

(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 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	A
C 07 K 16/24	(2006.01)	C 07 K	16/24	Z N A
C 12 N 15/02	(2006.01)	C 12 N	15/00	C
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P	21/08	
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 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) 國際出願番号 PCT/EP2009/055448
 (87) 國際公開番号 WO2009/135861
 (87) 國際公開日 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 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 311006593
 アーゴス 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 27704 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 賢男
 (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 IFN - α 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 ACO - 1 のヒト化バージョンであり、
 ヒトインターフェロン - α (IFN - α) のサブタイプ A、2、B2、C、F、G、H
 2、I、J1、K、4a、4b および WA 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 15 を含む CDR H1 配列、
- (b) 配列番号 21 を含む CDR H2 配列、
- (c) 配列番号 17 を含む CDR H3 配列、

10

である VH CDR 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 18、

- (ii) 変異 Y32E により配列番号 18 とは異なる配列 (SAGSSVDSSELY)、
 を含む CDR L1 配列、

- (e) 配列番号 19 を含む CDR L2 配列、

- (f) 配列番号 20 を含む CDR L3 配列

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。 10

【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。 20

【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 10】

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 11】

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。 30

【請求項 12】

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 13】

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】

40

50

【技術分野】**【0001】**

本発明は、ヒトイインターフェロン（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に見える。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、WO 20060086586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がヒトスキヤ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、かかる抗体を产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 (h z = ヒト化) のためのマウス A C O - 1 V H 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、K a b a t C D R 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。A C O - 1 V H = 配列番号 : 1 ; ヒト生殖細胞系列の V H 1 _ 4 6 / 10 J H 4 = 配列番号 : 2 ; h z A C O - 1 V H = 配列番号 : 3。

【図1B】ヒト化 (h z = ヒト化) のためのマウス A C O - 1 V L 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、K a b a t C D R 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。A C O - 1 V L = 配列番号 : 4 ; ヒト生殖細胞系列の V K I I I _ L 6 / J K 2 = 配列番号 : 5 ; h z A C O - 1 V L = 配列番号 : 6。

【図2A】A C O - 1 と A C O - 2 との間の V H 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。A C O - 2 V H = 配列番号 : 7 ; マウス生殖細胞系列 J 5 5 8 . 3 3 / D _ / J H 3 _ 1 = 配列番号 : 8。 20

【図2B】A C O - 1 と A C O - 2 との間の V L 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。A C O - 2 V L = 配列番号 : 9 ; マウス生殖細胞系列 a e 4 / J K 4 _ 1 = 配列番号 : 10。

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

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

【図4】C P E 分析中の I F N - D および I F N - 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 h z A C O - 1 阻害を示した図である。

【図5】レポーター遺伝子 (R G) 分析による 12 個の I F N - 種の h z A C O - 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。データーは平均 + / - 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。R 2 値は 0 . 9 8 を超えたすべてのデーター 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 I F N - D を除く)。 30

【図6A】I F N - A を使用する、A C O - 2 に由来する単一変異 A 9 3 V を有する h z A C O - 1 バリアントと h z A C O - 1 の R G 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ー計算を行なった。

【図6B】I F N - F を使用する、A C O - 2 に由来する単一変異 A 9 3 V を有する h z A C O - 1 バリアントと h z A C O - 1 の R G 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ー計算を行なった。 40

【図7A】添加剤なしの、p H 3 . 5 での h z A C O - 1 およびバリアントの移行温度を示した図である。

【図7B】添加剤なしの、p H 4 . 5 での h z A C O - 1 およびバリアントの移行温度を示した図である。

【図7C】添加剤なしの、p H 5 . 5 での h z A C O - 1 およびバリアント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、I F N - 8 に結合した h z A C O - 1 の F a b 断片鎖 (H、L) の構造を示した図である。

【図9】I F N - 8 配列下の着色したボックスによって示されるように、I F N A R 1 および I F N A R 2 についての I F N - 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 IFN - 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 IFN - 8 の上の hzACO - 1 結合エピトープは、IFN - 8 のアミノ酸配列の上に「*」によって示される。

【図10】RG分析において、hzACO - 1 に加えてその2つのバリアントに対してマウスACO - 1モノクローナル抗体を比較した図である。1つのバリアントは完全なCDRH2を保有するヒト化ACO - 1 (hzACO - 1 - kabat CDRH2と表記される)であるが、hzACO - 1 は実施例2において記載されるように短いCDRH2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IFN - との相互作用に最適化した別の変異hzACO - 1 (hzACO - 1 Y32E, T30R)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アントを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。

【図11】ヒトのIgG1、IgG2およびIgG4のアイソタイプで発現されたhzACO - 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、HPLC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、hzACO - 1 IgG4、IFN - およびその異なる組み合わせによるADCの欠如を示す、⁵¹Cr放出分析を示した図である。IFN - pr hzACO - 1なしの細胞 + PBMC単独はバックグラウンド溶解を決定し、トリトン - X100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。

【図13】ELISAによる補体結合の研究を示した図である。IFN - に結合された場合、IgG4として発現されたhzACO - 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、hzACO - 1 は抗IgG4ポリクローナル抗体と交差結合し、抗IgG4に対するC4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SLEなどの例えは狼瘡疾患または障害；移植片対宿主病；1型糖尿病、AIDS、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IFN - に関連する症状または疾患を患有ヒト患者の処置のために適切な特性を持つ抗IFN - 抗体に部分的に基づく。抗体は、典型的にはマウスACO - 1抗体および/またはマウスACO - 2抗体のヒト化バージョンに基づく。

【0011】

13の組換えIFN - サブタイプに加えてウイルス感染の際に產生される2つの複雑なIFNの混合物の生物活性をブロックできるとしてACO - 1およびACO - 2が同定された(WO2006086586を参照)。ACO - 1およびACO - 2は、マイクロアレイ解析によってIFN - シグネチャーを示したSLE患者からの血清の生物活性も一貫してブロックした。ACO - 1およびACO - 2は、IFN - 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、SLE血清のIFN - 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SLEの病因に有意に関与しない可能性がある。

【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、Kabat CDRよりも少ないドナー(マウス)残基を使用してACO - 1およびACO - 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ACO - 1可変領域とACO - 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ACO - 2残基によってヒト化ACO - 1(hzACO - 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がさらに見出された。CDR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

10

20

30

40

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、Kabat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のヒト化バリアントである。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Kabat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体内に点変異をたま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

10

20

30

40

50

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。

【0017】

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	10
D (V a 1 ¹¹⁴)	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 1 a 1 ¹⁴)	1

10

20

30

【0018】

Pestka et al. (1997) 「Interferon Standardization and Designations」 J Interferon Cytokine Res 17: Supplement 1, S9-S14を参照。IFN-B 2 は時には IFN-B もと呼ばれ、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 Biomedical ディカル・ラボラトリーズ (PBL Biomedical Labs) 社、ピスカタウエイ、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。

【0019】

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、抗体バリエント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。

【0020】

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つて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。

【0021】

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、PEG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、PEG化、システイン-PEG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。

10

【0022】

「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。

20

【0023】

「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（CDR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、したがつて所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈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FR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FR残基がヒト免疫グロブリン配列のFR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（Fc）（典型的にはヒト免疫グロブリンのFc）の一部も随意に含むことができる。

30

【0024】

本明細書において使用される場合、用語「超可変領域」は、抗原結合に関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「CDR」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、NIH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。「Kabat位置」、「Kabat残基」および「Kabat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。Kabatナンバリングシステムを使用して、ペプチドの実

40

50

際の直線的アミノ酸配列は、可変ドメインの F R または C D R 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 C D R H 2 の残基の 5 2 後のアミノ酸挿入 (K a b a t に従う残基 5 2 a 、 5 2 b および 5 2 c) 、および重鎖 F R 残基 8 2 の後に挿入された残基 (例えば K a b a t に従う残基 8 2 a 、 8 2 b および 8 2 c など) を含むことができる。残基の K a b a t ナンバリングは、「スタンダード」の K a b a t 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。

【 0 0 2 5 】

「フレームワーク領域」残基または「 F R 」残基は、本明細書において定義されるよう 10 な C D R 以外の V H 残基または V L 残基である。

【 0 0 2 6 】

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。

【 0 0 2 7 】

「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 5 0 % 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 7 0 % 、少なくとも約 8 0 % 、少なくとも約 8 5 % 、少なくとも約 9 0 % 、少なくとも約 9 5 % 、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、 9 8 % 、 9 8 % または 9 9 % の均一性を示す。 20

【 0 0 2 8 】

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 I F N - タンパク質サブタイプの生物活性の少なくとも約 4 0 % 、少なくとも約 5 0 % 、または少なくとも約 6 0 % を選択的に中和するが別の I F N - 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 M x A 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

【 0 0 2 9 】

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 つまたは複数の病徵、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、病徵、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、病徵、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。

【 0 0 3 0 】

語句「 I F N - 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 I F N - 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、 S L E などの狼瘡疾患または障害、移植片対宿主病 (G V H D) 、1型糖尿病、 A I D S (ヒト免疫不全ウイルス (H I V) 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。 I F N - 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 I F N - 抗体

【 0 0 3 1 】

本発明の抗体は、抗 I F N - マウス抗体の A C O - 1 または A C O - 2 のヒト化バージョン、そのバリエント、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 IFN- α 抗体が従来の方法のヒト化 IFN- α 抗体と比較して、有意に改善された収率で産生されうることが判明する。

【 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. Immuno. 1. 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、ACO-1 または ACO-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 IFN- α を特異的に結合する、ヒト化 ACO-1 抗体またはヒト化 ACO-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 ACO-1 抗体 (h z ACO-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 IFN- α 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 WA 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 ACO-1 抗体またはヒト化 ACO-2 抗体は、IFN- α A などの IFN- α 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 KD、約 10^{-8} M 以下の KD、約 5×10^{-9} M 以下の KD、または約 2×10^{-9} M 以下の KD で結合する。1つの実施形態において、ヒト化抗体は、h z 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 A、IFN- α F、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 バリアントである。

表 2。広範囲にわたるヒト IFN- α サブタイプについての h z ACO-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-A タンパク質サブタイプに対する hzACO-1 バリアントの KD と hzACO-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、組換えにより產生された 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-A、IFN-F、および / または別の IFN- タンパク質サブタイプに結合する hzACO-1 バリアントである。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產生された 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-A、IFN-F、および / または別の IFN- タンパク質サブタイプに結合する hzACO-1 バリアントである。
10

【0037】

さらに、本発明のヒト化抗体は、1つまたは複数の IFN- 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 バリアントまたはヒト化 ACO-2 バリアントは、IFN- タンパク質サブタイプの A 、 2 、 B 2 、 C 、 F 、 G 、 H 2 、 I 、 J 1 、 K 、 4 a 、 4 b 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- 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- 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 hzACO-1 の IC50 に同等かまたはそれよりも低い IC50 を有する hzACO-1 バリアントである。特定の実施形態において、hzACO-1 バリアントは、RG 分析において hzACO-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- 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- 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- 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- への結合を競合し、したがって 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 medical 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- 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 hzACO-1 、 hzACO-2 、 hzACO-1 バリアントまたは hzACO-2 バリアントは、Kabat に従うマウス CDR (Kabat 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よりも低い免疫原性を有する。ヒト化抗体の免疫原性は Wadwha 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。

【 0 0 4 0 】

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 A C O - 1 抗体またはヒト化 A C O - 2 抗体は、全長マウス K a b a t 配列を含む従来の方法におけるヒト化 I F N - 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 1 1 で記載されるサーマフロウル (t h e r m a f l o u r) 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。

【 0 0 4 1 】

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) 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 に特異的に結合する； (b) I F N - タンパク質サブタイプの A 、 2 、 B 2 、 C 、 F 、 G 、 H 2 、 I 、 J 1 、 K 、 4 a 、 4 b もしくは W A ；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) I F N - 1 または I F N - D の生物活性を有意に中和しない； (d) I F N - タンパク質サブタイプ上で A C O - 1 および / または A C O - 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) 9 F 3 、 1 3 H 5 、 1 3 H 7 および 7 H 9 のいずれか以上に A C O - 1 または A C O - 2 と競合する； (f) K a b a t に従うマウス C D R を含む h z A C O - 1 抗体または h z A C O - 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 K D で、 I F N - タンパク質サブタイプの A 、 2 、 B 2 、 C 、 F 、 G 、 H 2 、 I 、 J 1 、 K 、 4 a 、 4 b または W A の少なくとも 1 つに結合する。

構造特性

【 0 0 4 2 】

本発明の好ましい抗体はマウスモノクローナル抗体の A C O - 1 および A C O - 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。 A C O - 1 および h z A C O - 1 および A C O - 2 の全長の可変領域および K a b a t C D R 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
VK111_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	EINPSHGRTIYNEN FKS	16
ACO-1 CDR_H3	タンパク質	GGLGPAWFAY	17
ACO-1 CDR_L1	タンパク質	SAGSSVDSSYLY	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	EINPSHGRTIYAQK FQG	21
ACO-2 CDR_H1	タンパク質	SYWMH	22
ACO-2 CDR_H2	タンパク質	EINPSHGRTSYNEN FKS	23
ACO-2 CDR_L1	タンパク質	SAGSSVGSSYFY	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產生されたヒト化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】

10

20

30

40

50

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。CDR H2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。CDR H2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、CDR H2ドナー残基は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CDR H1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CDR H3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CDR L1、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CDR L2、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CDR L3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CDR L1ドナーアミノ酸残基、Kabat残基50~56からなるCDR L2ドナーアミノ酸残基、およびKabat残基89~97からなるCDR L3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中で示す。
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、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CDR_L1配列；配列番号：19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CDR_L1配列；配列番号：19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VK1I1_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CDR_H1配列；配列番

10

20

30

40

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。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Kabat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-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-結合分子を作成するためには「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-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-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、 C D R 2 および / または C D R 3 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 I F N - に結合することができ、その抗原結合特異性が主として C D R 1 領域、 C D R 2 領域および C D R 3 領域によって提供されるならば、本発明の他の抗 I F N - 結合分子を作成するために、 C D R H 1 配列、 H 2 配列、および H 3 配列ならびに C D R L 1 配列、 L 2 配列および L 3 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 C D R H 1 、 H 2 および H 3 ならびに C D R L 1 、 L 2 および L 3 を含有できるが、異なる抗体からの C D R 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」させたかかる抗体の I F N - 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 E L I S A ）。好ましくは、 V H C D R 配列がミックスおよびマッチされる場合、特定の V H 配列からの C D R H 1 配列、 H 2 配列および / または H 3 配列は、構造的に類似した C D R 配列により置換される。同様に、 V L C D R 配列がミックスおよびマッチさせる場合、特定の V L 配列からの C D R L 1 配列、 L 2 配列および / または L 3 配列は、構造的に類似した C D R 配列により好ましくは置換される。例えば、 A C O - 1 および A C O - 2 の C D R 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。
10

【 0 0 5 4 】

したがって、別の態様において、本発明は、(a) 配列番号： 1 5 および 2 2 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む C D R H 1 ；(b) 少なくとも配列番号： 1 6 および 2 3 の残基 1 ~ 1 2 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む C D R H 2 、(c) 配列番号： 1 7 を含む C D R H 3 ；(d) 配列番号： 1 8 および 2 4 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む C D R L 1 ；(e) 配列番号： 1 9 および 2 5 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む C D R L 2 ；ならびに(f) 配列番号： 2 0 を含む C D R L 3 を含み； I F N - 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。
20

【 0 0 5 5 】

好ましい実施形態において、抗体は、(a) 配列番号： 1 5 を含む C D R H 1 ；(b) 少なくとも配列番号： 1 6 の残基 1 ~ 1 2 を含む C D R H 2 ；(c) 配列番号： 1 7 を含む C D R H 3 ；(d) 配列番号： 1 8 を含む C D R L 1 ；(e) 配列番号： 1 9 を含む C D R L 2 ；および(f) 配列番号： 2 0 を含む C D R L 3 を含む。
30

【 0 0 5 6 】

別の好ましい実施形態において、抗体は、(a) 配列番号： 2 2 を含む C D R H 1 ；(b) 少なくとも配列番号： 2 3 の残基 1 ~ 1 2 を含む C D R H 2 ；(c) 配列番号： 1 7 を含む C D R H 3 ；(d) 配列番号： 2 4 を含む C D R L 1 ；(e) 配列番号： 2 5 を含む C D R L 2 ；および(f) 配列番号： 2 0 を含む C D R L 3 を含む。
40

【 0 0 5 7 】

好ましい実施形態において、抗体は、(a) 配列番号： 1 5 を含む C D R H 1 ；(b) 配列番号： 2 1 を含む C D R H 2 ；(c) 配列番号： 1 7 を含む C D R H 3 ；(d) 配列番号： 1 8 を含む C D R L 1 ；(e) 配列番号： 1 9 を含む C D R L 2 ；および(f) 配列番号： 2 0 を含む C D R L 3 を含む。
40

【 0 0 5 8 】

好ましい実施形態において、抗体は、(a) 配列番号： 2 2 を含む C D R H 1 ；(b) 少なくとも配列番号： 1 6 の残基 1 ~ 1 2 を含む C D R H 2 ；(c) 配列番号： 1 7 を含む C D R H 3 ；(d) 配列番号： 1 8 を含む C D R L 1 ；(e) 配列番号： 1 9 を含む C D R L 2 ；および(f) 配列番号： 2 0 を含む C D R L 3 を含む。
50

【 0 0 5 9 】

好ましい実施形態において、抗体は、(a) 配列番号： 1 5 を含む C D R H 1 ；(b) 少なくとも配列番号： 1 6 の残基 1 ~ 1 2 を含む C D R H 2 ；(c) 配列番号： 1 7 を含む C D R H 3 ；(d) 配列番号： 2 4 を含む C D R L 1 ；(e) 配列番号： 1 9 を含む C D R L 2 ；および(f) 配列番号： 2 0 を含む C D R L 3 を含む。
50

【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：25を含むCDRL2；および(f)配列番号：20を含むCDRL3を含む。

ヒト化抗IFN-抗体バリエント

【0061】

典型的には抗体のバリエントまたは誘導体は、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、抗体のバリエントまたは誘導体は、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hzACO-1抗体またはhzACO-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)10⁻⁸M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。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、CDRH1～H3配列を含むVH領域およびCDRL1～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、CDRH1、CDRH2およびCDRH3配列を含む重鎖可変領域ならびにCDRH1、CDRH2およびCDRH3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CDRH1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CDRH2ならびにその保存的修飾物、(c)配列番号：17を含むCDRH3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CDRL1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CDRL2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CDRL3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】

抗体バリエントの機能特性は、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(例えばビアコア、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。hzACO-1 VH(配列番号:3)における例示的な復帰変異は、Kabat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。hzACO-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。hzACO-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。hzACO-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hzACO-1 VHおよびVLのバリアント配列は、本発明のhzACO-1バリアントのライブラリーを作成するために、バリアント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(例えばビアコア、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- α を特異的に結合し、ヒトIFN- α 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- α を特異的に結合し、ヒトIFN- α 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- α を特異的に結合し、ヒトIFN- α 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- α を特異的に結合し、ヒトIFN- α 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

10

20

30

40

50

供する。

【0072】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトIFN- α 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バリアントを提供する。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- α 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。

【0073】

1つの実施形態において、本発明はヒトIFN- α 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バリアントを提供する。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- α 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。

【0074】

1つの実施形態において、本発明はヒトIFN- α 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バリアントを提供する。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- α 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効果の阻害の力値を増加させ、pH3.5および4.5で安定性を増加させた。

【0075】

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

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 バリアントを提供する。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_46 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 58 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 効果の阻害の力値を低下させた。

【 0 0 7 6 】

10

別のタイプのフレームワーク修飾は、T 細胞エピトープを除去し、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 2 0 0 3 0 1 5 3 0 4 3 中にさらに詳細に記載される。

F c 修飾

【 0 0 7 7 】

20

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。

【 0 0 7 8 】

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。

【 0 0 7 9 】

40

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。

【 0 0 8 0 】

50

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 WO 94/29351 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) を介する能力を増加するように、および/または Fcy 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 WO 00/42072 中でさらに説明される。さらに、Fcyl、FcylII、FcylII 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ントが記載されている (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、FcRII 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 FcylII 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

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

10

【 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、III 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 ; WO 2005040219 、ならびに公開済み米国特許出願 20050238646 および 20020161201 中で記載または概説された。

20

【 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。

30

【 0 0 8 5 】

様々な技術は抗体断片の產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。 WO 1993 / 16185 ; 米国特許第 5,571,894 号 ; および米国特許第 5,587,458 号を参照。例えば、抗体断片は、例えば米国特許第 5,641,870 号中で記載されるような「直鎖状抗体」でもりえる。かかる直鎖状抗体断片は单一特異性または二重特異性でありえる。

40

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 】

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。二重特異性抗体を作製する方法は、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產生は、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(ab')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。

【0088】

他の多重特異性分子は、IFN-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產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6,046,310号；米国特許公開番号第20030103984号；ヨーロッパ特許出願第1413316号；米国特許公報番号第20040038339号；von Strandmann et al., *Blood* (2006;107:1955-1962)、およびWO 2004056873を参照。

【0089】

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)。

【0090】

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、次いで互いに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(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、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(SPD 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-カルボキシラート(スルホ-SMCC)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: 2367-2375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SATAおよびスルホ-SMCCであり、両方ともピアース・ケミカル(Pierce Chemical)社(ロックフォード、イリノイ)から利用可能である。

【0091】

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(sulphydryl)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。

【0092】

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×モノクローナル抗体、モノクローナル抗体×Fab、Fab×F(ab')2、またはリガンド×Fab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5,260,203号；米国特許第5,455,030号；米国特許第4,881,175号；米国特許第5,132,405号；米国特許第5,091,513号；米国特許第5,476,786号；

10

20

30

40

50

米国特許第5,013,653号；米国特許第5,258,498号；米国特許第5,482,858号；米国特許出願公報第20030078385号、Kontermann et al. (2005) *Acta Pharmacological Sinica* 26(1):1-9; Kostelný et al. (1992) *J. Immunol.* 148(5):1547-1553; Hollinger et al. (1993) *PNAS (USA)* 90:6444-6448；およびGrubert 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IFN- α 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、ビンカアルカロイド、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、ナイトロジエンマスター、ゲムシタビン、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（マグロウヒル（McGraw Hill）社、2001年）；Pastan et al. (1986) *Cell* 47:641; Goldberg (1994) *Cancer Journal for Clinicians* 44:43；米国特許第6,077,499号を参照；その開示全体は参考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、パラディウム-109、プラセオジム-143、プロメチウム-149、エルビウム-169、イリディアム-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6,000keVの範囲、好ましくは60乃至200keVの範囲、放射体については100~2,500keV、および放射体については4,000~6,000keV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ます。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)プロブ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Upeslakis 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考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ます。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（

10

20

30

30

40

50

I FN - 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。

【 0 1 0 0 】

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ールオキシ - 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 E P 0 154 316 および Ishikawa et al. による E P 0 401 384 を参考する。

抗体の特性評価

【 0 1 0 1 】

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 I FN - 抗体の機能特性を調べることができる。

【 0 1 0 2 】

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

【 0 1 0 3 】

本発明は、I FN - 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。I FN - 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、ウエスタンプロットティング、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。

【 0 1 0 4 】

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 I FN - 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。

【 0 1 0 5 】

かかる分析において、試験抗体がヒト I FN - 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性能力を持つ、IFN-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-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、生物学的特徴および/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-抗体を提供する。1つの例示的な生物学的特徴は、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-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(*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-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-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。

生物学的活性

【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-

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U S 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 × A プロモーターの活性化。IFN- α がM × 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- α 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 × 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 × A プロモーターの活性は、M × 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CC 1 - 1 8 5）を介して入手可能な肺癌細胞株である。M × A（別名M × 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 × A プロモーターの配列および構造は、Gen bank 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 × 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U S 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 × 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 × A（M × 1）プロモーターはGen bank 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Leonart et al. (1990) Biotechnology 8:1263-1267中で開示される。マウスM × 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plaques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、129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、189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157～164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、10～500mg / ml（例えば20～300mg / ml、好ましくは30～100mg / ml、および最も好ましくは50～100mg / 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10.0のpHを有する医薬用製剤を提供することである。製剤は、バッファーシステム、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（グレーヴス病、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髓症（多発性硬化症、特発性脱髓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髓性多発ニューロパシーなど）、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hn病）、セリアック病、グルテン過敏性腸疾患およびウィップル病、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

10

20

30

40

50

、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、TSG-6、リツキサン（登録商標）およびCTL4-Fc融合タンパク質を含む。組合せ療法のさらなる実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- α 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、シリングなどを含んでいる。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ます）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- α 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ます。あるいはまたはさらに、製造品は、静菌注射用水（BWF1）、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液およびデキストロー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、針およびシリングを含む、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- α （IFN- α ）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に関する。

【0121】

第2の態様において、したがって、本発明は、IFN- α 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- α 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に関する。

【0122】

1つの実施形態によれば、CDR H2ドナー残基はKabat残基50～59を含む。別の実施形態において、該抗体は、IFN- α 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。

10

20

30

40

50

【0123】

好ましい実施形態において、抗体は配列番号：21に従うCDRH2配列を含む。

【0124】

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。

【0125】

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。

10

【0126】

第5の態様において、本発明は、IFN- γ に関連するIFN1ammatory疾患(IFN1ammatory 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。

【0127】

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。

20

【実施例】

【0128】

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

【0129】

この実施例は、WO20060086586中で記載される、マウス抗体ACO-1およびACO-2の配列決定および組換え発現に加えて、ACO-2のVH配列およびVL配列のBLAST検索を記載する。

抗体クローニングおよび配列決定

【0130】

30

キアゲン(Qiagen)社からのRNeasy(#634914)を使用して、ハイブリドーマ(ACO-1.5.2およびACO-2.2.1)から全RNAを抽出した。クロンテック(Clonetech)社からのSMART-RACE cDNA增幅キットを使用して1 μ gの全RNAからcDNAを合成した。反応を42度1.5時間実行し、75 μ lのトリシン-EDTA中でサンプルを希釈した。鋳型として5 μ lのcDNAを使用して50 μ lの反応中で標的のPCR增幅を実行した。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、SMART-RACEキット中に含まれるユニバーサルプライマー混合物(UPM)であった。ACO-1重鎖(HC)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

40

5'-CTAACACCTCATTCCTGTTGAAGCTC(配列番号：12)。ACO-2重鎖(HC)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'-CTAGCTAGCTCATTTACCCGGAGACCGGGAGATGG(配列番号：26)および、ACO-2軽鎖(LC)のためのものは、5'-GCTCTAAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTG(配列番号：27)。

【0131】

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

50

/ 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。エチジウムプ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・プラント 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 をクローニングした。

【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 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 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 a t 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 a 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
```

10

30

40

50

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IGg2b 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))

at 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 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 10
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 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

【0140】

ACO-2 VL配列(配列番号:29(シグナルペプチドを含む))

at g g a t t t t c a a g t g c a g a 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 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
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 t t g g a a a t a a a a c g g 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】

Kabat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

マウス A C O - 1 C D R の同定および特性評価

【0144】

Kabat 定義に従う A C O - 1 C D R 配列は以下のとおりであることが見出された。

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 N E N F K S (配列番号 : 1 6)

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)

10

ヒト生殖細胞系列の同定

【0145】

三次元タンパク質構造モデルは、タンパク質データーベースバンク (P D B) : 1 Z 3 G からの構造テンプレートと共に、MOE (モレキュラー・オペレイティング・エンバイロンメント (Molecular Operating Environment); 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 データーベース中の抗体 - 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、A C O - 1 V H の残基 2 3 ~ 3 5 、4 9 ~ 5 8 、9 3 ~ 1 0 2 、および A C O - 1 V L の残基 2 4 ~ 3 4 、4 9 ~ 5 6 、8 9 ~ 9 7 であることが見出された。MOE を使用して、パラトープと相互作用する (疎水性相互作用、水素結合相互作用、電荷相互作用) 残基を同定し、残基の組み合わせのセット (パラトープ + 相互作用する残基) は、図 1 中に示される A C O - 1 のいわゆるマスクとされた。

20

【0146】

A C O - 1 V H および A C O - 1 V L を持つ生殖細胞系列 V データーベースの検索から、以下の可能なフレームワーク铸型を得た (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

【0147】

マスクによる生殖細胞系列データーベースの検索から以下の可能なフレームワーク铸型を得た (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

【0148】

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铸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 A C O - 1 のデザイン

【0149】

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 Kabat C D R 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 Kabat C D R 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)

10

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 20

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ントは、 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。

30

- 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 40

アントのデザイン

【 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

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】

以下のバリエントは、1つまたは複数の至適化されたhzACO-1抗体を得るために同定された。 10

- hzACO-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;
- hzACO-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、hzACO-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。 20

実施例4-ACO-1、ACO-2、hzACO-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hzACO-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-E BNA (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。hzACO-1の可変領域についてのDNA配列は、ジエネアート(Geneart)社、レーゲンスブルク、ドイツに注文した。hzACO-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hzACO-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。

hzACO-1の復帰変異バリエントの生成

【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、hzACO-1 HCコンストラクトおよびhzACO-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(hzACO-1-Kabat CDRH2)を持つhzACO-1のバリエントも、部位特異的変異誘発によって生成された。 40

【0159】

部位特異的変異誘発は、hzACO-1 LC発現ベクターおよびhzACO-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 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バイオテク社、マルティンスリーント、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h_zACO-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h_zACO-1 LCと組み合わせた。

復帰変異を持つ軽鎖バリアント：

h_zACO-1-E1Q

h_zACO-1-L47W

h_zACO-1-I58V

h_zACO-1-F71Y

h_zACO-1-L47W、I58V

復帰変異を持つ重鎖バリアント：

h_zACO-1-V5Q

h_zACO-1-M69L

h_zACO-1-R71V

h_zACO-1-T73K

h_zACO-1-S76I

h_zACO-1-V78A

h_zACO-1-R71V、T73K

h_zACO-1-M69L、R71V、T73K、S76I、V78A

h_zACO-1-Kabat CDRH2

ACO-2ベースのh_zACO-1バリアントの生成

【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、h_zACO-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、h_zACO-1 LC発現ベクターおよびh_zACO-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。

【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バイオテク社、マルティンスリーント、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h_zACO-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h_zACO-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アント：

h_zACO-1-D29G

h_zACO-1-L33F

h_zACO-1-S50G h_zACO-1-D29G、L33F、S50G

ACO-2に由来する変異を持つ重鎖バリアント：

h_zACO-1-T28S

h_zACO-1-N31S

h_zACO-1-I58S

h_zACO-1-S76N

h_zACO-1-T77I

h_zACO-1-A93V

h_zACO-1-N31S、I58S

10

20

30

40

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 】

10 A C O - 1、A C O - 2、h z A C O - 1 および h z A C O - 1 のバリエントは、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、2 5 μ g / m l 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：1 0 1 3 1 - 0 1 9)、0 . 1 % v / v、プルロニック (P l u r o n i c) (登録商標) F - 6 8 (インビトロゲン社カタログ番号：1 2 3 4 7 - 0 1 9) 界面活性剤および1 % v / v ベニシリン - ストレプトマイシン (隨意) (インビトロゲン社カタログ番号 1 5 1 4 0 - 1 2 2) 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) 2 9 3 発現培地 (インビトロゲン社カタログ番号：1 2 3 3 8 - 0 2 6) 中で増殖させた。細胞は、3 7 、8 % C O ₂ および 1 2 5 r p m のインキュベーター振盪機において、0 . 2 ~ 2 \times 1 0 ⁶ 細胞 / m l 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 】

D N A 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 1 0 ⁶ 細胞 / m l であった。1 m l 細胞培養あたり 0 . 5 μ g 軽鎖ベクター D N A + 0 . 5 μ g 重鎖ベクター D N A を使用した。2 9 3 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：1 2 3 4 7 - 0 1 9) を、トランスフェクションされた D N A 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。2 9 3 フェクチン (商標) を 3 0 \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：5 1 9 8 5 - 0 3 4) で希釈し、混合し、室温 (2 3 ~ 2 5) で 5 分間放置した。D N A を全 D N A 1 μ g あたり 3 0 μ l の O p t i - M E M (登録商標) で希釈し、混合し、室温 (2 3 ~ 2 5) で 5 分間放置した。D N A 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 (2 3 ~ 2 5) で 2 5 分間放置した。D N A - 2 9 3 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、3 7 、8 % C O ₂ および 1 2 5 r p m 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 . 2 2 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：4 3 1 0 9 8) 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 つの抗体バリエント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

- 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。各々の抗体バリアントについては、ピペッティングの不正確さからの影響を最小限にするために D N A - 2 9 3 フェクチンのマスター混合物を使用して、3 つの培養 (2 5 m l) 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 (F o r t e B i o) 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 (C e d e x) H i R e s 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。

表 4。発現解析

【表 4】

	発現収率 (m g / L)	標準偏差 (発現収 率)	生存細胞密度 (× 1 0 E 5 細胞 / m l)	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	4 1	0. 9	1 9	0. 2	6 5	2. 1
h z A C O - 1 - K a b a t C D R H 2	2 2	0. 7	1 8	0. 5	6 5	3. 2

10

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 バリアント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 抗体バリアント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 抗体バリアント (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 : 1 6) 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 : 2 1) 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。

h z A C O - 1 の I g G 4 、 I g G 1 および I g G 2 のバリアント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 2 9 3 - 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 2 4 1 P) バリアントおよび 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、上記の発現分析と同様であるが、以下の変化で行なわれた。実験は 5 m l の培

40

50

養において二重で行なった。培養は、37%、8%CO₂および250 rpm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50 ml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、h z A C O - 1 (I g G 1) および h z A C O - 1 (I g G 2) の平均発現レベルは、h z A C O - 1 (I g G 4) 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、h z A C O - 1 可変ドメインおよび I g G 4 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: h z A C O - 1 - F a b との複合体における I F N - 8 の結晶構造

10

【0176】

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 の結晶構造は、X線結晶解析を使用して決定し、3.3 分解能まで精密化した(図8)。

材料および方法

【0177】

I F N - 8 (配列番号: 30のアミノ酸1~166) および h z A C O - 1 F a b (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、I F N - 8 のわずかな過剰量で混合し、複合体をゲル濃過カラムで精製した。タンパク質複合体 h z A C O - 1 - F a b / I F N - 8 を、25 mMヘペスバッファー(pH 7.5) + 25 mM NaClのバッファー中に入れ、5 mg / mlまで濃縮した。複合体は、100 mMヘペスバッファー(pH 7.5)、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。回折データー収集の前に、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。回折データーは、ビームラインBL I 911-3(MAX研究所、ルンド、スウェーデン)で収集した。回折データーは、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(Bailey, 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 h z A C O - 1 F a b の結晶構造は、1.52

30

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(データー不掲載)。それらの三次元座標は、続いて h z A C O - 1 / I F N - 8 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) h z A C O - 1 F a b の可変ドメイン、2) h z A C O - 1 F a b の定常ドメイン、および3) I F N - 8 (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 I F N モデル(タンパク質データーベンク(Berman et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28, 235-242)アクセスコード 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 P 4₁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2000 K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、COOT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、hzACO-1軽鎖の1~215ならびにhzACO-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-10

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、hzACO-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、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。ヒトhzACO-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hzACO-1の残基(パラトープ)は、hzACO-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_a 8

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

配列番号: 32

hzACO-1 LC

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

配列番号: 31

10

20

30

40

50

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

【0182】

図9に示されるように、IFNAR2結合エピトープはh z A C O - 1結合エピトープから離れているが、IFN-8上のh z A C O - 1相互作用エピトープはIFNAR1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IFN-の中和が、IFNAR2ではなくIFNAR1へのIFN-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IFN-/IFNAR2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IFN-/IFNAR1/IFNAR2の形成を阻害することを想定できる。

表5。IFN-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

表6。XDSパッケージのプログラムXSCALEからのX線データー統計

【表 6】

分解能 [Å]	反射数	R 因子			比較	R/σ	R-meas	Rmrgd-F	S_norm/ S_ano
		独立	可能	観測					
10.00	984	353	453	77.9%	4.4%	4.9%	984	18.84	5.4%
6.00	4237	1461	1562	93.5%	6.8%	7.2%	4237	12.45	8.2%
5.00	3922	1343	1411	95.2%	9.7%	10.1%	3922	9.83	11.7%
4.00	8747	3063	3182	96.3%	11.6%	11.9%	8747	8.59	14.0%
3.50	8588	3106	3212	96.7%	24.8%	24.9%	8588	4.43	30.3%
3.45	1102	397	410	96.8%	36.9%	37.8%	1102	3.17	45.0%
3.40	1198	448	464	96.6%	41.8%	41.3%	1198	2.82	52.3%
3.35	1271	468	495	94.5%	56.0%	51.5%	1271	2.33	69.9%
3.30	1317	486	502	96.8%	59.6%	51.2%	1317	2.14	74.9%
total	31366	11125	11691	95.2%	14.1%	14.2%	31366	7.44	17.2%
									6%

表 7。REFMAC プログラムの INFN - 8 : hzACO - 1 - Fab の最後の精密化サイクルからの統計。

【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。		
R値に基づくE S U (A)	ヌル	40
フリーR値に基づくE S U (A)	0.776	
最大尤度に基づくE S U (A)	0.574	
最大尤度に基づいたB値についてのE S U (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 (A)	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 (A**3)	704	0.110	0.200
原子を精密化する一般的な面 (A)	3478	0.007	0.021

10

20

表 8。 I F N - 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 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 < 3.3）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示す。

【表8】

I FN- α 8原子	h z A C O - 1 F a b L原子	距離 (Å)
Leu 118I CB	Tyr 95L CE2	3.78
Leu 118I CG	Tyr 95L CE2	3.68
	Tyr 95L CD2	3.90
	Tyr 95L CG	3.95
	Tyr 95L CE2	3.53
	Tyr 95L CD2	3.21
	Ser 93L O	3.70
	Tyr 95L N	3.96
	Phe 97L CE1	3.62
	Trp 92L O	3.84
	Tyr 95L OH	3.93*
Arg 121I NH2	Tyr 33L OH	3.38
	Tyr 33L OH	3.12
	Tyr 33L CE1	3.75
	Tyr 33L CZ	3.37
	Tyr 33L OH	2.93
	Tyr 33L CZ	3.74
	Tyr 33L OH	3.40
	Tyr 33L OH	3.33
	Tyr 33L OH	3.70
	Tyr 33L OH	3.41*
Gln 125I CG	Trp 92L CH2	3.18
	Tyr 33L CE1	3.80
	Trp 92L CZ2	3.63
	Trp 92L CH2	3.70
	Tyr 35L OH	3.81
	Trp 92L CZ2	3.58
	Tyr 35L OH	3.50*
	Ser 32L O	3.24***
	Ser 51L OG	3.37*
	Tyr 33L CE1	3.94
Arg 126I CD	Tyr 35L OH	3.59*
	Trp 92L CZ2	3.67
	Tyr 33L OH	3.94
	Ser 51L CB	3.80
	Ser 51L OG	3.77
	Ser 32L OG	3.40
	Ser 51L OG	3.90
	Tyr 50L OH	3.90*
Leu 129I CD1		
Leu 129I CD2		
Thr 132I OG1		

表9。I FN- 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 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

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 A C O - 1 F a b H原子	距離 (Å)
Ser 55 I CB	Arg 57 H NH2	3. 58
Ser 55 I OG	Arg 57 H NE	3. 18 ***
	Arg 57 H CZ	3. 30
	Arg 57 H NH2	2. 80 ***
His 58 I CG	His 55 H CD2	3. 73
His 58 I CE1	Asn 52 H ND2	3. 94
	Ser 54 H CB	3. 90
	Ser 54 H OG	3. 79
His 58 I NE2	His 55 H CD2	3. 53
	Ser 54 H CB	3. 60
	Ser 54 H OG	3. 20 ***
His 58 I CD2	His 55 H CD2	3. 19
Glu 59 I CD	Trp 33 H NE1	3. 90
Glu 59 I OE2	Trp 33 H CD1	3. 74
	Trp 33 H NE1	3. 01 ***
Gln 62 I CD	Asn 52 H OD1	3. 44
	Thr 30 H O	3. 71
Gln 62 I OE1	Asn 52 H CG	3. 91
	Asn 52 H OD1	3. 02 ***
	Ser 54 H CB	3. 67
	Thr 30 H C	3. 69
	Thr 30 H O	2. 55 ***
	Asn 31 H CA	3. 87
Gln 62 I NE2	Asn 52 H CG	3. 77
	Asn 52 H OD1	3. 13 ***
	Asn 52 H ND2	3. 95 *
Gln 63 I CD	Leu 101 H CD1	3. 83
Gln 63 I OE1	Leu 101 H CG	3. 87
	Leu 101 H CD1	2. 96
Gln 63 I NE2	Leu 101 H CD2	3. 79
Asn 66 I CG	Asn 31 H O	3. 94
Asn 66 I OD1	Tyr 32 H CE1	3. 54
	Asn 31 H CB	3. 89
	Asn 31 H C	3. 86
	Asn 31 H O	2. 80 ***
	Tyr 32 H CZ	3. 82
Asn 66 I ND2	Asn 31 H OD1	3. 79 *
Glu 97 I CG	Ser 54 H OG	3. 85
Glu 97 I CD	Ser 54 H O	3. 97
	Ser 54 H OG	3. 24
Glu 97 I OE1	Ser 54 H O	3. 54 *
Glu 97 I OE2	Ser 54 H CB	3. 88
	Ser 54 H OG	2. 56 ***

【0183】

【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

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

【0184】

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。

【0185】

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 3 0 R 、h z A C O - 1 L C Y 3 2 E 、および組み合わせの h z A C O - 1 Y 3 2 E , T 3 0 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。

【0186】

L C Y 3 2 E : I F N - 8 の残基 L y s 1 2 2 (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できる。さらに、h z A C O - 1 軽鎖の残基 T y r 3 2 (K a b a t 表記法) の原子 O は、L y s 1 2 2 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 3 2 を変異させることは、I F N - 8 の抗体軽鎖 T y r 3 2 残基と正に荷電した L y s 1 2 2 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

10

20

30

40

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						
Kabat	Res	core	peri	char	hybo	hyp 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、 $1 0 1 \times 1 0 1 \times 1 0 1$ ノードの格子上に 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

10

20

30

40

50

N_{ex} を有し、 $h_z ACO-1$ 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、 $h_z ACO-1$ 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 $h_z ACO-1$ と類似したプロファイルで最も良く結合することが期待される。
10

【0190】

特異的変異 $HC\ T30R$ は、 $h_z ACO-1$ 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($h_z ACO-1\ Y32E, T30R$ 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。
20

実施例8- $h_z ACO-1$ 、 $h_z ACO-1$ バリアントと組換えヒト $IFN-$ サブタイプとの間の相互作用のための動力学的パラメーターの決定。

【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 $h_z ACO-1$ およびそのバリアント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、ビアコア3000およびビアコアT100の器機でSRP解析を行なった。
30

【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フ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学的パラメーターは、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。
40

【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ヘペス、150 mM NaCl、3 mM EDTAおよび0.005%ポリソルベートP20)を、ランニングバッファーおよび組換え $IFN-$ 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 μ 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
50

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ーの全体的なフィッティングによって計算された。データー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】

実験はビアコア3000およびビアコアT100の器機で行なわれた。データーは、Biaeaval 4.1およびビアコア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、多数のヒト化バリアントを生成した。組換えヒトIFN- α サブタイプとhzACO-1のバリアント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CDR H2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- α 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バリアントと組換えIFN- α 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- α (モノクローナル抗体)	KD (M)	ka (1/M s)	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CDR H2を含有するヒト化ACO-1分子(hzACO-1-kabat CDR H2と表記される)と比較した、hzACO-1の、組換えヒトIFN- α との相互作用についての動力学的

10

20

30

40

50

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アント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学的パラメーター。

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 FN-1(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
h z A C O - 1	1.9E+09	2.22E+05	4.15E-04	1
h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2	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 FN - A の様々なサブタイプに対する結合について同等の動力学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 FN - A サブタイプに対して解離比較実験を行なった(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。

表13。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 と組換えヒトI FN - 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	h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2	h z A C O - 1 / h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2
	k d (1/s)	k d (1/s)	比
IFN- α H2	4.13E-04	3.28E-04	1.26
IFN- α K	2.89E-04	3.41E-04	0.85
IFN- α 4b	2.17E-04	1.55E-04	1.40
IFN- α WA	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 の親和性を改善することを試みるために、I FN - 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 バリアント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。

【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 抗体バリアント(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

40

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 变異は 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この特定のアミノ酸が重要であることを実証する。

【0204】

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有し（表 14）、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 10 倍の増加が観察された（表 15）。

表 14。h z A C O - 1 および h z A C O - 1 バリアントと組換え I F N - A の相互作用についてのそれぞれの動力学的パラメーター。

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 14】

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
h z A C O - 1	3.20E-09	1.39E+05	4.43E-04	1
h z A C O - 1 LC Y 32E	1.54E-09	2.47E+05	3.81E-04	0.5
h z A C O - 1 HC T 30R	5.40E-10	1.31E+05	7.08E-05	0.16

表 15。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学的パラメーター。

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 15】

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
h z A C O - 1	2.72E-09	1.78E+05	4.85E-04	1
h z A C O - 1 Y 32E, T 30R	2.97E-10	1.49E+05	4.43E-05	0.1

【0205】

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 - サブタイププロフィールを保持していることを、表 16 中の動力学データーは例証する。Y 3 2 E、T 3 0 R 变異によって引き起こされた動力学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 16）。二重变異 h z A C O - 1 コンストラクトの示唆された变異は 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 ~ 64 倍の間で変動する解離速度の改善が観察された。

表 16。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 サブタイプ	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
	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

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、IFN-1 および IFN-D (h z A C O - 1 によって影響されなかった) の保護的効果以外の、試験されたすべて IFN- サブタイプの保護的効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 IFN- 中和分析は、A 5 4 9 細胞に対する ECM ウィルスの細胞溶解効果に基づく。すべての IFN- サブタイプは、A 5 4 9 細胞における ECM ウィ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 DNA 染色として測定することができる。異なる IFN- サブタイプに対する抗 IFN- 抗体の中和効果は、細胞内 DNA 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。

【0208】

分析は 96 ウェルを持つプレート（ヌンク（Nunc）社、カタログ番号 167008）中で行ない、各々のウェルは 200 μ L の最終体積を含有していた。すべての IFN- 調製物は PBL 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。

【0209】

各々のウェルに、それぞれ体積 50 μ L の 4 つの溶液（IFN-、h z A C O - 1、細胞およびウィルス）を加えた。すべての溶液は、10% FCS 含有 F 1 2 K a i g h n 培地（ギブコ社、カタログ番号 21127）中で調製した。各々の IFN- サブタイプの特異的濃度（表 17 以下にリストされた）は、従来の研究に由來した。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 IFN- サブタイプは、h z A C O - 1 と共に、37、5% CO₂ で 2 時間プ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 17 中で以下で示されるように希釈した。IFN- との抗体のプレインキュベーション後に、50 μ L の細胞溶液（300000 細胞 / mL）を加えて 15000 細胞 / ウェルを得た。37、5% CO₂ で 4.5 時間のインキュベーション後に、10³ . 5 T C I D₅₀ の濃度で 50 μ L の ECM ウィルスを加え、続いて 37、5% CO₂ で 48 時間インキュベーションを行なった。

【0211】

続いて上清を注意深く除去し、50 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、25% メタノール）を加えた。室温で 15 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】

10

20

30

40

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 E L I S A リーダーで測定した。

【0213】

E L I S A 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。C P E 分析パラメーター。

【表 17】

I F N α サブタイプ	[I F N α] (p g / μ L) *	[h z A C O - 1] (n g / 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

10

20

結果および考察

30

【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 I F N - 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 I F N - 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 + I F N - 、細胞 + 抗体 + I F N - 、細胞 + ウィルス、および細胞 + I F N - + ウィルス）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 C P E 分析は、h z A C O - 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、I F N - D および I F N - 1 の保護的効果は、50000 ng / mL の抗体濃度の h z A C O - 1 によってでさえ阻害されなかった。したがって、マウス A C O - 1 の特異性は h z A C O - 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 (R G) 生物検定における A C O に由来する抗体の解析

40

【0216】

ルシフェラーゼベースのレポーター遺伝子分析を、h z A C O - 1 抗体バリエントが組換え I F N 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】

50

「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 + 2 mM 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 ウェルオプティカルボトムプレート（黒色、組織培養用処理）、1 mM Ca²⁺ および 1 mM Mg²⁺ 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（CCL-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-glo 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 1.6 kb の BamHI 断片からなる（Leonart et al. (1990) Biotechnology 8: 1263-1267）。

【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 ウェルオプ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。

【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 100 μl の完全 DMEM 中で 1 時間組換え IFN サブタイプと共に、プ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、50 μl 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。

【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 100 μl で入れる量を含有するように調整された。100 μl の IFN を四重のウェル中に入れ、37 + 5% の CO₂ で 1 時間インキュベーションした。続いて、50 μl 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、50 μl 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 50 μl 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。

【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、粘着性の黒いプロッカーを 96 ウェルプレートのボトムに添付した。100 μl の Ca²⁺ および Mg²⁺ イオン含有 PBS を各々のウェルに追加した。100 μl 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

10

20

30

40

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 - の抗体のバリアント型の阻害の比較のために、データー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 (Graph Pad Software, Inc.)、サンディエゴ) ソフトウェアを計算およびデーター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ーを示す。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。データー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アントに対するマウス ACO - 1 抗体の比較を示す。1 つのバリアントは、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 を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、合理的な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アントを、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產生した。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、CDR H2 中に比較的多くヒトアミノ酸を持つ

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バリアントについて報告された親和性と一致している。

表18。hzACO-1バリアントによるIFN-サブタイプ阻害についてのIC50値。

正規化されたデーター。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アント	hzACO-1に対するIC50値				
	IFN- α A	IFN- α B2	IFN- α F	IFN- α G	IFN- α J1
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バリアント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)で、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バリアントは、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のバリアントは両方ともhzACO-1の力価に類似した力価を示した。しかしながら、A93V置換のバリアントは、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HCT30R、LCY32E(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アント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アントは、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および異なるバリアントの熱安定性に関する。

10

20

30

40

50

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 hzACO-1

hzACO-1-T28S

hzACO-1-N31S

hzACO-1-A93V

hzACO-1-T28S-N31S

【0237】

以下は、研究中の使用されるバッファー (100 mM) 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、pH 3.0 および 3.5；酢酸ナトリウム、pH 4.0、4.5 および 5.0；ヒスチジン、pH 6.0 および 6.5；イミダゾール、pH 7.0；グリシン - グリシン pH 8.0、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、100 mM；ショ糖、0.25 M、0.50 M；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 (thermofluor) 安定性測定

【0239】

10 μl 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)、25 μl バッファー および 10 μl タンパク質 (10 μM) を、96 ウエル PCR プレート (バイオラッド (Bioprad) 社) のウェルに追加した。プレートを、マイクロシール B アドヒージブ・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 490 nm および 575 nm 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】

hzACO-1 およびバリアント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。pH 5.5 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、0.5 M 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 (pH 3.5) で、hzACO-1 と異なるバリアントとの間で安定性における差が観察された (図 7A)。二重変異 hzACO-1-T28S-N31S および単一の変異 hzACO-1-A93V 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 pH 3.5 ~ 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 (pH 4.5、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】

15 mM ヒスチジン (pH 6.5)、20 mg / 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、0.8mL/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(Phenomenex)社)カラムと共に使用した。タンパク質は215nm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つたが、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アントを形成したことを明白に示す。 20

【0245】

さらに、h z A C O - 1 - I g G 1 バリアント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。 20

【0246】

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。 20

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 - 2 A 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 - 8 6))を標的細胞として使用した。ラジ細胞を、10%ウシ胎仔血清、10mMヘペス、1mMピルビン酸ナトリウム、1mMグルタミン、2.5g/1グルコースおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンで補足されたR P M I 1 6 4 0 中で培養した。高精製したインターフェロン-2 A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 - 2 0 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 × 10⁶細胞を15mL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 μ C iの⁵¹C r(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分ごとにタッピングした。続いて細胞を培地(R P M I 1 6 4 0、10%F C S)中で2回洗浄し、分析培地の2mL培地中で再懸濁した。5000の⁵¹C r標識細胞を、96ウェ 50

ルプレート(平底)中に体積50 μ Lでブレーティングした。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PBM 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。IFN-2A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 10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(Lumaplate)(商標)に移し、一晩風乾させた。トップカウントNXT(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(Graph Prism)(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、IFN- の存在下または非存在下において、IgG4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IFN-と細胞)より上のADC 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(Rituxumab)(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。 20

実施例13 - 補体結合ELISA分析。

【0252】

実施例6中で記載されるように本明細書のACO-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(IFNAR1)へのIFN-の結合を阻害することによって、IFN-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ACO-1モノクローナル抗体は細胞表面に結合し、抗体、IFN- およびIFNAR2からなる複合体を作りうる。これは、補体系活性化および補体依存性細胞傷害(CDC)の誘導のリスクを高める。 30

【0253】

本補体結合研究の目的は、ヒトIgG4アイソタイプとして発現されたh z A C O - 1が、h IFN- 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、C4へ抗体の結合を測定するELISAの使用によって遂行される。C4の結合は、C1sが変化し、補体活性化経路が開始したことを示す。一旦C4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プレート(236001、ヌンク社)を、ELISAプレートとして使用した。ビオチン化h IFN-2A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 Na3PO4 + 145 mM NaCl + 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 IFN- 濃度は、ELISA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IgG4ポリクローナル抗体を、h z A C O - 1 IgG4モノクロ- 40

ナル抗体の架橋によって陽性対照として使用した。抗 Ig G 4 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 Ig G 4 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° 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 を希釈した 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 Ig G 4 アイソタイプとして発現させた hzACO-1 は、IFN- α 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、hzACO-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 Ig G 4 ポリクローナル抗体は hzACO-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。hzACO-1 が抗 Ig G 4 のポリクローナル抗体と交差結合するならば、抗 Ig G 4 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- α 抗体の作成のために、Fc 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- α 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 抗体バリアント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- α の同時結合を両立することができる。したがって治療用 hzACO-1 モノクローナル抗体は可溶性 IFN- α 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- α / IFNAR2 複合体を介して細胞表面へ結合し、Fc 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 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 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 (Moll 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 Fc_{ab} または Fc_{ab2} 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、I型 IFN (IFN- α)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- α 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、hzACO-1 (抗 IFN- α 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 hzACO-1 バリアント (実施例 5) の発現レベルよりも有意に高かった。さらに、IgG2 hzACO-1 分子は凝集する傾向があったが、IgG4 バリアント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しうるので、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、hzACO-1 IgG4 コンストラクトは、IFN- α 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。これらのデーターは、hzACO-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- α 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、PBM C 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、hzACO-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- α 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、hzACO-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

【0264】

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. Pro Pred. BioINormatics. 17, 1236-1237, 2001) によって拡張されたポケットプロファイル法 (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

【0265】

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 - kabat CDRH2 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。

【0266】

ProPred アルゴリズムに対する入力配列として、h z A C O - 1 - kabat CDRH2 の周囲に加えられた 10 + 10 残基を持つ全長 A C O - 1 CDR_H2 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 (CDR_H2 _ 全長) を、

同じ領域中の同等の h z A C O - 1 配列

20

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 (CDR_H2 _ ヒト)

と共に使用する。

【0267】

CDR_H2 _ 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。WMGEINPSH (HLA - DRB 対立遺伝子の 4 % に結合する)、INPSHGRTI (6 %) および FKSRVTMTR (24 %)。CDR_H2 _ 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 FQGRVTMTR (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、CDR_H2 _ 全長中のこの可能な主なエピトープは CDR_H2 _ ヒト配列によって除去されている。

30

【0268】

したがって、h z A C O - 1 は、従来の CDR 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 - CDR 短縮

【0269】

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 IFN - 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、至適化された h z A C O - 1 CDR_H2 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 CDR 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 CDR をグラフトしたヒト化抗体 (h z A C O - 1 - kabat CDRH2) 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。CDR_H2 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 MHC クラス II 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

A C O - 1 が従来の C D R をグラフトしたヒト化 A C O - 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。

【 0 2 7 0 】

h z A C O - 1 抗体の親和性は、実施例 8 中で示されるように、マウス A C O - 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 I F N - サブタイププロフィール (I F N - 1 / D 以外のすべての I F N - サブタイプを結合および中和する) は保持された。 C D R H 2 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、h z A C O - 1 の親和性は、h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 抗体 (マウス A C O - 1 抗体からの全長マウス C D R H 2 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

【 0 2 7 1 】

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 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、h z A C O - 1 の均一性はよりよく保存されるだろう。h z A C O - 1 と従来の C D R をグラフトした h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 バージョンの比較は、h z A C O - 1 は高安定性タンパク質であるが、h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 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、h z A C O - 1 コンストラクトの発現レベルは予想外に h z A C O - 1 - k a b a t C D R H 2 バリエントの発現レベルの 2 倍であった (実施例 5) 。

20

【 0 2 7 2 】

要約すると、h z A C O - 1 I g G 4 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 C D R 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 I F N - サブタイププロフィールを有していた。さらに、h z A C O - 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、h z A C O - 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 - (I F N -) 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 K a b a t に従うマウス相補性決定領域 (C D R) よりも少ないドナーアミノ酸残基を含む、マウス抗体の A C O - 1 もしくは A C O - 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] I F N - 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 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 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 を結合することができなく、該抗体が K a b a t に従う非ヒト C D R 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 C D R H 2 ドナー残基が K a b a t 残基 5 0 ~ 5 9 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、 I F N - サブタイプ上で A C O - 1 抗体および / または A C O - 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 I g G 4 サブタイプである、前記 [1] ~ [4] のいずれか一項に記載

50

の抗体。

[6] 前記抗体が配列番号 : 21 に記載の C D R H 2 配列を含む、前記 [1] ~ [5] のいずれか一項に記載の抗体。

[7] 前記 [1] ~ [6] のいずれか一項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けて該抗体を単離することを含む方法。

[8] 前記 [7] に記載の方法によって得られた抗体。

[9] 前記 [1] ~ [6] および前記 [8] のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物。

[10] 賦形剤と抗体またはその断片を混合することを含む、前記[9]に記載の組成物の調製方法。

10

[11] 前記[9]に記載の方法によって得られる組成物。

[12] IFN - に関連する IFN Inflammatory 疾患または障害を防止、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前記 [1] ~ [6] および前記 [8] のいずれか一項に記載の抗体を投与することを含む方法。

[13] 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。

〔図 1 〕

重鎖
 1 2 3 4 5 6
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 QVQLQPGAGELVKPGASVYKSLCKSAGASGYFTNWNH--WVKQRPQGGLWEIINP--SHGRTIYV ACO-1 VH
 YVHLYQSGAEVYKPGASVYKSCASGYFTSIVNH--WVRFQPGQGLWGLINP--SGCTSYV VH1_46
 QVQLQPGAGELVKPGASVYKSCASGYFTNWNH--WVKQRPQGGLWEIINP--SHGRTIYV ACO-1 VH
 7 8 9 10 11
 BNFK3456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 QKFGQRVYTMPTDSTVYMEISSLSSVEDAYVYCAR/ QKFGQRVYTMPTDSTVYMEISSLSSVEDAYVYCAR/GLGPFA
 KPAVWYQGQTLTVWSH VHH1_46/7
 /YDPAVWYQGQTLTVWSH VHH1_46/7
 NYAKWYQGQTLTVWSH h2A01-1

【図2】

B

：生殖細胞系列配列
性細胞超變異

Fig. 1

Fig. 2

【図3】

A

重鎮

B

輕銷

灰色 : hz-ACO2残基へ変異させたACO1中の残基

【 四 4 】

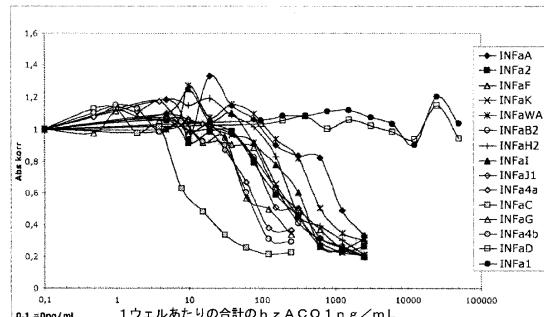


Fig. 4

Fig. 3

【図5】

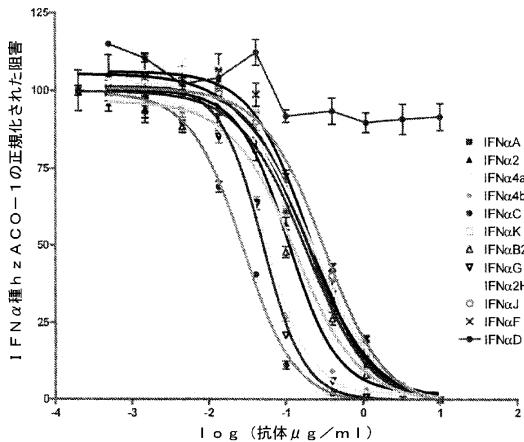
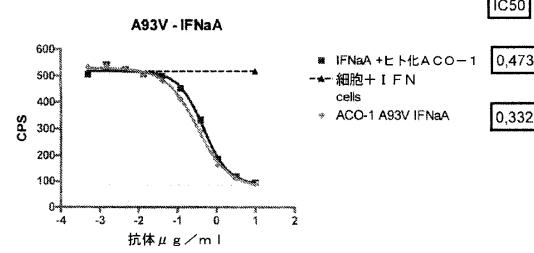


Fig. 5

【 义 6 】

A



8

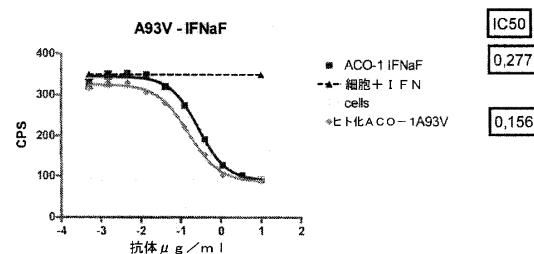
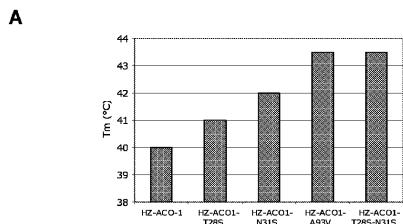
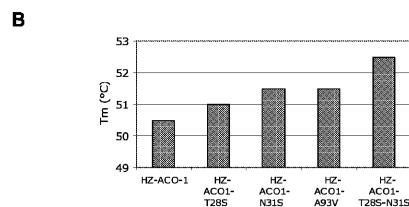


Fig. 6

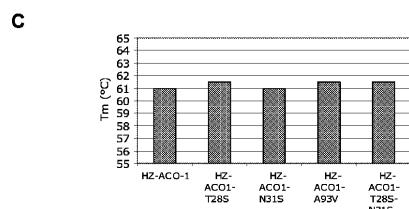
【図 7 A】



【図7B】



【図 7 C】



【 図 8 】

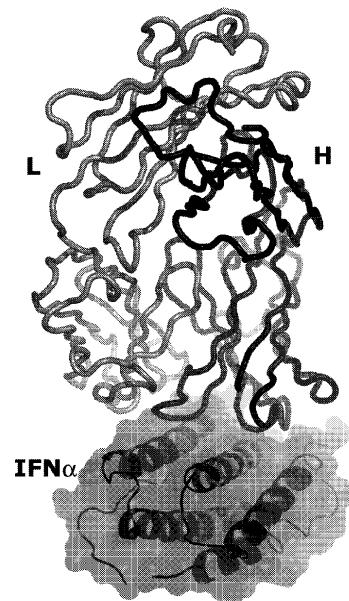


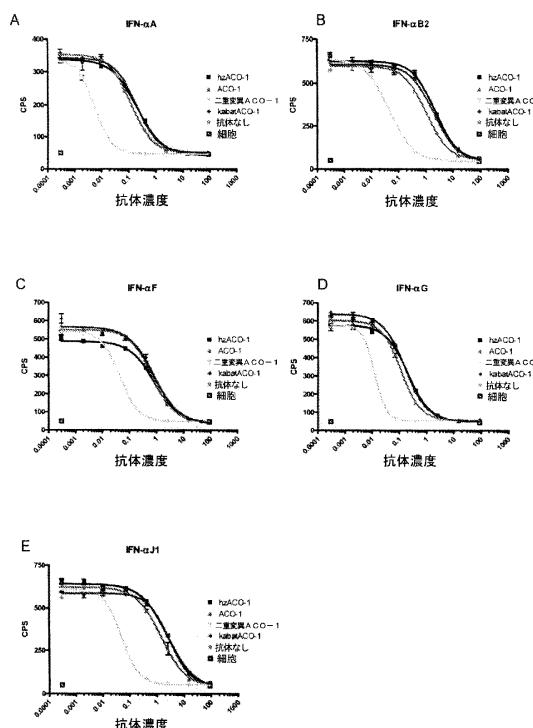
Fig. 8

〔 図 9 〕

1	50
IFN- α 2 (1) CDPQTHSLGSRRTLMLAQMRISLFSCLKDRHDFGFPQSEFGN-PQFK	
IFNAR1	
IFNAR2	
hACO-1	
IFN- α 8 (1) CDPQTHSLGNRRALLIAQMGRISPFSCSLKDRHDFGFPQSEFDKQPKQ	
51	100
IFN- α 2 (50) AETITIVLHEM1QQLPFLNFSKDKSSAAMDFTLLDKFVTELYQQLNDLACAV	
IFNAR1	■■■■■
IFNAR2	■■■■■
hACO-1	*** * *
IFN- α 8 (51) AQAISVLLHEM1QQLPFLNFSKDKSSAALDTLLDEPVYIQLDQQLNLDLCSV	
101	150
IFN- α 2 (100) IQGVGVTETPLMKEDSLAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAEWVRAB1MR	
IFNAR1	■■■■■
IFNAR2	■■■■■
hACO-1	*** * *** * *
IFN- α 8 (101) MQEVGVIESPLMYEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAEWVRAB1MR	
151	166
IFN- α 2 (150) SPSLSTNLQES----	
IFNAR1	
IFNAR2	■
hACO-1	
IFN- α 8 (151) SPSLSTNLQES-----K25E	

Figure 9

〔 図 1 0 〕



Figur 10

【図 1 1】

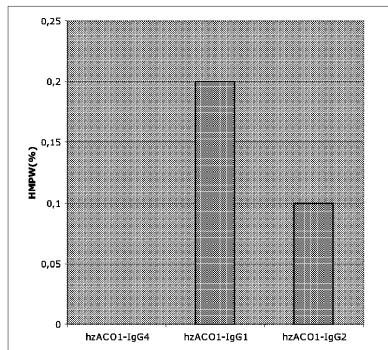


Figure 11

【図 1 2】

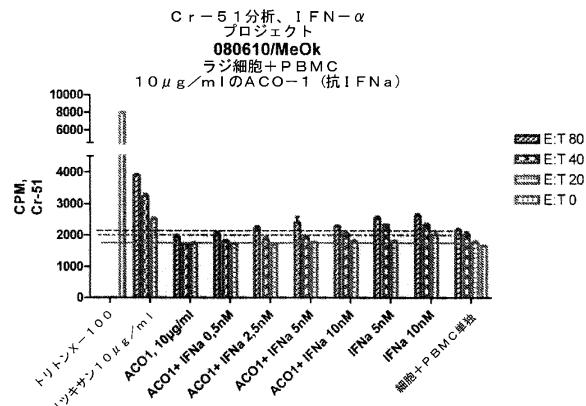


Figure 12

【図 1 3】

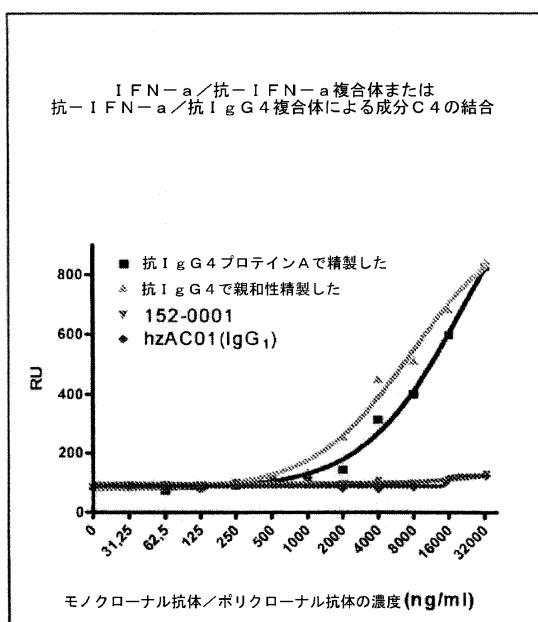


Figure 13

【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	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	37/02	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P	19/02	A 6 1 P 29/00 101
A 6 1 P	17/00	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	21/00	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	9/00	A 6 1 P 21/00
A 6 1 P	7/06	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	7/04	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P	5/14	A 6 1 P 7/04
A 6 1 P	3/10	A 6 1 P 5/14
A 6 1 P	13/12	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	25/00	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	1/16	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	31/14	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P	31/20	A 6 1 P 31/14
A 6 1 P	1/04	A 6 1 P 31/20
A 6 1 P	1/14	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	17/06	A 6 1 P 1/14
A 6 1 P	37/08	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	11/06	A 6 1 P 37/08
A 6 1 P	11/02	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	11/00	A 6 1 P 11/02
A 6 1 P	37/06	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 21746 マルメ ロスキルデヴェーゲン 17ビー

(72)発明者 パディクヤエル セーレン

デンマーク デーコー 3500 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 デーコー 2800 ゲントフテ アゲルトフテン 12

(72)発明者 オルセン クロー ベリット

デンマーク デーコー 2610 レードヴル ヴァンドルプウェイ 57

(72)発明者 ルンド ベデルセン インゲル

デンマーク デーコー 2720 ヴァンレーゼ ヴァングサーヴェイ 10

(72)発明者 フレクナー ヤン

デンマーク デーコー 2880 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/GenSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq