらに、IgG2 h2ACO-1分子は凝集する傾向があったが、IgG4バリエーションはその傾向はなかった(実施例11)。凝集は、産生の間に収率を低下させて、保管期間を限定し、免疫原性の増加のために患者における力価減少をもたらすので、このことは薬物開発において深刻な問題と判断される。

【0262】

したがって、実施例12および13においてそれぞれ記載されるように、h2ACO-1 IgG4コンストラクトは、IFN- γ の存在下におけるADCC分析に加えて、補体固定ELISA分析でのさらなる特性評価のために選択された。これらのデータは、h2ACO-1 IgG4分子が所望されない細胞毒性を確かに引き起こすことができないことを確認する。IFN- γ 活性の増強の予想される欠如は、Moll et al 2008において記載されるように、PBMCおよびECにおいても確認することができる。

【0263】

要約すると、h2ACO-1 IgG4分子は、IFN活性の細胞毒性および増強を含むFc仲介性エフェクター機能によって引き起こされる所望されない副作用の誘導なしにIFN- γ を中和することができるので、および安定性がありよく発現される分子であり製造および患者への投与に適切であるので、h2ACO-1 IgG4分子は特に適切な治療用分子であるように思われる。

実施例15 - T細胞エピトープの解析

10

20

30

40

50

【 0 2 6 4 】

免疫原性予測のための標準的な技術に基づいて (De Groot, A.S. and Moise, L. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 10, 332-340, 2007)、ProPred (Singh, H. & Raghava, G.P. ProPred. Bioinformatics. 17, 1236-1237, 2001) によって拡張されたポケットプロフィール法 (Sturniolo, T. et al. Nat. Biotechnol. 17, 555-561, 1999) を使用して、51のHLA-DRB対立遺伝子の中で直線的T細胞エピトープを予測した。この方法は、評価されるタンパク質内の既定の9つの残基長ペプチドが結合することができる対立遺伝子の数を計算する。多くの対立遺伝子を結合する既定のペプチドが非ヒト起原であるならば、これは免疫原性の間接的な測定値として使用することができる。ペプチドがヒト起原であるならば、対応するT細胞の初期の負の選択のために免疫応答は期待されない。

10

【 0 2 6 5 】

h z A C O - 1 のために適用された実際のヒト化手順に対して、全長 h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 を使用するヒト化手順の予測された免疫原性を比較することがこの実施例の目的である。

【 0 2 6 6 】

ProPred アルゴリズムに対する入力配列として、h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 の周囲に加えられた 10 + 10 残基を持つ全長 A C O - 1 C D R _ H 2 A P G Q G L E W M G / E I N P S H G R T I Y N E N F K S / R V T M T R D T S T (C D R _ H 2 _ 全長) を、
同じ領域中の同等の h z A C O - 1 配列
A P G Q G L E W M G / E I N P S H G R T I Y A Q K F Q G / R V T M T R D T S T (C D R _ H 2 _ ヒト)
と共に使用する。

20

【 0 2 6 7 】

C D R _ H 2 _ 全長を通して実行すると、T細胞エピトープ予測は以下の3つのエピトープを与える。W M G E I N P S H (H L A - D R B 対立遺伝子の 4 % に結合する)、I N P S H G R T I (6 %) および F K S R V T M T R (24 %)。C D R _ H 2 _ ヒトについては、最初のマイナーな2つのエピトープは同一であるが、最後の主なエピトープは F Q G R V T M T R (27 %) に変換される。たとえそれがまだT細胞エピトープであっても、それは今や完全にヒト配列であり、推定から、自己反応性のT細胞は胸腺中で負の選択によって削除され、C D R _ H 2 _ 全長中のこの可能な主なエピトープは C D R _ H 2 _ ヒト配列によって除去されている。

30

【 0 2 6 8 】

したがって、h z A C O - 1 は、従来の C D R をグラフトしたヒト化 A C O - 1 よりも免疫原性がないことが予想される。

実施例 16 - C D R 短縮

【 0 2 6 9 】

実施例 2 において記載されるように、マウス A C O - 1 抗体は従来の方法ではない方法によってヒト化された。これは、h z A C O - 1 および I F N - A の三次元モデルに基づいて、パラトープを含むことが予測される残基のマスクをデザインすることである。このヒト化方法の適用は、最適化された h z A C O - 1 C D R _ H 2 配列の 5 個の C 末端アミノ酸を含むペプチドが、対応するヒトフレームワーク配列と同一だったので、単純な C D R グラフトによってヒト化された抗体よりも少ないマウス残基を持つ h z A C O - 1 抗体をもたらした。これとは対照的に、従来の C D R をグラフトしたヒト化抗体 (h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2) 中の対応するペプチド配列は、マウス起原であった。したがって、このヒト化手順は、より多くのヒト配列を持ち、患者において免疫原性をあまり引き起さないヒト化された抗体をもたらした。C D R _ H 2 の配列の解析は、h z A C O - 1 中のマウスアミノ酸残基を減少させることによって、マウスアミノ酸を含有する M H C クラス I I T 細胞エピトープが除去され、完全にヒトと置換されることを明らかにし、それに対して患者は寛容であると予想される。したがって、このことから、h z

40

50

ACO-1 が従来の CDR をグラフトしたヒト化 ACO-1 抗体よりも免疫原性でないと予想されることが確認された。

【0270】

hz ACO-1 抗体の親和性は、実施例 8 中で示されるように、マウス ACO-1 抗体の 2 倍以内に保持された。したがって、それ以上のマウス復帰変異は必要とされなかった。さらに、実施例 8、9 および 10 中で記載されるように、抗体の IFN- γ サブタイププロフィール (IFN- γ 1/D 以外のすべての IFN- γ サブタイプを結合および中和する) は保持された。CDR H2 中により少ないマウスアミノ酸を含有しているにもかかわらず、hz ACO-1 の親和性は、hz ACO-1-kabat CDR H2 抗体 (マウス ACO-1 抗体からの全長マウス CDR H2 を含有する) の親和性および力価と同一であった (それぞれ、実施例 8 および 9)。

10

【0271】

さらに、記載されたヒト化方法の使用による重鎖中の位置 60 ~ 62 における NEN の代わりに配列 A Q K を置換することは、脱アミド化を受けやすい 2 個のアスパラギンを避けるという長所を有する。脱アミド化は、安定性および / または特異性に影響しうるタンパク質の正味電荷を変化させる。配列 A Q K の維持によって、hz ACO-1 の均一性はよりよく保存されるだろう。hz ACO-1 と従来の CDR をグラフトした hz ACO-1-kabat CDR H2 バージョンの比較は、hz ACO-1 は高安定性タンパク質であるが、hz ACO-1-kabat CDR H2 抗体に予想外に凝集する傾向があることを明らかにした (実施例 11)。凝集は、産生の間の低収率、限定された保管期間および免疫原性の増加のために患者における力価減少をもたらしうるので、凝集は薬物開発において深刻な問題と判断される。さらに、hz ACO-1 コンストラクトの発現レベルは予想外に hz ACO-1-kabat CDR H2 バリエーションの発現レベルの 2 倍であった (実施例 5)。

20

【0272】

要約すると、hz ACO-1 IgG4 抗体は、より少ないマウスアミノ酸を持ち、患者において免疫原性をあまり引き起さない治療用抗体をもたらす新規のアプローチによってヒト化された。もとのマウスモノクローナル抗体からのより少ないアミノ酸を含有しているにもかかわらず、このヒト化された抗体は、マウス抗体および従来の CDR グラフトによって生成されたヒト化バージョンと、同等の親和性、力価、および IFN- γ サブタイププロフィールを有していた。さらに、hz ACO-1 抗体は脱アミド化を受けにくく、より高い発現レベルを有する。したがって、hz ACO-1 抗体は、製造および患者への投与に適切な、安定性がありよく発現される分子である。

30

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕ヒトインターフェロン- γ (IFN- γ) を特異的に結合するヒト化抗体またはその抗原結合断片であって、ヒト化抗体が Kabat に従うマウス相補性決定領域 (CDR) よりも少ないドナーアミノ酸残基を含む、マウス抗体の ACO-1 もしくは ACO-2 またはその組み合わせのヒト化バージョンである、ヒト化抗体またはその抗原結合断片。

〔2〕IFN- γ を特異的に結合するヒト化抗体またはその抗原結合断片であって、該抗体が IFN- γ サブタイプの A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b および WA を結合することが可能であるが、サブタイプの 1 または D を結合することが可能ではなく、該抗体が Kabat に従う非ヒト CDR よりも少ないドナーアミノ酸残基を含む、ヒト化抗体またはその抗原結合断片。

40

〔3〕前記 CDR H2 ドナー残基が Kabat 残基 50 ~ 59 を含む、前記〔1〕または〔2〕のいずれか一項に記載の抗体。

〔4〕前記〔1〕~〔3〕のいずれか一項に記載の抗体であって、IFN- γ サブタイプ上で ACO-1 抗体および / または ACO-2 抗体と同じエピトープを競合および / または同じエピトープに結合する抗体。

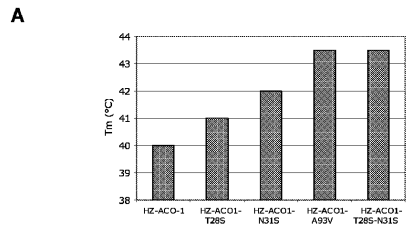
〔5〕前記抗体が IgG4 サブタイプである、前記〔1〕~〔4〕のいずれか一項に記載

50

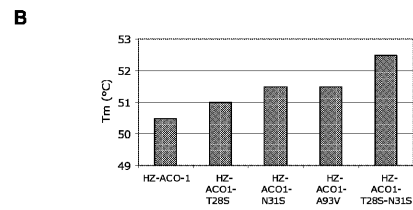
〔 １ ３ 〕 炎症性疾患の処置のために適切な医薬品の調製のための前記〔 １ 〕～〔 ６ 〕および前記〔 ８ 〕のいずれか一項に記載の抗体の使用。

Fig. 2

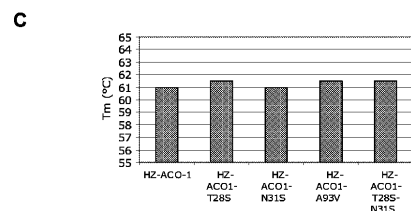
【図 7 A】



【図 7 B】



【図 7 C】



【図 9】



Figure 9

【図 8】

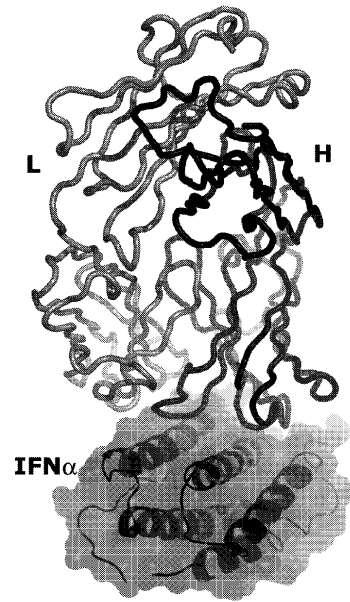


Fig. 8

【図 10】

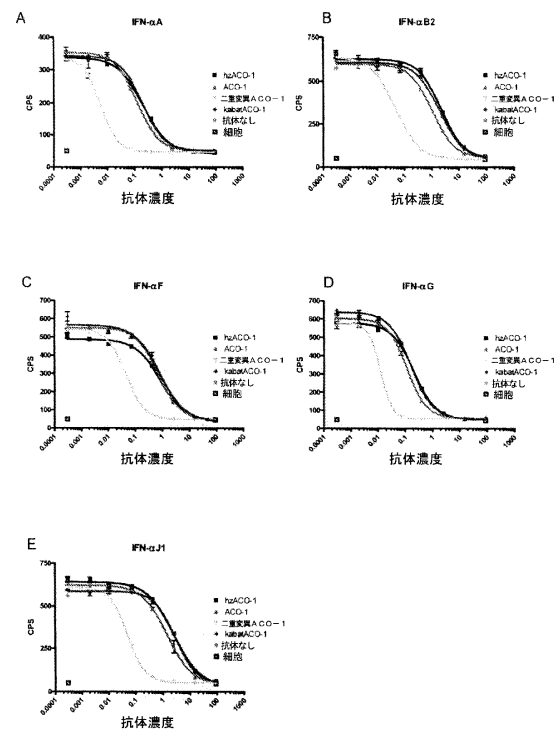


Figure 10

【図 11】

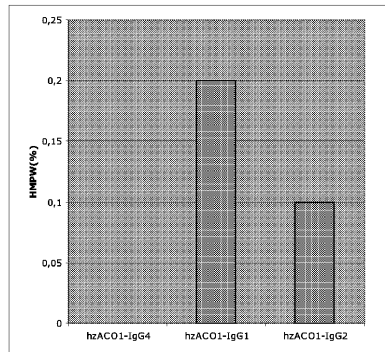


Figure 11

【図 12】

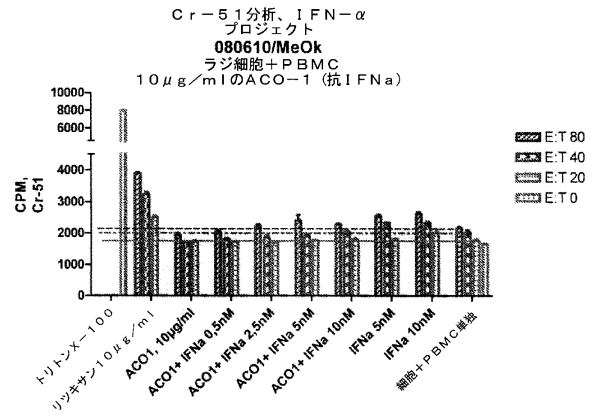


Figure 12

【図 13】

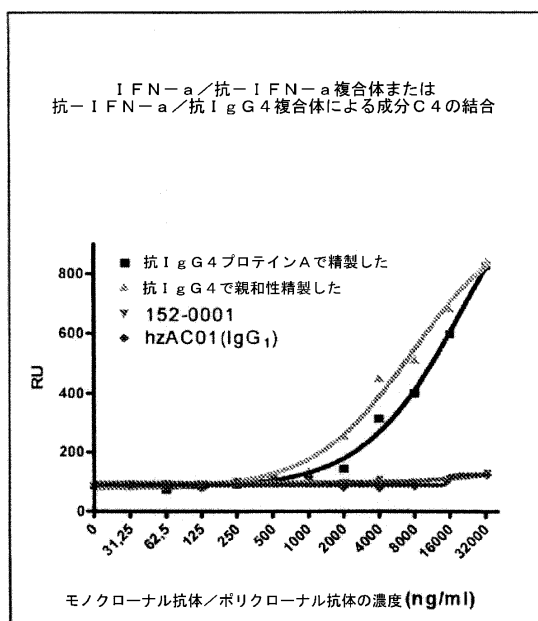


Figure 13

【配列表】

0005766598000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	1/14	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
			A 6 1 P	37/06	

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100136249

弁理士 星野 貴光

(72)発明者 スヴェンソン ラース アンデルス

スウェーデン エス 2 1 7 4 6 マルメ ロスキルデヴェーゲン 1 7 ビー

(72)発明者 パディクヤエル セーレン

デンマーク デーコ 3 5 0 0 ヴェアレーゼ ハレスコフ ローゼン アレ 2

(72)発明者 フリードリッヒセン ビルジット

デンマーク デーコ 2 8 0 0 ゲントフテ アゲルトフテン 1 2

(72)発明者 オルセン クロー ベリット

デンマーク デーコ 2 6 1 0 レードヴル ヴァンドルブヴェイ 5 7

(72)発明者 ルンド ペデルセン インゲル

デンマーク デーコ 2 7 2 0 ヴァンレーゼ ヴァングサーヴェイ 1 0

(72)発明者 フレクナー ヤン

デンマーク デーコ 2 8 8 0 バークスヴァエルド ノヴォ アレー ノヴォ ノルディスク
アクティーゼルスカブ内

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第2006/086586(WO, A1)
特開2007-105043(JP, A)
特表2008-512485(JP, A)
特表2006-506943(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/00 - 19/00

PubMed

UniProt/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq