(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-512838
(P2017-512838A)
(43)公表日　平成29年5月25日(2017.5.25)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| ***C07K 16/28*** | ***(2006.01)*** | C07K | 16/28 | ZNA | 4B065 |
| ***C12N 1/15*** | ***(2006.01)*** | C12N | 1/15 | | 4C084 |
| ***C12N 1/19*** | ***(2006.01)*** | C12N | 1/19 | | 4C085 |
| ***C12N 1/21*** | ***(2006.01)*** | C12N | 1/21 | | 4H045 |
| ***C12N 5/10*** | ***(2006.01)*** | C12N | 5/10 | | |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 152 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-502946 (P2017-502946)
(86)(22)出願日　平成27年3月27日 (2015.3.27)
(85)翻訳文提出日　平成28年11月22日 (2016.11.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/023108
(87)国際公開番号　WO2015/148984
(87)国際公開日　平成27年10月1日 (2015.10.1)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2014/081797
(32)優先日　平成26年7月8日 (2014.7.8)
(33)優先権主張国　中国 (CN)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2014/074199
(32)優先日　平成26年3月27日 (2014.3.27)
(33)優先権主張国　中国 (CN)

(71)出願人　516287771
バード・ロック・バイオ・インコーポレイテッド
Ｂｉｒｄ　Ｒｏｃｋ　Ｂｉｏ，　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国９２０３７カリフォルニア州ラ・ホヤ、コースト・ブールバード５０５番、スウィート３００
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトカンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に結合する抗体

(57)【要約】
本発明は、カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に結合する新規の抗体およびそのフラグメントに関する。本明細書に記載の抗体およびそのフラグメントには、ＣＢ１受容体に結合するヒト化抗体が含まれる。本発明はまた、ＣＢ１受容体のアンタゴニスト作用またはアゴニスト作用に応答する疾患または障害を処置するための抗体の使用を含む。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に対して約１μＭまたはそれ以下の結合親和性Ｋｄを有する、該ＣＢ１受容体に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２】
ＣＢ１受容体上の細胞外エピトープに結合する、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３】
ヒトＣＢ１受容体に結合する、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項４】
ＣＢ１受容体のシグナル伝達活性を阻害する、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項５】
ＣＢ１受容体活性を活性化するか、または増強する、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項６】
ＣＢ１受容体のインバースアゴニストである、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項７】
抗体が、薬剤、例えば、追加の治療剤、細胞毒性剤、免疫付着分子、または造影剤と複合体を形成している、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項８】
ＣＢ１受容体への結合に対して請求項１に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと競合し得る、抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項９】
配列番号２、１０、１８および２６からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；ならびに、
配列番号６、１４、２２および３０からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域
を含む、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項１０】
配列番号４、１２、２０および２８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；ならびに
配列番号８、１６、２４および３２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域
を含む、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項１１】
配列番号２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；
配列番号６に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；ならびに
配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域
を含む、請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項１２】
ＣＢ１受容体を発現する細胞と請求項１に記載の抗体または結合フラグメントとを接触させることを含む、ＣＢ１をアンタゴナイズする方法。
【請求項１３】
ＣＢ１受容体を発現する細胞と請求項１に記載の抗体または結合フラグメントとを接触させることを含む、ＣＢ１をアゴナイズする方法。

【請求項１４】
請求項１に記載の抗体または抗原結合フラグメントをそれを必要とする対象に投与することを含む、該対象におけるＣＢ１受容体のアンタゴニスト作用またはアゴニスト作用に応答する疾患または障害の処置法。
【請求項１５】
該疾患または障害が、肥満、糖尿病、異脂肪血症、メタボリック疾患、線維症、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、肝臓疾患、原発性胆汁性肝硬変、腎臓疾患、腎臓線維症、慢性腎臓疾患、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患、癌、および炎症性疾患からなる群より選択される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
疾患または障害が、疼痛、多発性硬化症の痙縮および緑内障からなる群より選択される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
細胞と請求項１に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを接触させることを含む、ＣＢ１と関連する疾患または障害を診断するための方法。
【請求項１８】
細胞と請求項１に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを接触させることを含む、ＣＢ１を検出する方法。
【請求項１９】
請求項１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメントを発現する宿主細胞。
【請求項２０】
抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３５２、３５３および３５４のぞれぞれで示される重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２１】
抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３５５、３５６および３５７のぞれぞれで示される軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２２】
請求項２０または２１に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと同じエピトープに特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２３】
配列番号４４３－４６３からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１；
配列番号４６４－５７７からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２；および
配列番号５７８－６２５からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３
を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２４】
配列番号６２６－６６１からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１；
配列番号６６２－７４２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２；および
配列番号７４２－８２４からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３
を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２５】
ヒト化抗体である、請求項２０から２４のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２６】

ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域を含む、請求項２５に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２７】
修飾されたＦｃ領域を含む、請求項２０から２６のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２８】
配列番号３３９－３４１からなる群より選択される重鎖可変領域アミノ酸配列、および要すれば、配列番号３３７に記載の軽鎖可変領域を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２９】
配列番号３４１を含む重鎖可変領域、および配列番号４３３、配列番号４３４または配列番号４３５を含む重鎖定常領域を含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３０】
配列番号３４０を含む重鎖可変領域、および配列番号４３３、配列番号４３４または配列番号４３５を含む重鎖定常領域を含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３１】
ＣＢ１受容体に対して約１００ｎＭまたはそれ以下の結合親和性Ｋｄを有する、ＣＢ１に結合する単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３２】
対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体またはそのフラグメントと比較して少なくとも２倍以上のＣＢ１受容体阻害活性を有する、請求項３１に記載の単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３３】
低下した脳透過性または脳透過性がないことを示す、請求項３１または３２に記載の単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３４】
小分子ＣＢ１受容体アゴニストまたはアンタゴニストと比較して減少した中枢神経系（ＣＮＳ）副作用を示す、請求項３３に記載の単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３５】
小分子ＣＢ１受容体アゴニストまたはアンタゴニストが、ＡＭ６５４５、ＡＭ２５１、タラナバンまたはリモナバンである、請求項３４に記載の単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３６】
請求項２０から３５のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをそれを必要とする対象に投与することを含む、該対象におけるＣＢ１受容体のアンタゴニスト作用またはアゴニスト作用に応答する疾患または障害の処置法。
【請求項３７】
該疾患または障害が、肥満、糖尿病、異脂肪血症、代謝性疾患、線維症、ＮＡＳＨ、肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、腎疾患、腎線維症、慢性腎疾患、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患、癌、炎症性疾患、疼痛、ＭＳ痙縮、および緑内障を含む眼疾患からなる群より選択される、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
抗体またはその抗原結合フラグメントが低下した脳透過性または脳透過性がないことを示す、請求項３６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、２０１４年３月２７日に出願された国際出願番号ＰＣＴ／ＣＮ２０１４／０７４１９９、および２０１４年７月８日に出願された国際出願番号ＰＣＴ／ＣＮ２０１４／０８１７９７（それらは引用によりその内容全体を本明細書に包含される）に基づいて優先権を主張する。

【０００２】

発明の分野

本発明は、カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に結合する抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびにかかる抗体およびその抗原結合フラグメントの使用法に関する。

【０００３】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書と共に電子的に提出されたテキストファイルの内容は、その全体が引用により本明細書中に包含される：コンピューター読み出し可能な形式の配列表のコピー（ファイル名：１５－３４３－ＷＯ３－Ｓｅｑ＿Ｌｉｓｔ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ、データ記録日：２０１５年3月２７日、ファイルサイズ７９３ＫＢ）。

【背景技術】

【０００４】

カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体は、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーのメンバーである。ＣＢ１受容体は、中枢神経系（ＣＮＳ）、肺、肝臓、脂肪組織および腎臓で発現され、とりわけ肥満、糖尿病、線維症、肝疾患、心血管疾患、癌、疼痛、ＭＳ(多発性硬化症)痙縮および緑内障を含む多くのヒト疾患に関与している。より具体的には、ＣＢ１受容体は、例えば、肥満、糖尿病、線維症、肝疾患、心血管疾患および癌に有害な活性を示すことが示されており、とりわけ疼痛、ＭＳ痙縮および緑内障に有益な活性を示すことが示されている。

【０００５】

治療目的のための新規のＣＢ１受容体アンタゴニストおよびアゴニスト、ならびに診断／画像化目的のための選択的結合剤が当技術分野で必要とされている。特に、ＣＮＳ透過能を欠くＣＢ１受容体を標的とする化合物は、ＣＢ１インバースアゴニスト（逆作動薬）であるリモナバンと関連する精神的有害事象により明らかにされた、ＣＢ１受容体調節の潜在的なＣＮＳが介在する副作用を低減するのに望ましい。

【発明の概要】

【０００６】

一面において、本発明は、カンナビノイド１受容体（本明細書中、“ＣＢ１受容体”または“ＣＢ１”とも言う）に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントを提供する。ある態様において、ＣＢ１受容体はヒトＣＢ１受容体である。ある態様において、抗体あたはそのフラグメントは、ＣＢ１受容体上の１つまたはそれ以上の細胞外エピトープを認識する。ある態様において、本明細書に記載のＣＢ１受容体結合抗体およびそのフラグメントは、機能的抗体またはその抗原結合フラグメントである。ある態様において、ＣＢ１受容体結合抗体またはそのフラグメントは、ＣＢ１受容体シグナル伝達活性を阻害するか、または増大させる。ある態様において、ＣＢ１受容体結合抗体またはそのフラグメントは、それらがＣＢ１受容体シグナル伝達活性を阻害するという点で、アンタゴニスト抗体である。ある態様において、ＣＢ１受容体結合抗体またはそのフラグメントは、それらがＣＢ１受容体シグナル伝達活性を増強するという点で、アゴニスト抗体である。ある態様において、ＣＢ１受容体結合抗体またはそのフラグメントは、ＣＢ１受容体シグナル伝達活性のモジュレーターであるか、またはＣＢ１受容体シグナル伝達活性のアロステリックモジュレーターである。ある態様においてＣＢ１受容体結合抗体またはそのフラグメントは、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を欠く選択的結合剤である。ある態様において、ＣＢ１受容体結合抗体またはそのフラグメントは、診断目的および／または画像化目的に有用であるアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性なしの選択的結合剤である。

【０００７】

ある態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、例えば、ＡＭ６５４５、ＡＭ２５１またはリモナバンなどの小分子ＣＢ１受容体モジュレーターとして少なくとも同程度に強力である。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、小分子ＡＭ６５４５、ＡＭ２５１またはリモナバンと比較して少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、または少なくとも２０倍以上強力なＣＢ１受容体阻害活性または活性化活性を有する。ある態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するシグナル伝達を阻害する。ある態様において、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するシグナル伝達の阻害は、細胞内ｃＡＭＰレベルおよび／または下流のＥＲＫリン酸化を決定することにより測定される。

【０００８】

ある態様において、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、低下した脳透過性を有するか、または脳透過性がないという利点を有する。ある態様において、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントの脳透過性は、小分子ＣＢ１受容体アゴニストまたはアンタゴニスト（例えば、ＡＭ６５４５、ＡＭ２５１またはリモナバン）と比較して低下した脳透過性を示す。ある態様において、本明細書に記載のＣＢ１受容体結合抗体およびそのフラグメントは、小分子ＣＢ１受容体アゴニストまたはアンタゴニストと比較して低下した中枢神経系の副作用の治療的利点を提供する。小分子ＣＢ１受容体アンタゴニストであるリモナバンに伴うＣＮＳ副作用には、不安、抑うつ、興奮、摂食障害、神経過敏、攻撃性、および不眠症が含まれる（Moreira, 2009, Rev Bras Psiquiatr., 31(2): 145－53）。

【０００９】

ある態様において、本明細書に記載の単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、ハイブリドーマ細胞株から作製される。他の態様において、本明細書に記載の単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、ファージディスプレイライブラリーから作製される。

【００１０】

ある態様において、本明細書に記載の単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、少なくともｎＭ範囲である、天然のヒトＣＢ１受容体に対する親和性を有する。例えば、ある態様において、ＣＢ１受容体に対する親和性は、約１μＭ以下、または約７５０ｎＭ以下、または約５００ｎＭ以下、または約２５０ｎＭ以下、または約１００ｎＭ以下、または約７５ｎＭ以下、または約５０ｎＭ以下、または約２５ｎＭ以下、または約１０ｎＭ以下、または約１ｎＭ以下である。ある態様において、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、約０．０１ｎＭから約５００ｎＭ、約０．０２ｎＭから約２５０ｎＭ、約０．０２から約２００ｎＭ、約０．０５から約１００ｎＭ、約０．０５から約５０ｎＭの、ヒトＣＢ１受容体に対する親和性を有する。

【００１１】

本発明の単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、霊長動物、ラマまたはヒトを含むが、これらに限定されない任意の種に由来し得る。ある態様において、該単離された抗体およびその抗原結合フラグメントはマウス抗体である。他の態様において、該単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、キメラ抗体である。さらに他の態様において、該単離された抗体および抗原結合フラグメントは、ヒト化抗体である。ある態様において、該単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、完全ヒト抗体である。

【００１２】

一態様において、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載のように、ヒト化抗体またはキメラＰ１Ｃ４抗体である。一態様において、ヒト化Ｐ１Ｃ４抗体は、本明細書に記載のように、Ｐ１Ｃ４－Ｈ０、Ｐ１Ｃ４－Ｈ２およびＰ１Ｃ４－Ｈ４からなる群より選択される。一態様において、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、結果として抗体エフェクター機能が低下される、損なわれる、または排除

される、Ｆｃ改変を含む。さらなる態様において、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、Ｐ１Ｃ４－Ｈ０－ＩｇＧ２－４ハイブリッド、Ｐ１Ｃ４－Ｈ０－ＩｇＧ２Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ、Ｐ１Ｃ４－Ｈ０－ＩｇＧ４Ｓ２２８Ｐ、Ｐ１Ｃ４－Ｈ２－ＩｇＧ２－４ハイブリッド、Ｐ１Ｃ４－Ｈ２－ＩｇＧ２Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ、Ｐ１Ｃ４－Ｈ２－ＩｇＧ４Ｓ２２８Ｐ、Ｐ１Ｃ４－Ｈ４－ＩｇＧ２－４ハイブリッド、Ｐ１Ｃ４－Ｈ４－ＩｇＧ２Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ、Ｐ１Ｃ４－Ｈ４－ＩｇＧ４Ｓ２２８Ｐからなる群より選択される。

【００１３】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号１、９、１７、２５、３３、４１、４９および５７からなる群より選択される核酸配列を含む重鎖可変領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号２、１０、１８、２６、３４、４２、５０および５８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３、１１、１９、２７、３５、４３、５１および５９からなる群より選択される核酸配列を含む重鎖定常領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号４、１２、２０、２８、３６、４４、５２および６０からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号５、１３、２１、２９、３７、４５、５３および６１からなる群より選択される核酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号６、１４、２２、３０、３８、４６、５４および６２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号７、１５、２３、３１、３９、４７、５５および６３からなる群より選択される核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号８、１６、２４、３２、４０、４８、５６および６４からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００１４】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号１に記載の核酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号３に記載の核酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号５に記載の核酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号７に記載の核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００１５】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号６に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００１６】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号９に記載の核酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号１１に記載の核酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号１３に記載の核酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号１５に記載の核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００１７】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号１２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００１８】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号１７に記載の核酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号１９に記載の核酸配列を含む重鎖定常領域

；配列番号２１に記載の核酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号２３に記載の核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００１９】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２０】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号２５に記載の核酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号２７に記載の核酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号２９に記載の核酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号３１に記載の核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２１】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２２】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３３に記載の核酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号３５に記載の核酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号３７に記載の核酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号３９に記載の核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２３】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２４】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号４１に記載の核酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号４３に記載の核酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号４５に記載の核酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号４７に記載の核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２５】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２６】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号４９に記載の核酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号５１に記載の核酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号５３に記載の核酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号５５に記載の核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２７】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２８】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号５７に記載の核酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号５９に記載の核酸配列を含む重鎖定常領域

；配列番号６１に記載の核酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号６３に記載の核酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【００２９】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号５８に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号６０に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号６２に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および、配列番号６４に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域。

【００３０】

一態様において、本発明は、配列番号１－３５１からなる群より選択される核酸配列またはアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％の同一性を有する核酸配列またはアミノ酸配列を含む、単離された抗体またはそのフラグメントを提供する。

【００３１】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号２、１０、１８および２６に記載の重鎖可変領域中に存在する複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）から独立して選択される重鎖ＣＤＲを含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号６、１４、２２および３０に記載の軽鎖可変領域中に存在する複数のＣＤＲから独立して選択される軽鎖ＣＤＲを含む。

【００３２】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号２、１０、１８および２６に記載の重鎖可変領域中に存在する複数のＣＤＲから独立して選択されるＣＤＲを含むヒト化抗体である。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号６、１４、２２および３０に記載の軽鎖可変領域中に存在する複数のＣＤＲから独立して選択されるＣＤＲを含むヒト化抗体である。

【００３３】

一態様において、重鎖可変領域は、配列番号３３９－３４１からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３３９－３４１からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の同一性を有する重鎖可変領域アミノ酸配列を含む。さらなる態様において、該重鎖可変領域は、配列番号３３９－３４１からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

【００３４】

別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３４３－３５１からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の同一性を有する重鎖アミノ酸配列を含む。さらなる態様において、該重鎖は、配列番号３４３－３５１からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

【００３５】

別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３３７に記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の同一性を有する軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む。さらなる態様において、該重鎖可変領域は、配列番号３３７に記載のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３３８に記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の同一性を有する軽鎖アミノ酸配列を含む。さらなる態様において、該軽鎖は、配列番号３３８に記載のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなる。

【００３６】

一態様において、本発明は、ＣＢ１に結合するヒト化された単離された抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。さらなる態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３３７に記載の軽鎖可変領域および配列番号３３９に記載の重鎖可変領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３３７に記載の軽鎖可変領域および配列番号３４０に記載の重鎖可変領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３３７に記載の軽鎖可変領域および配列番号３４１に記載の重鎖可変領域を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３３８に記載の完全軽鎖および配列番号３４３－３５１からなる群より選択される配列に記載の完全重鎖を含む。

【００３７】

一態様において、単離された抗体またはそのフラグメントは、配列番号３５２のアミノ酸配列（ＹＹＷＭＮ）と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する重鎖ＣＤＲ１配列を含む。別の態様において、単離された抗体またはそのフラグメントは、配列番号３５３のアミノ酸配列（ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹ）と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する重鎖ＣＤＲ２配列を含む。別の態様において、単離された抗体またはそのフラグメントは、配列番号３５４のアミノ酸配列（ＳＨＧＮＹＬＰＹ）と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する重鎖ＣＤＲ３配列を含む。別の態様において、単離された抗体またはそのフラグメントは、配列番号３５５のアミノ酸配列（ＳＳＹＬＨ）と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する軽鎖ＣＤＲ１配列を含む。別の態様において、単離された抗体またはそのフラグメントは、配列番号３５６のアミノ酸配列（ＳＴＳＮＬＡＳ）と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する軽鎖ＣＤＲ２配列を含む。別の態様において、単離された抗体またはそのフラグメントは、配列番号３５７のアミノ酸配列（ＨＱＹＨＲＳＰＰＴＦ）と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する軽鎖ＣＤＲ３配列を含む。

【００３８】

一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号３５２、３５３および３５４に記載のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号３５５、３５６および３５７に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む。さらなる態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号３５２、３５３、３５４、３５５、３５６および３５７に記載のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１、重鎖ＣＤＲ２、重鎖ＣＤＲ３、軽鎖ＣＤＲ１、軽鎖ＣＤＲ２および軽鎖ＣＤＲ３を含む。さらなる態様において、単離された抗体またはそのフラグメントは、キメラであるか、またはヒト化されている。

【００３９】
当業者は、本明細書に記載の抗体の重鎖および軽鎖ＣＤＲが、本明細書に記載の抗体由来の何れかの軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３；ならびに、何れかの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む抗体またはその結合フラグメントを形成するために、独立して選択され、混合され、そして組み合わされ得ることを理解し得る。当業者は、本明細書に記載の抗体の重鎖および軽鎖可変領域が、本明細書に記載の抗体由来の何れかの重鎖および軽鎖ウィ含む抗体またはその結合フラグメントを形成するために、独立して選択され、混合され、そして組み合わされ得ることをさらに理解し得る。

【００４０】
一態様において、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載のＣＤＲから選択される重鎖および軽鎖ＣＤＲ、または本明細書に記載のＣＤＲの保存的変異体を含む、キメラ抗体またはフラグメントである。別の態様において、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載のＣＤＲから選択される重鎖および軽鎖ＣＤＲ、または本明細書に記載のＣＤＲの保存的変異体を含む、ヒト化抗体またはフラグメントである。一態様において、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載の配列、またはその保存的変異体を含む、軽鎖および／または重鎖を含む。一態様において、保存的変異体は、本明細書に記載の対照配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する。一態様において、保存的変異体は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上のアミノ酸置換、挿入または欠失を含む。

【００４１】
ある態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、ＣＢ１に結合し、低下したエフェクター機能を示す。一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、ＣＢ１に結合し、１つまたはそれ以上のＦｃ領域修飾を含む。さらなる態様において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ＣＢ１に結合し、Ｆｃ領域中に１つまたはそれ以上の変異を含むアミノ酸配列を含む。さらなる態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、位置２２８および／または位置３３０および／または位置３３１に変異を有する。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、Ｆｃ領域の位置２２８に変異を有し、ここで該Ｆｃ領域はＩｇＧ４アイソタイプのものである。さらなる態様において、該変異はＳ２２８Ｐである。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、位置３３０および／または位置３３１に変異を有する。さらなる態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、位置３３０および／または３３１に変異を有し、ここで、該Ｆｃ領域は、ＩｇＧ２アイソタイプのものである。さらなる態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、Ｆｃ領域中に以下の変異：Ａ３３０ＳおよびＰ３３１Ｓを有する。別の態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、ハイブリッドＦｃ領域であるＦｃ領域を含む。例えば、一態様において、Ｆｃ領域は、ハイブリッドＩｇＧ２／ＩｇＧ４Ｆｃ領域であり、ここで、ＣＨ１およびヒンジ領域はＩｇＧ２に由来し、そしてＣＨ２およびＣＨ３領域は、ＩｇＧ４に由来する。

【００４２】
従って、一態様において、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書に記載のＣＤＲから選択される重鎖および軽鎖ＣＤＲ、または本明細書に記載のＣＤＲの保存的変異体を含む、キメラ抗体またはヒト化抗体またはフラグメントであり、ここで、単離された抗体またはそのフラグメントは、抗体エフェクター機能を変更する修飾を含むＦｃ領域を含む。例えば、一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号３５２－３５７に記載の軽鎖および重鎖ＣＤＲ、またはその保存的変異体を含み、さらに、ＩｇＧ２－ＩｇＧ４ハイブリッドＦｃ領域、位置３３０および３３１にアミノ酸変異（例えば、Ａ３３０ＳおよびＰ３３１Ｓ）を含むＩｇＧ２　Ｆｃ領域、または位置２２８にアミノ酸変異（例えば、Ｓ２２８Ｐ）を含むＩｇＧ４　Ｆｃ領

域を含む。

【００４３】

一態様において、本発明は、ＣＢ１に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメントを提供し、ここで、該抗体またはフラグメントは、ＣＢ１受容体に対して、約７０ｎＭ以下、約６０ｎＭ以下、約５０ｎＭ以下、約４０ｎＭ以下、約３０ｎＭ以下、約２５ｎＭ以下、約２０ｎＭ以下、約１５ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約８ｎＭ以下、約６ｎＭ以下、約５ｎＭ以下、約４ｎＭ以下、約３ｎＭ以下、約２ｎＭ以下、または約１ｎＭ以下の結合親和性Ｋｄを有する。一態様において、本発明は、ＣＢ１に結合する単離された抗体またはそのフラグメントを提供し、ここで、該抗体またはフラグメントは、ＣＢ１受容体に対して、約１ｎＭから約１００ｎＭ、約２ｎＭから約７５ｎＭ、約３ｎＭから約５０ｎＭ、約４ｎＭから約１０ｎＭの範囲の結合親和性Ｋｄを有するか、またはＣＢ２受容体に対して、約５０ｎＭ、または約４０ｎＭ、または約３０ｎＭ、または約２０ｎＭ、または約１０ｎＭ、または約５ｎＭ、または約４ｎＭ、または約３ｎＭ、または約２ｎＭ、または約１ｎＭの結合親和性Ｋｄを有する。

【００４４】

一態様において、本発明は、小分子リモナバンよりも少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも１１倍、少なくとも１２倍、少なくとも１３倍、少なくとも１４倍、または少なくとも１５倍以上強力な単離された抗体またはその抗原結合フラグメントを提供し、ここで、抗体またはフラグメントまたはリモナバンの効力は、ｃＡＭＰアッセイにおけるＣＢ１受容体アンタゴニスト介在シグナル伝達の阻害により測定される。さらなる態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントはヒト化されている。

【００４５】

一態様において、本発明は、ＣＢ１に結合する単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントを提供し、ここで、該抗体またはフラグメントは、対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体より強い結合親和性および／またはより強い効力を示し、ここで、ヒト化抗体またはフラグメントおよび対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体は、同じ重鎖および軽鎖ＣＤＲを含む。例えば、一態様において、本発明は、それぞれ配列番号３５２、３５３、３５４、３５５、３５６および３５７に記載の、重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３ならびに軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含むヒト化抗体またはそのフラグメントを提供し、ここで、該ヒト化抗体は、ＣＢ１受容体に対するより強い結合親和性および／またはＣＢ１受容体アゴニストの阻害に関するより強い効力を示す。一態様において、本明細書に記載のヒト化抗体およびフラグメントは、対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体と比較して、少なくとも５０％以上、少なくとも１００％以上、少なくとも２倍以上、少なくとも３倍以上、少なくとも４倍以上、少なくとも５倍以上、または少なくとも１０倍以上の効力を示す。さらなる態様において、効力は、ＣＢ１－ｃＡＭＰ産生の阻害により測定される。

【００４６】

本明細書に記載のＣＢ１受容体抗体の効力は、当技術分野で公知の何れかの方法により測定可能である。例えば、一態様において、本明細書に記載の抗体およびフラグメントの効力は、細胞内ｃＡＭＰレベルまたはＥＲＫリン酸化により測定される。例えば、効力は、ｃＡＭＰ機能アッセイ(Cisbio)におけるｃＡＭＰ産生の阻害レベルまたはウェスタンブロットにおけるＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＥＲＫリン酸化の阻害レベルにより測定され得る。

【００４７】

ある態様において、本発明は、ＣＢ１受容体への結合に関して本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと競合し得る抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。他の態様において、本発明は、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントと本質的に同じＣＢ１受容体上のエピトープに特異的に結合し得る、抗体またはその抗原

結合フラグメントを提供する。かかる抗体は、常套の競合結合アッセイを用いて同定できる。任意の態様において、競合はＥＬＩＳＡ、フローサイトメトリー、または表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）アッセイにより測定される。

【００４８】

ある態様において、抗体およびそのフラグメントは、さらなる治療剤、細胞毒性剤、免疫付着分子（immunoadhesin molecule）および造影剤を含む群から選択される１つまたはそれ以上の薬剤と複合体を形成している。ある態様において、造影剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識、およびビオチンからなる群より選択される。

【００４９】

一面において、方法は、ＣＢ１受容体を発現する細胞と本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントとを接触させることを含む、ＣＢ１受容体のシグナル伝達活性を調節するために提供される。ある態様において、方法は、結果として、ＣＢ１受容体シグナル伝達活性の阻害をもたらした。ある態様において、方法は、ＣＢ１受容体シグナル伝達の増加した活性をもたらした。ある態様において、ＣＢ１受容体シグナル伝達活性の調節は、アロステリックモジュレーターのように、間接的である。ある態様において、ＣＢ１受容体シグナル伝達活性の調節は、Ｇａｌｐｈａ ｉ／ｏ介在シグナル伝達　対　ベータアレスチン介在シグナル伝達についてバイアスされている。

【００５０】

一面において、それを必要とする対象におけるＣＢ１受容体のアンタゴニスト作用またはアゴニスト作用に応答する疾患または障害の処置法が提供される。ある態様において、方法は、本明細書に記載の抗ＣＢ１受容体抗体またはその抗原結合フラグメントを対象に投与することを含む。一態様において、対象は哺乳動物である。さらなる態様において、対象はヒトである。ある態様において、疾患または障害は、肥満、糖尿病、異脂肪血症、代謝性疾患、線維症、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、腎疾患、腎線維症、慢性腎疾患、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患、癌、炎症性疾患、疼痛、ＭＳ痙縮および緑内障を含む眼疾患である。ある態様において、疾患または障害は、例えば、肥満、糖尿病、線維症、肝疾患、心血管疾患または癌であり、そして該方法は、結果として、ＣＢ１受容体の活性の阻害をもたらした。ある態様において、疾患または障害は、例えば、疼痛または緑内障であり、そして該方法は、結果として、ＣＢ１受容体活性の活性化または増加をもたらした。

【００５１】

一面において、細胞、組織または対象においてＣＢ１受容体を検出するための方法が提供され、該方法は、細胞と本明細書に記載のＣＢ１受容体結合抗体または抗原結合フラグメントとを接触させることを含む。一態様において、細胞は対象内に存在する。別の態様において、細胞はヒト対象内に存在する。別の態様において、細胞のＣＢ１受容体発現レベルは、疾患状態と相関している。従って、一面において、本発明は、ヒト疾患の診断および／または予後のためのツールとして、ＣＢ１受容体に特異的に結合する抗体およびそのフラグメントの使用方法を提供する。一態様において、本発明は、本明細書に記載のＣＢ１受容体抗体およびフラグメントの使用を含む、ＣＢ１受容体の画像化法を提供する。一態様において、ＣＢ１受容体を検出するための方法は、ＣＢ１受容体を選択的に結合する本明細書に記載のＣＢ１受容体抗体またはそのフラグメントを用いて達成される。さらなる態様において、選択的なＣＢ１受容体抗体またはそのフラグメントは、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を示さない。さらなる態様において、選択的なＣＢ１受容体抗体またはそのフラグメントは内在化しない。一態様において、本発明は、例えば、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンなどの造影剤と複合体を形成しているＣＢ１受容体抗体またはフラグメントの使用を含む診断法および画像化法を提供する。

【００５２】

一態様において、本発明は、ＣＢ１受容体に特異的に結合する単離された抗体またはそ

のフラグメントを発現する宿主細胞を提供する。別の態様において、ＣＢ１受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの作製法を提供し、該方法は、精製したＣＢ１受容体またはその抗原フラグメント、ＣＢ１／脂質複合体、ＣＢ１受容体ｉＣＡＰＳ、および／またはＣＢ１受容体ＤＮＡで哺乳動物を免疫化することを含む。さらなる態様において、免疫化した哺乳動物はマウスである。別の態様において、哺乳動物は、免疫化された哺乳動物から細胞を取り出す前に、精製されたＣＢ１またはその抗原フラグメント、ＣＢ１／脂質複合体、ＣＢ１受容体ｉＣＡＰＳ、および／またはＣＢ１受容体ＤＮＡを用いて１回、２回、３回、４回、５回またはそれ以上免疫化されている。さらなる態様において、ＣＢ１受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントは、免疫化した哺乳動物由来の細胞を含むハイブリドーマ細胞株から作製される。別の態様において、ＣＢ１受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントは、ファージディスプレイライブラリーから作製される。さらなる態様において、ファージディスプレイライブラリーは、免疫化した哺乳動物から単離された細胞に由来する。さらなる態様において、ファージディスプレイライブラリーは、天然のヒト免疫グロブリン配列に由来する。

【図面の簡単な説明】

【００５３】

【図１】図１Ａは、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ天然ヒトＣＢ１細胞株（天然にＣＢ１受容体を発現する；濃灰色線）、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ ＣＢ１ Ｔ２１０Ａ／融合パートナー（過剰発現したＣＢ１；中間灰色線）、またはＴｒｅｘ－ＣＨＯ親細胞株（ＣＢ１受容体発現なし；淡灰色線）に対する、３００ｎＭ（上列）または３０ｎＭ（下列）でのＰ２Ａ１２ Ｂｒｉｌ ｍＡｂ（左カラム）、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｄ３（中カラム）、またはＰＡ２Ｒ３－Ｐ１Ａ７（右カラム）の結合を示すヒストグラムセットである。図１Ｂは、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ天然ＣＢ１細胞株（天然にＣＢ１受容体を発現する；濃灰色線）、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ ＣＢ１ Ｔ２１０Ａ／融合パートナー（ＣＢ１過剰発現；中間灰色線）、またはＴｒｅｘ－ＣＨＯ親細胞株（ＣＢ１受容体発現なし；淡灰色線）に対する、３００ｎＭ（上列）または３０ｎＭ（下列）でのＰＡ２Ｒ３－Ｐ１Ｆ１（左カラム）、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｅ５（中カラム）、またはＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ｂ１０（右カラム）の結合を示すヒストグラムセットである。図１Ｃは、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ天然ヒトＣＢ１細胞株（天然にＣＢ１受容体を発現する；濃灰色線）、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ ＣＢ１ Ｔ２１０Ａ／融合パートナー（ＣＢ１過剰発現；中間灰色線）、またはＴｒｅｘ－ＣＨＯ親細胞株（ＣＢ１受容体発現なし；淡灰色線）に対する、３００ｎＭ（上列）または３０ｎＭ（下列）でのＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ｂ８（左カラム）またはＰＡ２ＬＲ３－Ｐ１Ｈ４（右カラム）の結合を示すヒストグラムセットである。図１Ｄは、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ天然ヒトＣＢ１細胞株（天然にＣＢ１受容体を発現する；濃灰色線）、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ ＣＢ１ Ｔ２１０Ａ／融合パートナー（ＣＢ１過剰発現；中間灰色線）、またはＴｒｅｘ－ＣＨＯ親細胞株（ＣＢ１受容体発現なし；淡灰色線）に対する、３００ｎＭ（上列）または３０ｎＭ（下列）でのＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１（左カラム）、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ５（中カラム）、またはＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｃ６（右カラム）の結合を示すヒストグラムセットである。図１Ｅは、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ天然ヒトＣＢ１細胞株（天然にＣＢ１受容体を発現する；濃灰色線）、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ ＣＢ１ Ｔ２１０Ａ／融合パートナー（ＣＢ１過剰発現；中間灰色線）、またはＴｒｅｘ－ＣＨＯ親細胞株（ＣＢ１受容体発現なし；淡灰色線）に対する、３００ｎＭ（上列）または３０ｎＭ（下列）でのＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｇ１０（左カラム）またはＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｄ７（右カラム）の結合を示すヒストグラムセットである。図１Ｆは、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ親細胞株（ＣＢ１受容体発現なし；上列）、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ ＣＢ１ Ｔ２１０Ａ／融合パートナー細胞株（ＣＢ１過剰発現；中列）、またはＴｒｅｘ－ＣＨＯ Ａ１５６細胞株（天然にＣＢ１受容体を発現する；下列）に対する、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ１Ｇ６（左カラム）、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ１Ｈ４（中カラム）、またはＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｂ８（右カラム）の結合を示すヒストグラムセットである．

【図２】図２は、ＣＢ１を発現する細胞に対する、ＣＢ１受容体抗体ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２の２つの結合選択性を示す。図２Ａ（ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１

Ｃ４結合を示す）および図２Ｂ（３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２結合を示す）は、両抗体が、Ａ１５６（天然にＣＢ１受容体を発現する）に結合し、Ａ５６（Ｔ２１０Ａ変異および融合パートナーとのＩＣＬ３置換により修飾されたＣＢ１受容体を過剰発現する）にさらに強く結合するが、ＣＢ１受容体を発現しないＣＨＯ細胞、ＣＢ２発現細胞株、または５ＨＴ２ｂ発現細胞株への結合を示さないことを示す。ＣＢ２（図２Ｃ）および５ＨＴ２ｂ（図２Ｄ）の発現は、それぞれＣＢ２発現細胞および５ＨＴ２ｂ発現細胞株において確認された。

【図３】図３は、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２およびＰ１Ｃ４が同様のエピトープに結合するかどうかを決定するための競合アッセイの結果を示す。Ｔｒｅｘ ＣＨＯ Ａ１５６天然ヒトＣＢ１細胞を、競合するＩｇＧ（ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ ＩｇＧまたはＦａｂおよび３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２）と共にインキュベートし、次いで異なる濃度のＩｇＧ染色（３００ｎＭまたは７５ｎＭのＰ１Ｃ４、図３Ａ；８０ｎＭまたは２５ｎＭの３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２、図３Ｂ）と共にインキュベートした。

【図４】図４は、ｃＡＭＰ機能的アンタゴニストアッセイの結果を示す。抗体３６Ｅ１２Ｂ２Ｈ８（図４Ａ）およびＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（図４Ｂ）は、陽性対照である小分子ＣＢ１受容体阻害剤ＡＭ２５１（図４Ｃ）、ＳＲ１４１７１６Ａ（リモナバン）（図４Ｄ）およびＡＭ６５４５（図４Ｅ）と比較して等しい（３６Ｅ１２Ｂ２Ｈ８）またはより強力な（ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４）アンタゴニスト活性を示した。Ｐ２Ａ１２およびハイブリドーマＩｇＧアイソタイプを陰性対照として用いた（図４Ｆおよび４Ｇ）。

【図５】図５Ａは、ＣＢ１受容体発現および対照ＩｇＧ、陽性対照小分子ＡＭ６５４５、またはファージ由来のｍＡｂ ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４もしくはＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｅ４で処理後、１００ｎｍのＣＢ１受容体アゴニストＷＩＮ５５，２１２で処理した後の、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ天然ヒトＣＢ１受容体細胞におけるリン酸化ＥＲＫ（ｐＥＲＫ）および総ＥＲＫを示すウェスタンブロットセットである。示したウェスタンブロットは、ＷＩＮ５５，２１２活性化後１０分から（左パネル）、またはＷＩＮ５５，２１２活性化後１５分から（右パネル）である。図５Ｂは、ＣＢ１受容体発現および対照ＩｇＧ１、対照ＩｇＧ２、ＷＩＮ５５，２１２、ＡＭ６５４５、またはハイブリドーマ由来のｍＡｂ ３６Ｅ１２Ｂ２Ｅ５、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２もしくは３６Ｅ１２Ｂ２Ｆ２で処理後、ＷＩＮ５５，２１２活性化後の、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ天然ヒトＣＢ１受容体細胞におけるｐＥＲＫおよび総ＥＲＫを示すウェスタンブロットセットである。

【図６】図６Ａは、図６Ｂに示す対照：ＣＰ５５９４０（陽性対照）、Ｐ２Ａ１２（陰性対照）、またはＰＡ２Ｒ３－Ｐ１Ａ７（陰性対照）と比較して、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｄ３、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２およびＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ６の可能性のあるアゴニスト活性を評価するために、ＣＰ５５９４０の不存在下で行ったｃＡＭＰ機能アッセイの結果を示す。図６Ｃは、図６Ｄに示す対照：ＣＰ５５９４０のみ（陽性対照）、Ｐ２Ａ１２（陰性対照）、またはＰＡ２Ｒ３－Ｐ１Ａ７（陰性対照）と比較して、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｄ３、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２およびＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ６の可能性のあるアロステリックモジュレーター活性を評価するために、ＣＰ５５９４０の不存在下で行ったｃＡＭＰ機能アッセイの結果を示す。

【００５４】

【図７】図７は、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２のインバースアゴニストまたは中性アンタゴニスト活性を評価するために実施したｃＡＭＰアッセイの結果を示す。ＡＭ６５４５およびＳＲ１４１７１６Ａを、それぞれ中性アンタゴニストおよびインバースアゴニストに対する陽性対照として用いた。

【図８】図８Ａは、ｒＢｒｉｌ－０９１８、ｉＣＡＰＳなし、ＣＢ１受容体を発現しないｉＣＡＰＳ（ｈ１３ｈ ｉＣＡＰＳ）、またはヒトＣＢ１受容体を発現するｉＣＡＰＳ（Ａ１３８ ｉＣＡＰＳおよびＡ１３９ ｉＣＡＰＳ）に対する、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２ Ｆａｂ（上左パネル）もしくはＩｇＧ（上右パネル）、またはＰ１Ｆ７ Ｆａｂ（下左パネル）もしくはＦａｂ（下右パネル）を評価するｉＣＡＰＳ ＥＬＩＳＡ結合アッセイを示す。図８Ｂは、ｒＢｒｉｌ－０９１８、ｉＣＡＰＳなし、ＣＢ１受容体を発現しないｉＣＡＰＳ（ｈ１３ｈ ｉＣＡＰＳ）、またはヒトＣＢ１受容体を発現するｉＣＡＰＳ（Ａ１３

８ ｉＣＡＰＳおよびＡ１３９ ｉＣＡＰＳ）に対する、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ Ｆａｂ（上左パネル）もしくはＩｇＧ（上右パネル）、またはＰ１Ｆ７ Ｆａｂ（下左パネル）もしくはＦａｂ（下右パネル）を評価するｉＣＡＰＳ ＥＬＩＳＡ結合アッセイを示す。

【図９】図９Ａおよび９Ｂは、種々の処理後に内在化するＣＢ１受容体を示す。図９Ａは、ＣＢ１抗体が、ＷＩＮ５５，２１２により誘導される受容体内在化を阻止しないことを示す。図９Ａのヒストグラムの上列は、ＷＩＮ５５，２１２または対照で処理後、またはＣＢ１特異的中性アンタゴニストＡＭ６５４５で予め処理後、ＷＩＮ５５，２１２で処理した後の、ＣＢ１の表面発現を示す。図９Ａのヒストグラムの中列および下列は、ＣＢ１抗体ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ａ８、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ｆ８、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ５Ｂ１１、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ５Ｅ７、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ７、ＰＡ３Ｒ３－Ｐ４Ｄ５、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ５、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｃ６およびＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｇ１０、または陰性対照Ｐ２Ａ１２で予め処理後、ＷＩＮ５５，２１２で処理した後の、ＣＢ１の表面発現を示す。図９Ｂは、ＣＢ１抗体のみが、ＣＢ１受容体内在化を誘導しないことを示す。図９Ｂのヒストグラムの上列は、ＷＩＮ５５，２１２もしくは対照で処理後、またはＣＢ１特異的中性アンタゴニストＡＭ６５４５で処理後、ＷＩＮ５５，２１２で処理した後の、ＣＢ１の表面発現を示す。図９Ｂのヒストグラムの中列および下列は、ＣＢ１抗体ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ａ８、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ｆ８、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ５Ｂ１１、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ５Ｅ７、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ７、ＰＡ３Ｒ３－Ｐ４Ｄ５、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ５、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｃ６およびＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｇ１０、または陰性対照Ｐ２Ａ１２で処理後のＣＢ１の表面発現を示す。

【図１０】図１０は、ヒト化抗体 対 キメラＰ１Ｃ４抗体についてのｃＡＭＰ機能的アンタゴニストアッセイの結果を示す。ヒト化抗体Ｐ１Ｃ４－Ｈ０は、キメラＰ１Ｃ４抗体と同様のアンタゴニスト活性を示した。ヒト化抗体Ｐ１Ｃ４－Ｈ４およびＰＩＣ４－Ｈ２は、キメラＰ１Ｃ４抗体または陽性対照である小分子ＣＢ１受容体阻害剤リモナバンと比較してより強力なアンタゴニスト活性を示した。

【図１１】図１１は、フローサイトメトリーにより測定されるヒト化Ｐ１ Ｃ４抗体の結合親和性、交差反応性、および特異性を示す。ヒト化Ｐ１ Ｃ４抗体Ｐ１Ｃ４－Ｈ２およびＰＩＣ４－Ｈ４は、Ｐ１Ｃ４キメラ抗体と比較して、天然ヒトＣＢ１細胞（図１１Ａ、上パネル）およびＣＢ１過剰発現細胞（図１１Ａ、下パネル）の両方に対する優れた結合親和性を示した。マウスＣＢ１を発現するマウス細胞、ＴＲｅｘ－ＣＨＯ親細胞、またはヒトＣＢ２を発現するＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞に結合するキメラ抗体またはヒト化抗体はなかった（図１１Ｂ）。

【図１２】図１２は、細胞上のＣＢ１に対する、非標識Ｐ４Ｂ５抗体 対 Ｖｉｖｏｔａｇ ６８０ ＸＬ－標識Ｐ４Ｂ５抗体の親和性を示す。

【図１３】図１３Ａは、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、腸および膀胱における０ｈ、１ｈ、５ｈ、２４ｈ、４８ｈ、７２ｈ、９６ｈおよび１４４ｈの時点での標識したＰ４Ｂ５抗体ン検出（１３Ａ．１）；ならびに、脳における０ｈ、１ｈ、５ｈ、２４ｈ、４８ｈ、７２ｈ、９６ｈおよび１４４ｈ時点での、標識したＰ４Ｂ５抗体の検出（１３Ａ．２）を示す。図１３Ｂは、組織および血液の両方を含む脳における標識抗体の検出（左パネル） 対 シグナルを減算した血液を含む脳（すなわち、脳組織のみ；右パネル）における標識した抗体の検出を示す。

【図１４】図１４は、２９３およびＣＨＯ－Ｋ１細胞で発現されるＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体のＳＥＣプロファイルおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。図１４Ａは、２９３フリースタイルバッチのいずれかのＳＥＣプロファイル（上）およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ（下）分析を示す。図１４Ｂは、ＣＨＯ－Ｋ１バッチのいずれかのＳＥＣプロファイル（上）およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ（下）分析を示す。

【００５５】

【図１５】図１５は、親キメラＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４およびＰ２Ａ１２ｍＡｂ、ＩｇＧ１アイソタイプの非ＧＰＣＲ標的化ｍＡｂ陰性対照抗体と比較した、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１

Ｃ４ヒト化変異体についてのｃＡＭＰ機能アッセイを示す。
【図１６】図１６は、１．５μＭのフォルスコリンで刺激したＴＲｅｘ－ＣＨＯ　ＣＢ１細胞（図１６Ａ）ならびに５μＭのフォルスコリンで刺激したＴＲｅｘ－ＣＨＯ　ＣＢ１細胞（図１６Ｂ）における、ヒト化変異体Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４と、リモナバン、ＡＭ６５４５およびＰ２Ａ１２－ＩｇＧ１陰性対照抗体との活性の比較を示す。
【図１７】図１７は、ＣＰ５５，９４０（図１７Ａ）およびＷＩＮ５５，２１２（図１７Ｃ）に対する、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４濃度増加の効果を示す。各処理におけるシルドプロットもまた示す（図１７Ｂおよび１７Ｄ）。
【図１８】図１８Ａおよび１８Ｂは、ＷＩＮ５５，２１２が介在するＥＲＫ活性化を阻止する、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の能力を測定するウェスタンブロットＥＲＫ活性化アッセイを示す。
【図１９】図１９Ａは、阻害剤の不存在下（パネルＡ）、またはリモナバンの存在下（パネルＢ）もしくはＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の存在下（パネルＣ－Ｇ）での、種々の誘導条件下でのフローサイトメトリーベースのＣＢ１受容体内在化試験を示す。図１９Ｂは、異なるヒトＦｃフレームワークＩｇＧ２およびＩｇＧ４中にクローニングされたＰ１Ｃ４－ｈ２の効果を調べる、同一のＣＢ１受容体内在化アッセイを示す。
【図２０】図２０Ａ－Ｄは、テトラサイクリン誘導ヒトＣＢ１で安定にトランスフェクトされたＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞に対するヒト化ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４抗体変異体の結合を測定するフローサイトメトリーデータを示す。図２０Ｅ－Ｍは、ヒトＣＢ１　対　ヒトＣＢ２およびマウスＣＢ１に対する、ヒト化ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４変異体の結合選択性および交差反応性を示す。
【００５６】
【図２１】図２１は、種々のＣＢ１構築物（左に記載）を発現する細胞に対する抗体（上に記載）の結合を測定するフローサイトメトリーデータを示す。
【図２２】図２２は、Ｄａｕｄｉ細胞におけるヒト化Ｐ１Ｃ４変異体Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４の抗体介在細胞毒性および補体依存性細胞毒性を示す。図２２Ａ－Ｃは、抗体介在毒性アッセイにおけるＰ１４Ｃ変異体の効果を示す。図２２Ｄは、補体依存性細胞毒性アッセイにおけるＰ１４Ｃ変異体の効果を示す
【図２３】図２３は、示されるＰ１Ｃ４一次抗体または対照抗体および抗ヒト二次抗体（図２３Ａ）または抗マウス二次抗体（図２３Ｂ）による変性ＣＢ１タンパク質の認識を評価するウェスタンブロット分析を示す。精製したヒトＩｇＧとヒト二次抗体（図２３Ａ、レーン１）、およびマウス一次抗体と抗ウサギ二次抗体（図２３Ｂ、レーン１１）とを、陰性対照として示す。
【図２４】図２４は、ＣＢ１受容体を発現する細胞と共にキメラおよびヒト化Ｐ１Ｃ４Ｆａｂ抗体フラグメントをインキュベートすることにより、フローサイトメトリー結合試験（図２４Ａ）およびｃＡＭＰ産生の阻害（図２４Ｂ）の結果を示す。
【図２５】図２５は、早期ＮＡＳＨ（左パネル）、ＮＡＳＨ線維症（中パネル）および後期線維症（右パネル）サンプルにおける、マクロファージ、肝細胞および肝臓の筋線維芽細胞における陽性ＣＢ１特異的染色を示す。
【図２６】図２６は、正常（中パネル）またはＮＡＳＨ線維症（右パネル）細胞の何れか由来の細胞において、アイソタイプ・コントロールとは無関係な抗体を用いて染色が得られなかったことを示す。
【図２７】図２７は、正常組織においてＣＢ１特異的染色がなかったことを示す。
【図２８】図２８は、非機能的対照抗体およびＰ１Ｃ４－ｈ２抗体で処理した初代肝星細胞における、プロコラーゲンＡ１（Ｉ）を測定するＲＴ－ＰＣＲ発現データを示す。
【図２９】図２９は、示した抗体、濃度および対照で処理した初代肝星細胞における、ＴＧＦβ発現レベルを測定するＲＴ－ＰＣＲ発現データを示す。
【図３０】図３０は、示した抗体、濃度および対照で処理した初代肝星細胞における、ＴＩＭＰ１発現レベルを測定するＲＴ－ＰＣＲ発現データを示す。

【図３１】図３１は、示した抗体、濃度および対照で処理した初代肝星細胞における、α－ＳＭＡ発現レベルを測定するＲＴ－ＰＣＲ発現データを示す。

【発明を実施するための形態】

【００５７】

詳細な説明

一面において、本発明は、ヒトカンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に選択的に結合する抗体およびその抗原結合フラグメントなどの抗原結合タンパク質を提供する。抗体およびそのフラグメントは、ＣＢ１受容体をアゴナイズもしくはアンタゴナイズする、またはアゴニスト活性もしくはアンタゴニスト活性を有さないＣＢ１を選択的に認識する、機能的抗体である。

【００５８】

本明細書で用いる用語“抗体”は、少なくとも１つの抗原－結合ドメインを有する結合タンパク質を意味し、組換えポリペプチド、融合タンパク質および免疫複合体を含むモノクローナル抗体フラグメントおよび／またはその変異体を含む。従って、用語“抗体”、“抗体フラグメント”および“抗体変異体”は、本明細書中で互換的に用いられる。本発明の抗体フラグメントの例としては、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬおよびＣＨＩドメインからなるＦａｂフラグメント；ＶＨおよびＣＨＩからなるＦｃフラグメント；ＶＬおよびＶＨからなるＦｖフラグメント；ＶＨドメインからなるｄＡｂフラグメント；単離されたＣＤＲ領域；２つの連結されたＦａｂフラグメントを含むＦ（ａｂ’）$_2$二価フラグメント；および、一本鎖Ｆｖ分子（ｓｃＦｖ）が含まれるが、これに限定されない。本明細書に記載のＣＢ１受容体結合抗体は、マウス、ラット、ウサギ、霊長動物、ラマおよびヒトを含むが、これに限定されない何れかの種から作製できる。ＣＢ１受容体結合抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、または完全ヒト抗体であってよい。

【００５９】

本明細書で用いる用語“～に由来する”は、対照抗体または他の結合タンパク質と比較して分子またはポリペプチドを意味するために用いられるとき、対照抗体または他の結合タンパク質と同じエピトープに特異的に結合することができる分子またはポリペプチドを意味する。

【００６０】

単数形の使用は、他にこれと異なる記載がない限り、複数形も含む。用語“ａ”または“ａｎ”は、他にこれと異なる記載がない限り、“少なくとも１つ”を意味する。“ｏｒ”の使用は、他にこれと異なる記載がない限り、“および／または”を意味する。語句“少なくとも１つ”の意味は、語句“１つまたはそれ以上”の意味と等価である。さらに、用語“包含”、ならびに他の形態、例えば“含む”および“含んだ”の使用は、制限されない。また、“要素”または“成分”などの用語は、他にこれと異なる記載がない限り、１単位を含む要素または成分および２以上の単位を含む要素または成分の両方を包含する。

【００６１】

本明細書に記載の抗体およびその抗原結合フラグメントは、カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に特異的である。“～に対して特異的”とは、抗体およびそのフラグメントが、任意の他の標的よりも高い親和性（すなわち、より低い結合親和性Ｋｄ値）でＣＢ１受容体に結合することを意味する。従って、ＣＢ１受容体に選択的である抗体およびそのフラグメントは、任意の他のカンナビノイド受容体または他のＧＰＣＲまたは他の標的よりも高い親和性（すなわち、より低い結合親和性Ｋｄ値）でＣＢ１受容体に結合する。抗体およびそのフラグメントまたは変異体は、ＣＢ１受容体に対して、約０．０１ｎＭから約５００ｎＭ、約０．０２ｎＭから約２５０ｎＭ、約０．０２から約２００ｎＭ、約０．０５から約１００ｎＭ、約０．０５から約５０ｎＭの範囲の結合親和性Ｋｄを有し得る。抗体およびそのフラグメントは、ＣＢ１受容体に対して、約５００ｎＭ、約２５０ｎＭ、約２００ｎＭ、約１５０ｎＭ、約１００ｎＭ、約７５ｎＭ、約５０ｎＭ、約２５ｎＭ、約１０ｎＭ、約５ｎＭ、約１ｎＭ、約５００ｐＭ、約２５０ｐＭ、約１００ｐＭ、約５０ｐＭ、

または約１０ｐＭの結合親和性Ｋｄ値を有し得る。抗体およびそのフラグメントは、ＣＢ１受容体に対して、約１００ｎＭ以下、約７５ｎＭ以下、約５０ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約１ｎＭ以下、約５００ｐＭ以下、または約１００ｐＭ以下の結合親和性Ｋｄを有し得る。

【００６２】

本明細書で用いる用語“アゴニスト”は、別の化合物または受容体部位のシグナル伝達活性を増強する化合物を意味する。

【００６３】

本明細書で用いる用語“アンタゴニスト”は、受容体部位での別の化合物のシグナル伝達活性を阻害、低減または阻止する化合物を意味し、より一般的には、受容体の活性化および／またはシグナル伝達活性を低減または阻止する化合物を意味する。

【００６４】

“アロステリックモジュレーター”は、別の化合物のアゴニスト作用を間接的に調節する化合物である。例えば、アロステリックモジュレーターは、タンパク質構造内の立体構造変化を誘導することにより、受容体アゴニストのアゴニスト作用を間接的に調節することができる。アロステリックモジュレーターは、正の（アゴニスト化合物のアゴニスト作用を増幅する）または負の（アゴニスト化合物の作用を低減する）モジュレーターであり得る。

【００６５】

本明細書で用いる用語“処置”または“処置する”は、治療的処置および予防的もしくは予防手段の両方を意味する。処置を必要とする対象は、既に疾患または障害に罹患している対象、ならびに該疾患または障害を発症し得る対象および該疾患または障害を予防、遅延または軽減する目的を有する対象である。本明細書に記載の“処置”法は、疾患または障害あるいは再発する疾患または障害の１つまたはそれ以上の症状の予防、治癒、遅延、その重症度の軽減、または改善のため、あるいはそのような処置を行わないで期待されるよりも対象の生存を延長するための、対象、例えば、ＣＢ１関連疾患または障害（例えば、線維性疾患）を有する対象またはかかる疾患または障害を有すると予期される対象への本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントの投与を含む。本明細書で用いる用語“対象”は、げっ歯動物、ネコ、イヌおよび哺乳動物などの動物を意味する。好ましくは、本発明の対象はヒトである。

【００６６】

本明細書で用いる“治療的有効量”は、対象に対して治療的および／または予防的利点を提供するのに必要な化合物または組成物の量を意味する。治療的有効量は、対象および処置すべき疾患状態、対象の体重および年齢、疾患状態の重篤度、投与方法などによって変わり、当業者により容易に決定され得る。投与量は、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの、例えば、約１ｎｇから約１０，０００ｍｇ、約１ｕｇから約５，０００ｍｇ、約１ｍｇから約１，０００ｍｇ、約１０ｍｇから約１００ｍｇの範囲のであり得る。投与量レジメンは、最適な治療応答を提供するように調整され得る。有効量はまた、抗体またはその抗原結合フラグメントの任意の毒性作用または有害作用（すなわち、副作用）を最小化する、またはそれよりも有益な効果が上回る量である。

【００６７】

Ｉ．修飾抗ＣＢ１抗体

任意の態様において、本明細書に記載の抗ＣＢ１受容体抗体は、１つまたはそれ以上の修飾を含み得る。本明細書に記載の抗ＣＢ１受容体抗体の修飾形態は、当技術分野で公知の何らかの技術を用いて作製可能である。

【００６８】

ある態様において、抗ＣＢ１受容体抗体およびそのフラグメントは、さらなる治療剤、細胞毒性剤、免疫付着分子および造影剤を含む群から選択される薬剤をさらに含む複合体である。ある態様において、造影剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識、およびビオチンからなる群より選択される。ある態様において、造影

剤は、$^{3}$H、$^{14}$C、$^{35}$S、$^{64}$Cu、$^{89}$Zr、$^{90}$Y、$^{99}$Tc、$^{111}$In、$^{125}$I、$^{131}$I、$^{177}$Lu、$^{166}$Hoおよび$^{153}$Smからなる群より選択される放射性標識である。ある態様において、治療剤または細胞毒性剤は、免疫抑制剤、免疫刺激剤、抗代謝物質、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管形成剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、毒素およびアポトーシス剤を含む群から選択される。

【００６９】

一態様において、本明細書に記載の単離された抗ＣＢ１受容体抗体または抗原結合フラグメントは、ＣＢ１アンタゴニストにコンジュゲートされている。公知のＣＢ１アンタゴニストの例には、リモナバン、タラナバン、ＶＤ６０、Ｉｓｉｓ－４１４９３０アンチセンスＣＢ１、ＪＤ５０３７、ＡＭ６５４５およびＴＭ３８８３７が含まれる。一態様において、本明細書に記載の単離された抗ＣＢ１受容体抗体または抗原結合フラグメントは、リモナバンにコンジュゲートされている。一態様において、単離された抗体またはその抗原結合フラグメントは、ＣＢ１受容体アゴニストである細胞毒性剤にコンジュゲートされている。別の態様において、単離された抗体または抗原結合フラグメントは、受容体の内在化を起こさせるＣＢ１受容体の中性結合剤である細胞毒性剤にコンジュゲートされている。

【００７０】

別の面において、本明細書に記載の単離された抗ＣＢ１受容体抗体または抗原結合フラグメントは、化学療法剤にコンジュゲートされている。“化学療法剤”は、癌の処置に有用な化合物である。化学療法剤の例としては、チオテパおよびＣＹＴＯＸＡＮ(登録商標)シクロホスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファンなどのアルキルスルホン酸塩；ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）およびウレドーパ（uredopa）などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチローロメラミン（trimethylolomelamine）を含むエチレンイミン類およびメチルアメラミン類（methylamelamines）；アセトゲニン類（とりわけ、ブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成類縁体トポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類縁体を含む）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類縁体、ＫＷ－２１８９およびＣＢ１－ＴＭ１）；エレウテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン（sarcodictyin）；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド(cholophosphmide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンビキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどの窒素マスタード類；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチンなどのニトロソウレア類；エンジイン抗生物質などの抗生物質（例えば、カリケアマイシン，とりわけカリケアマイシンγ１１およびカリケアマイシンΩ１１(例えば，Agnew，Chem Intl. Ed. Engl.，33: 183－186（1994)を参照のこと）；ダイネミシンＡを含むダイネミシン類；クロドロネートなどのビスホスホネート；エスペラミシン；ならびに、ネオカルチノスタチン発色団および関連色素色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン類、アクチノマイシン（cactinomycin）、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモミコーシス、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、アドリアマイシン(登録商標)ドキソルビシン（モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンＣなどのマイトマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン（olivomycins）、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromyci

n）、ピューロマイシン、クエラマイシン、ドキソルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサートおよび５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）などの抗代謝産物質；デノプテリン（denopterin）、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサートなどの葉酸類縁体；フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チアグアニジンなどのプリン類縁体；アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジン類縁体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎性製剤；フォリン酸などの葉酸リプレニッシャー（replenisher）；アセグラトン；アルドホスファミド（aldophosphamide）グリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル（bestrabucil）；ビスアントレン；エダトレキサート；デフォファミン（defofamine）、デメコルシン（demecolcine）、ジアジコン（diaziquone）、エルフォルニチン；エリプチニウム酢酸塩；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；メイタンシンおよびアンサマイトシンなどのメイタンシノイド類；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモル（mopidanmol）；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ(登録商標) 多糖複合体（JHS Natural Products, Eugene, Oreg.）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２’，２２”－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（とりわけ、Ｔ－２トキシン、ベルカリンＡ、ロリジンＡおよびアングイジン）；ウレタン(urethane)；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン（mannomustine）；ミトブロニトール；ミトラクトール（mitolactol）；ピポブロマン（pipobroman）；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（“Ａｒａ－Ｃ”）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド類、例えば、タキソール(登録商標)パクリタキセル（Bristol－Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ(商標)（クレモホール フリー）、パクリタキセルのアルブミンベースのナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois）およびタキソテール(登録商標)ドセタキセル（Rhone－Poulenc Rorer, Antony, France）；クロラムブシル（Chlorambucil）；ＧＥＭＺＡＲ(登録商標)ゲムシタビン；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金類縁体；ビンブラスチン；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ(登録商標)ビノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；ＣＰＴ－１１；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイン酸などのレチノイド類；カペシタビン；ならびに、上記の何れかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が含まれる。また、ボルテゾミブ（ベルケイド）などのプロテアソーム阻害剤、ＢＣＬ－２阻害剤、ＩＡＰアンタゴニスト（例えば、任意のペプチドなどのＳｍａｃ模倣体／ｘＩＡＰおよびｃＩＡＰ阻害剤、（Ｓ）－Ｎ－｛６－ベンゾ［１，３］ジオキソｌ－５－イル－１－［５－（４－フルオロ－ベンゾイル）－ピリジン－３－イルメチル］－２－オキソ－１，２－ジヒドロ－ピリジン－３－イル｝－２－メチルアミノ－プロピオンアミドなどのピリジン化合物、ｘＩＡＰアンチセンス）、ＨＤＡＣ阻害剤（ＨＤＡＣＩ）およびキナーゼ阻害剤（Ｓｏｒａｆｅｎｉｂ）もまた定義に包含される。一態様において、細胞毒性剤にコンジュゲートされている単離された抗体または抗原結合フラグメントは、ＣＢ１受容体アゴニストである。

【００７１】

ある態様において、結合タンパク質は、薬剤に直接コンジュゲートされている。他の態様において、結合タンパク質は、リンカーを介して薬剤にコンジュゲートされている。好適なリンカーとしては、本明細書に記載のアミノ酸およびポリペプチドリンカーが含まれるが、これに限定されない。リンカーは、切断可能または切断不可能であってよい。

【００７２】
任意の態様において、抗体およびそのフラグメントは、二重特異性抗体または二官能性抗体である。用語“二重特異性抗体”とは、単一分子内に２つの抗体の抗原結合部位を組合せて含む分子を意味する。従って、二重特異性抗体は、同時に２つの異なる抗原に結合することができる。二重特異性抗体は、一般的に、２つの異なる重鎖／軽鎖対および２つの異なる結合部位またはエピトープを有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なる抗原に対して結合特異性を有する、モノクローナル抗体であってよく、好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体である。
【００７３】
一態様において、二重特異性抗体および／またはそのフラグメントは、ＣＢ１および第二の標的抗原に対する結合特異性を有する。任意の態様において、二重特異性抗体および／またはそのフラグメントは、ＣＢ１およびＴＧＦ－β、２－ＡＧ、ＰＤＧＦ－β、ＩＬ－６、アナンダミド（ＡＥＡ）、またはＬＯＸＬ－２に対する結合特異性を有する。
【００７４】
本明細書に記載の抗体およびフラグメントは、炭酸脱水酵素ＩＸ、α－フェトプロテイン、α－アクチニン－４、Ａ３、Ａ３３抗体に特異的な抗原、ＡＲＴ－４、Ｂ７、Ｂａ７３３、ＢＡＧＥ、ＢｒＥ３－抗原、ＣＡ１２５、ＣＡＭＥＬ、ＣＡＰ－１、ＣＡＳＰ－８／ｍ、ＣＣＣＬ１９、ＣＣＣＬ２１、ＣＤ１、ＣＤ１ａ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ１１Ａ、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ２９、ＣＤ３０、ＣＤ３２ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４５、ＣＤ４６、ＣＤ５２、ＣＤ５４、ＣＤ５５、ＣＤ５９、ＣＤ６４、ＣＤ６６ａ－ｅ、ＣＤ６７、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ７９ａ、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ９５、ＣＤ１２６、ＣＤ１３２、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＣＤ１４７、ＣＤ１５４、ＣＤＣ２７、ＣＤＫ－４／ｍ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＣＸＣＲ４、結腸特異的抗原－ｐ（ＣＳＡｐ）、ＣＥＡ（ＣＥＡＣＡＭ５）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＥＡＣＡＭ６、ｃ－ｍｅｔ、ＤＡＭ、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＧＰ－１、ＥＧＰ－２、ＥＬＦ２－Ｍ、Ｅｐ－ＣＡＭ、Ｆｌｔ－１、Ｆｌｔ－３、葉酸受容体、Ｇ２５０抗原、ＧＡＧＥ、ｇｐ１００、ＧＲＯＢ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＭ１．２４、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（ＨＣＧ）およびそのサブユニット、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ＨＭＧＢ－１、低酸素症誘導因子（ＨＩＦ－１）、ＨＳＰ７０－２Ｍ、ＨＳＴ－２、Ｉａ、ＩＧＦ－１Ｒ、ＩＦＮ－γ、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＬ－２、ＩＬ－４Ｒ、ＩＬ－６Ｒ、ＩＬ－１３Ｒ、ＩＬ－１５Ｒ、ＩＬ－１７Ｒ、ＩＬ－１８Ｒ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２３、ＩＬ－２５、インシュリン様増殖因子－１（ＩＧＦ－１）、ＫＣ４－抗原、ＫＳ－１－抗原、ＫＳ１－４、Ｌｅ－Ｙ、ＬＤＲ／ＦＵＴ、マクロファージ遊走阻止因子（ＭＩＦ）、ＭＡＧＥ、ＭＡＧＥ－３、ＭＡＲＴ－１、ＭＡＲＴ－２、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＡＧ－３、ｍＣＲＰ、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１Ａ、ＭＩＰ－１Ｂ、ＭＩＦ、ＭＵＣ１、ＭＵＣ２、ＭＵＣ３、ＭＵＣ４、ＭＵＣ５、ＭＵＭ－１／２、ＭＵＭ－３、ＮＣＡ６６、ＮＣＡ９５、ＮＣＡ９０、ＰＡＭ－４抗体に特異的な抗原、胎盤増殖因子、ｐ５３、ＰＬＡＧＬ２、前立腺酸性ホスファターゼ、ＰＳＡ、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＭＡ、ＰＩＧＦ、ＩＧＦ、ＩＧＦ－１Ｒ、ＩＬ－６、ＲＳ５、ＲＡＮＴＥＳ、Ｔ１０１、ＳＡＧＥ、Ｓ１００、サバイビン、サバイビン－２Ｂ、ＴＡＣ、ＴＡＧ－７２、テネイシン、ＴＲＡＩＬ受容体、ＴＮＦ－α、Ｔｎ抗原、トムソン－フリーデンライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、ＶＥＧＦＲ、ＥＤ－Ｂフィブロネクチン、ＷＴ－１、１７－１Ａ－抗原、補体因子Ｃ３、Ｃ３ａ、Ｃ３ｂ、Ｃ５ａ、Ｃ５、血管形成マーカー、ｂｃｌ－２、ｂｃｌ－６、Ｋｒａｓ、ｃＭＥＴ、癌遺伝子マーカーおよび癌遺伝子産物（例えば、Sensi et al., Clin Cancer Res 2006, 12:5023－32; Parmiani et al., J Immunol 2007, 178:1975－79; Novellino et al. Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187－207を参照のこと）からなる群より選択される１つまたはそれ以上の標的抗原に結合し得る。
【００７５】

二重特異性抗体の作製法は周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え産生は、２つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づき、ここで、２つの重鎖は異なる特異性を有する（Milstein et al., Nature 305:537 (1983)）。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、可能性のある１０の異なる抗体分子の混合物を生じ、そのうちの１つのみが正しい二重特異性構造を有している。正しい分子の精製は、通常、親和性クロマトグラフィー工程により達成される。同様の手順は、ＷＯ９３／０８８２９およびTraunecker et al., EMBO J 10:3655 (1991)に記載されている。他の二重特異性抗体の作製法は、例えば、Kufer et al., Trends Biotech 22:238－244, 2004に記載されている。

【００７６】

所望の結合特異性を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合されていてよい。融合は、好ましくは、ヒンジ、$C_{H2}$および$C_{H3}$領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインとなされる。それは、融合物の少なくとも１つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含有する第一の重鎖定常領域（$C_{H1}$）を有していてよい。免疫グロブリン重鎖融合物、および要すれば、免疫グロブリン軽鎖をコードするＤＮＡは、別個の発現ベクターに挿入され、好適な宿主生物に同時に形質転換される。二重特異性抗体の作製のさらなる詳細は、例えば、Suresh et al., Meth Enzym 121:210 (1986)を参照のこと。種々の組換え法が、二重特異性抗体、両方の抗体フラグメントの効率的な産生のために開発されている（Carter et al. (1995), J. Hematotherapy 4: 463－470; Pluckthun et al. (1997) Immunotechology 3: 83－105; Todorovska et al. (2001) J. Immunol. Methods 248: 47－66）および完全長ＩｇＧフォーマット(Carter (2001) J. Immunol. Methods 248: 7－15）。

【００７７】

特に断らない限り、本発明の実施は、当技術分野で周知の常套の分子生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の技術および、例えば、Methods in Molecular Biology, Humana Press; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989), Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988－1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Phage display: a laboratory manual (C. Barbas III et al, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); および Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)に記載の技術を用いる。

【００７８】

一面において、本発明は、マウスを、例えば、ＣＢ１受容体ＤＮＡ、ＣＢ１受容体タンパク質、またはＣＢ１／脂質複合体などのＣＢ１受容体免疫原で免疫化することを含む、本明細書に記載の抗体およびフラグメントまたは変異体の産生方法を提供する。ある態様において、マウスは、１回、２回、３回、４回、５回またはそれ以上免疫化される。ある態様において、マウスはＣＢ１受容体ＤＮＡで免疫化され、ＣＢ１受容体応答は、ＣＢ１受容体ＤＮＡおよび／または精製したＣＢ１受容体タンパク質、ＣＢ１受容体タンパク質を含む膜、またはＣＢ１受容体ｉＣＡＰＳでさらに免疫化することにより高まる。ある態様において、免疫化されたマウス由来の細胞は、ハイブリドーマおよびファージライブラリーを生成するために使用される。

【００７９】

ある態様において、ＣＢ１受容体抗体は、免疫化したマウス由来のＢ細胞を回収し、ＣＢ１受容体抗体産生ハイブリドーマ細胞を作製することにより、産生される。ハイブリドーマの産生は、当技術分野で周知の技術であり、抗体産生細胞をミエローマ細胞または他の不死化細胞と融合させて、不死化抗体産生ハイブリドーマ細胞株を作製することを含む（例えば、Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495を参照のこと）。ハイブリドー

マ細胞によって産生されるモノクローナル抗体は、沈殿、クロマトグラフィー、限外ろ過、遠心分離、ゲル電気泳動、および／または当技術分野で公知の任意の他の方法などの免疫グロブリン精製の常套の手段によって上清から単離され得る。上清または単離されたモノクローナル抗体は、天然膜と比べてＣＢ１受容体膜への結合を評価することによって、ＣＢ１受容体への結合について試験され得る。例えば、上清または単離されたモノクローナル抗体は、ＥＬＩＳＡでのＣＢ１受容体への結合について試験され得る。

【００８０】

本発明の別の面は、ファージライブラリーの使用を含む、本明細書に記載の抗体およびフラグメントまたは変異体の産生方法を提供する。ファージディスプレイ技術による抗体の組換え産生法は、当技術分野で公知である（例えば、Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433－455 (1994), McCafferty et al., Nature 348: 552－553 (1990)およびClackson et al. Nature 352:624 (1991)を参照のこと）。ある態様において、免疫化マウス由来の脾臓を、抗ＣＢ１受容体抗体のアレイを単離し、それらの抗体由来の可変遺伝子のランダムなコンビナトリアルライブラリーを形成するために使用する。ある態様において、ファージディスプレイライブラリーを生成するために、免疫化したマウス由来の細胞を利用するよりもむしろ、該ライブラリーは、初代血液リンパ球の可変重鎖および軽鎖遺伝子から生成される。

【００８１】

ある態様において、ファージライブラリーを、少なくとも３ラウンドのパンニング（panning）において、ＣＢ１受容体結合ファージについてパンニングし、そしてその後、ファージ結合体を、ＥＬＩＳＡによりＣＢ１受容体への特異的結合についてスクリーニングする。その後、特定の結合体が選択され、完全な抗体に変換され得る。

【００８２】

ある態様において、本明細書に記載の抗体およびフラグメントは、キメラ抗体またはヒト化抗体である。キメラ抗体およびヒト化抗体の作製法は、当技術分野で周知であり、例えば、Lo, Benny, K. C., editor, in Antibody Engineering: Methods and Protocols, volume 248, Humana Press, New Jersey, 2004にまとめられている。

【００８３】

“キメラ抗体”は、ある種に由来する重鎖可変領域の少なくとも一部および軽鎖可変領域の少なくとも一部；ならびに、別の種に由来する定常領域の少なくとも一部を有する抗体である。例えば、一態様において、キメラ抗体は、マウス可変領域およびヒト定常領域を含んでいてよい。“ヒト化抗体”は、非ヒト抗体に由来する相補性決定領域（ＣＤＲ）；ならびにヒト抗体に由来するフレームワーク領域ならびに定常領域を含む抗体である。

【００８４】

本明細書で用いる用語“ＣＤＲ”または“相補性決定領域”は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見いだされる連続していない抗原結合部位を意味する。これらの特定の領域は、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609－6616 (1977) および Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991)およびChothia et al., J. Mol. Biol. 196:901－917 (1987) および MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732－745 (1996)に記載されており、ここで定義は、互いに比較したとき、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。Ｋａｂａｔの定義は、配列変動性に基づいている。全ての種の全てのＩＧおよびＴＲ　Ｖ領域についてのＩＭＧＴ独自の番号付けは、可変領域構造の高度な保存性に依拠している（Lefranc, Mp et al., Dev comp. Immunol. 27:55－77, 2003）。５，０００以上の配列を整列させた後に設定したＩＭＧＴ番号付けを考慮に入れ、フレームワークおよびＣＤＲの定義を組み合わせる。Ｃｌｏｔｈｉａの定義は、構造ループ領域の位置に基づいている。Ｃｏｎｔａｃｔの定義（MacCallum et al.）は、複合体の結晶構造および抗体－抗原相互作用の分析に基づいている。上記の文献のそれぞれによって定義されるＣＤＲを包含するアミノ酸残基は、比較のために記載されている。本明細書に記載の１態様において、用語“ＣＤＲ”は、Ｋａｂａｔの定義によって定義されるＣＤＲである。本明細書に記載の別の態様において、ＣＤＲは、ＩＭＧＴによって定

義されたＣＤＲである。

【００８５】

ＣＤＲは、一般的に、エピトープ認識および抗体結合のために重要である。しかしながら、変更を、抗体の認識能力に干渉することなく、エピトープ認識に影響を与えるＣＤＲを含む残基に行うことができる。例えば、エピトープ認識に影響を与えず、エピトープに対する抗体の結合親和性を増加させない変更がなされてもよい。いくつかの研究は、一次抗体配列の知識、結合および発現レベルなどのその特性に基づいて、抗体の配列内のさまざまな位置での１つまたはそれ以上のアミノ酸変化の導入の効果を調べている（Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392－403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910－8915; および、Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535－539）.

【００８６】

このように、目的の抗体の均等物は、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発、カセット突然変異誘発、エラープローンＰＣＲ、ＤＮＡシャッフリングまたは大腸菌の突然変異誘発株などの方法を用いて、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２またはＣＤＲ３、またはフレームワーク領域における重鎖および軽鎖遺伝子の配列を変えることによって作製することができる（Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535－539; and Adey et al., 1996, Chap. 16, pp. 277－291, in Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press）。一次抗体の核酸配列を変更する方法は、改善された親和性を有する抗体をもたらし得る（Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576－3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701－10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169－179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77－88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365－16370; および、Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622－27628）。

【００８７】

例えば、本明細書に記載のＣＢ１抗体は、１つまたはそれ以上のマウス抗体由来のＣＤＲならびにヒトフレームワーク領域および定常領域を含み得る。従って、一態様において、本明細書に記載のヒト化抗体は、抗体のＣＤＲが由来するマウス抗体と、ＣＢ１上の同じエピトープに結合する。ヒト化抗体の例を本明細書中に提供する。本明細書に提供される重鎖および軽鎖ＣＤＲ、またはその変異体を含むさらなるヒト化ＣＢ１抗体は、ヒトフレームワーク配列を用いて作製することができ、それもまた本発明に包含される。一態様において、本発明における使用に適するフレームワーク配列は、本明細書に記載のフレームワーク配列に構造的に類似したフレームワーク配列を含む。ある態様において、ヒトフレームワークは、親抗体とヒト生殖系列ＶＨおよびＶＫ遺伝子との間の相同性に基づいて選択される。選択されたフレームワークは、ある態様において、親抗体ＶＨおよびＶＫ遺伝子と最も高い相同性を有し、また親抗体によって提示されると予測されるＣＤＲ構造をサポートするために、コンピュータモデリングまたは他の手段に基づいて、予測された。

【００８８】

フレームワーク領域におけるさらなる修飾は、本明細書で提供される抗体の特性を改善するようになされ得る。そのようなさらなるフレームワーク修飾は、化学修飾；免疫原性を低下させるか、またはＴ細胞エピトープを除去するための点変異；または、元の生殖系列配列中の残基への復帰突然変異を含み得る。本発明の一態様において、ヒト化抗体およびそのフラグメントは、可変領域をさらに変更することなく、本明細書で提供されるヒトフレームワークおよび移植されたＣＤＲを含む。ヒトフレームワーク復帰突然変異を含まないヒト化抗体は、本明細書中、Ｈ０（例えば、Ｐ１Ｃ４－Ｈ０）と称される。本発明の別の態様において、ヒト化抗体およびそのフラグメントは、本明細書に提供されるヒトフレームワークおよび移植されたＣＤＲを含み、ここで、重鎖フレームワーク領域１のアミノ酸位置２７および／または２８が復帰突然変異されている。さらなる態様において、アミノ酸位置２７は、Ｇｌｙ（Ｇ）からＴｙｒ（Ｙ）へ復帰突然変異されており、アミノ酸位置２８は、Ｔｈｒ（Ｔ）からＧｌｕ（Ｅ）へ復帰突然変異されている。位置２７および

２８にかかる変異を有するヒト化抗体は、本明細書中、“Ｈ２”または“Ｈ２（ＹＥ）”（例えば、Ｐ１Ｃ４－Ｈ２またはＰ１Ｃ４－Ｈ２（ＹＥ））と記載される。本発明の別の態様において、ヒト化抗体およびそのフラグメントは、本明細書に記載のヒトフレームワークおよび移植されたＣＤＲを含み、ここで、重鎖フレームワーク領域１の位置２７および／または位置２８のアミノ酸ならびに重鎖フレームワーク領域３の位置６０および／または位置６１のアミノ酸は復帰突然変異されている。さらなる態様において、位置２７のアミノ酸はＧｌｙ（Ｇ）からＴｙｒ（Ｙ）へ、位置２８のアミノ酸はＴｈｒ（Ｔ）からＧｌｕ（Ｅ）へ、位置６０のアミノ酸はＡｌａ（Ａ）からＡｓｎ（Ｎ）へ、そして位置６１のアミノ酸はＧｌｎ（Ｑ）からＧｌｙ（Ｇ）へ復帰突然変異されている。位置２７、２８、６０および６１にそのような変異を有するヒト化抗体は、本明細書中、“Ｈ４”または“Ｈ４（ＹＥＮＧ）”（例えば、Ｐ１Ｃ４－Ｈ４またはＰ１Ｃ４－Ｈ４（ＹＥＮＧ））と記載される。本発明の一態様において、抗体およびその抗原結合フラグメントは、軽鎖に復帰突然変異のようなフレームワーク修飾を含む。例えば、一態様において、抗体は、軽鎖フレームワーク領域２の位置４５および／または位置４７に変異を含む。さらなる態様において、位置４５のアミノ酸は、Ａｒｇ（Ｒ）からＬｙｓ（Ｋ）へ変異され、位置４７のアミノ酸は、Ｌｅｕ（Ｌ）からＴｒｐ（Ｗ）に変異されている。本発明はまた、ＣＢ１に結合し、好適なフレームワーク配列に関して本明細書に記載の例示的な修飾に対応するフレームワーク修飾、ならびに別の方法で抗体の特性を改善する他のフレームワーク修飾を含む、ヒト化抗体を包含する。本明細書に記載のＣＢ１抗体およびそのフラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３もしくはＩｇＧ４アイソタイプのもの、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。用語“アイソタイプ”は、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる抗体クラスを意味する。加えて、重鎖定常領域は、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、霊長動物、ラマまたはヒトを含むが、それに限定されない何れかの種に由来してよい。例えば、一態様において、本発明のＣＢ１抗体およびそのフラグメントは、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ定常領域を含む。別の態様において、ＣＢ１抗体およびそのフラグメントは、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ４、またはハイブリッドＩｇＧ２－ＩｇＧ４ Ｆｃ定常領域を含む。

【００８９】

ＩＩ．エフェクター機能およびＦｃ修飾

ある態様において、本発明は、変異型Ｆｃ領域を含むＣＢ１抗体を提供する。抗体のＦｃ領域は、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）および補体分子Ｃ１ｑに結合物抗体の一部分である。Ｆｃ領域は、抗体エフェクター機能に介在する(mediating)役割を果たしている。抗体のＦｃに関連して本明細書で用いる“エフェクター機能”は、例えば、Ｃ１ｑ結合；補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；食作用；オプソニン化；トランスサイトーシス；および、細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）の下方制御などの抗体機能を意味する。かかるエフェクター機能は、一般的に、結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と結合するＦｃ領域を必要とし、そのような抗体エフェクター機能を評価するための当技術分野で公知の種々のアッセイを用いて評価することができる。変異型Ｆｃ領域は、エフェクター機能を変更する変異を含むＦｃ領域である。ある態様において、本明細書に記載のＣＢ１抗体は、１つまたはそれ以上のエフェクター機能を低下、障害または排除するＦｃ領域変異を含む。例えば、一態様において、本明細書に記載の抗体およびそのフラグメントは、ＣＢ１に結合し、そして低下した、障害された、または不存在のＣ１ｑ結合および／またはＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣを示す。Ｆｃ変異は、アミノ酸挿入、欠失または置換であってよいか、または化学修飾であってよい。例えば、Ｆｃ領域修飾は、補体結合を増加または低下させ、抗体依存性細胞傷害性を増加または低下させ、またはグリコシル化を変更させ得る。種々のＦｃ変異が当技術分野で公知であり、例えば、Labrijin et al., Nature Biotech 27(8):767－71 (2009); Idusogie, et al. J Immunol 2000; Greenwood et al Eur J Immunol 23:1098－104 (1993); Mueller et al . Mol Immunol 1997; 34:441－52; および、Rother et al Nature Biotechnol 2007; 25:1256－64に記載されている。当技術分野で公知のＦｃ変異の

いくつかは、エフェクター機能を改変するために本明細書に記載の例示的なＣＢ１抗体に適用することができる。さらに、種々の治療用抗体が、エフェクター機能を改変するためにＦｃ領域変異を有して製造されている。かかる治療用抗体は当技術分野で公知であり、例えば、アレムツズマブ、ベンラリズマブ、ベバシズマブ、ビメキズマブ（bimekizumab）、カンツズマブ、コドリツズマブ、ダロツズマブ（dalotuzumab）、エファリズマブ、エロツズマブ、エナバツズマブ（enavatuzumab）、エノキズマブ（enokizumab）、エトロリズマブ、ファーレツズマブ、フィクラツズマブ、イムガツズマブ（Imgatuzumab）、イトリズマブ、リファスツズマブ（lifastuzumab）、リゲリズマブ、ロデルシズマブ（Lodelcizumab）、ロルボツズマブ、モガムリズマブ、モタビズマブ、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オマリズマブ、パルサツズマブ、パテクリズマブ、ペラキズマブ（perakizumab）、ペルツズマブ、ピディリズマブ、クイリズマブ、ロンタリズマブ（rontalizumab）、ソフィツズマブ（sofituzumab）、ソラネズマブ、スビズマブ（suvizumab）、テプリズマブ、チルドラキズマブ、トシリズマブ、トラスツマブ、トラスツマブエムタンシン、トレガリズマブ、ベドリズマブ、ボルセツズマブ、ボルセツズマブ・マフォドチン、イットリウム（９０Ｙ）クリバツズマブテトラキセタン、アンルキンズマブ、ダセツズマブ、ダクリズマブ、エタラシズマブ、ミラツズマブ、オザネズマブ、ピナツズマブベドチン（pinatuzumab vedotin）、ポラツズマブベドチン、チガツズマブ、ベルツズマブ、アビツズマブ（abituzumab）、ボコシズマブ、デムシズマブ、ゲボキズマブ、ポネズマブ、ラルパンシズマブ（ralpancizumab）、ロモソズマブ、タネズマブ、ブロソズマブ、コンシズマブ、クレネズマブ、イバリズマブ(Ibalizumab)、イクセキズマブ（ixekizumab）、レブリキズマブ（lebrikizumab）、オロキズマブ、ペンブロリズマブ、シムツズマブ（Simtuzumab）、ウロクプルマブ（ulocuplumab）、バテリズマブ（Vatelizumab）およびサマリズマブ（例えば、配列番号３５８－４３２を参照のこと）が含まれる。当技術分野で公知のＦｃ変異のいくつかは、エフェクター機能、抗体半減期または他の抗体特性を変えるために、本明細書に記載のＣＢ１受容体抗体に適用され得る。

【００９０】

一態様において、ＣＢ１抗体は、低下したエフェクター機能を示す。さらなる態様において、ＣＢ１抗体は、位置２２８に変異を有するＩｇＧ４　Ｆｃ領域を含む。さらなる態様において、位置２２８のアミノ酸は、セリン（Ｓ）からプロリン（Ｐ）へ変異されている（すなわち、Ｓ２２８Ｐ）。別の態様において、ＣＢ１抗体は、低下したエフェクター機能を示し、位置３３０および／または位置３３１に変異を有するＩｇＧ２　Ｆｃ領域を含む。さらなる態様において、位置３３０のアミノ酸は、アラニン（Ａ）からセリン（Ｓ）へ変異されており、および／または位置３３１のアミノ酸は、プロリン（Ｐ）からセリン（Ｓ）へ変異されている。さらなる態様において、ＣＢ１抗体は、Ａ３３０ＳおよびＰ３３１Ｓ変異の両方を有するＩｇＧ２　Ｆｃドメインを含む。別の態様において、ＣＢ１抗体は、ＩｇＧ２／ＩｇＧ４ハイブリッドＦｃ領域を含む。例えば、一態様において、ＣＢ１抗体は、ＩｇＧ２に由来するＣＨ１およびヒンジ領域ならびにＩｇＧ４に由来するＣＨ２およびＣＨ３領域を含む。

【００９１】

立体配座抗原提示システム（ｉＣＡＰＳ）。ｉＣＡＰＳは、機能的ＧＰＣＲの精製された、単離された、立体配座的に正しい提示を可能にする。精製されたＧＰＣＲは、ベルトタンパク質に囲まれた脂質二重層中に安定化される。

【００９２】

一態様において、本発明は、本明細書に記載の抗体およびその抗原結合フラグメントまたは変異体の何れか１つをコードする単離された核酸を提供する。ある態様において、該単離された核酸を含むベクターが提供される。ある態様において、該ベクターで形質転換された宿主細胞が提供される。ある態様において、宿主細胞は原核細胞である。さらなる態様において、宿主細胞は大腸菌である。ある態様において、宿主細胞は真核細胞である。さらなる態様において、真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞および心筋細胞からなる群より選択される。ある態様において、宿主細胞は、２９３、ＣＯＳ、ＮＳ０

およびＣＨＯを含むが、これらに限定されない哺乳動物細胞、および；または、サッカロマイセス・セレビシエなどの真菌細胞；または、Ｓｆ９などの昆虫細胞である。本発明の一態様は、結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、培養培地中、本明細書に記載の宿主細胞のいずれかを培養することを含む、本明細書に記載の抗体およびそのフラグメントまたは変異体を産生する方法を提供する。

【００９３】

本発明の例示的ＣＢ１受容体結合抗体は、以下の表１に記載される。さらなる本発明の例示的ＣＢ１受容体結合抗体は、配列番号によって定義され、表２に示される配列表に提供される。本発明の例示的ヒト化ＣＢ１受容体結合抗体の配列は、表３に提供される。

【００９４】

【表１－１】

表１．例示的ＣＢ１受容体結合抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の核酸配列およびアミノ酸配列

| 名称 | 配列説明 | 配列番号 | 配列 |
|---|---|---|---|
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変領域核酸配列 | １ | GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGAATTCAGTTACTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGAAACTAAGTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCTATATGCAGCTCAGCAGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCCCATGGTAACTACCTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA |
| | ＨＣ可変領域 アミノ酸配列 | ２ | EVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKASGYEFSYYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGETKYNGKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSHGNYLPYWGQGTLVTVSA |

【表１－２】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（キメラ） | ＨＣ定常領域 核酸配列 | ３ | GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT<br>GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA<br>CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC<br>TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCATGGAACTC<br>AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC<br>CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC<br>CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG<br>CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA<br>ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG<br>AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC<br>ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT<br>GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA<br>AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC<br>CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT<br>ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG<br>ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC<br>GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC<br>ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG<br>TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC<br>CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC<br>AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC<br>CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT<br>CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC<br>CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT<br>GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC<br>TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC<br>TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG<br>TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT<br>GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC<br>AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA |

【表１－３】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（キメラ） | ＨＣ定常領域　アミノ酸配列 | ４ | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL<br>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPGK |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸配列 | ５ | GATATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATG<br>TCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTCACCATGAC<br>CTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTA<br>CTTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT<br>CCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAAC<br>CTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGG<br>CAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAT<br>CAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTT<br>ATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCACCC<br>ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA<br>A |
| | ＬＣ可変領域　アミノ酸配列 | ６ | DIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHW<br>YQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSY<br>SLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPPTFGAGTKLEL<br>K |
| | ＬＣ定常領域　核酸配列 | ７ | CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC<br>CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC<br>TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA<br>TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG<br>ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG<br>AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC<br>CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCA<br>AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC<br>TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTTGCC<br>CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT<br>AA |

【表１－４】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（キメラ） | ＬＣ定常領域　アミノ酸配列 | ８ | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNRGEC |
| ３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変領域　核酸配列 | ９ | CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGAATTCAGTTACTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTCAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCACCAGCCTAACGTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCGGGGGGGTAACCCCTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA |
| | ＨＣ可変領域　アミノ酸配列 | １０ | QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFSYYWMNWVKQRPGQGLQWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMHLTSLTSEDSAVYFCARSGGNPFAFWGQGTLVTVSA |

【表１－５】

| | | | |
|---|---|---|---|
| | ＨＣ定常領域　核酸配列 | １１ | GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCATGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA |

【表１－６】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２（キメラ） | ＨＣ定常領域　アミノ酸配列 | １２ | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸配列 | １３ | GATATCCAGATGACACAGACTTCATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCTTCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCACATCAAGGTTCCGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGACGTTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTCATACGCTTCCGTGGTCGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA |
| | ＬＣ可変領域　アミノ酸配列 | １４ | DIQMTQTSSSLSASLGDRVTFSCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVTSRFRGSGSGTDYSLTISNLEQEDVATYFCQQGHTLPWSFGGGTKLEIK |
| | ＬＣ定常領域　核酸配列 | １５ | CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG |

【表１－７】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２（キメラ） | ＬＣ定常領域　アミノ酸配列 | １６ | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| ３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２（マウス） | 重鎖（ＨＣ）可変領域　核酸配列 | １７ | CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGAATTCAGTTACTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTCAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCACCAGCCTAACGTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCGGGGGGTAACCCCTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA |
| | ＨＣ可変領域　アミノ酸配列 | １８ | QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYEFSYYWMNWVKQRPGQGLQWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMHLTSLTSEDSAVYFCARSGGNPFAFWGQGTLVTVSA |

【表１－８】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２（マウス） | ＨＣ定常領域　核酸配列 | １９ | GCTAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACT<br>GGCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCT<br>CGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTAT<br>TTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACTC<br>TGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCC<br>CAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTC<br>AGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTG<br>GCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCC<br>ACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAA<br>ATTGAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTG<br>TCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCT<br>TGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCA<br>AAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGC<br>CCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAG<br>CGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGT<br>TTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAG<br>ACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTAC<br>TCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGC<br>ACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAA<br>TGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCC<br>CATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGT<br>CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTC<br>CACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTC<br>ACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCC<br>TGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACG<br>GGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAA<br>CCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATG<br>TACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTG<br>GGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAGTGGT<br>CCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTA<br>AGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGA |

【表１－９】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２（マウス） | ＨＣ定常領域　アミノ酸配列 | ２０ | AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPE<br>PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVT<br>SSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCP<br>PCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV<br>VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY<br>NSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA<br>PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLT<br>CMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS<br>DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN<br>HHTTKSFSRTPGK |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸配列 | ２１ | GATATCCAGATGACACAGACTTCATCCTCCCT<br>GTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCTTCA<br>GTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATT<br>TAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACT<br>GTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTA<br>CACTCAGGAGTCACATCAAGGTTCCGTGGCAG<br>TGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAG<br>CAACCTGGAGCAAGAAGACGTTGCCACTTACT<br>TTTGCCAACAGGGTCATACGCTTCCGTGGTCG<br>TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA |
| | ＬＣ可変領域　アミノ酸配列 | ２２ | DIQMTQTSSSLSASLGDRVTFSCRASQDISNYLNWY<br>QQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVTSRFRGSGSGTDY<br>SLTISNLEQEDVATYFCQQGHTLPWSFGGGTKLEI<br>K |
| | ＬＣ定常領域　核酸配列 | ２３ | CGGGCAGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTT<br>CCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAG<br>GTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCT<br>ACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATT<br>GATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAA<br>CAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCA<br>CCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACC<br>AAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATAC<br>CTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCAC<br>CCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTT<br>AG |
| | ＬＣ定常領域　アミノ酸配列 | ２４ | RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKD<br>INVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSST<br>LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC |

【表１－１０】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－　Ｐ４Ｂ５　（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変領域　核酸配列 | ２５ | GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACT<br>GGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCT<br>GCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTTATTACT<br>GGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAG<br>GGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGA<br>GATGGTGATACTAACTACAGTGGAAGGTTCAAG<br>GGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTC<br>CAGCACAGCCTACATTCAGCTCAGCAGCCTAA<br>CATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAA<br>GATCGCACGGTAACTATTTTCCTTACTGGGGC<br>CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA |
| | ＨＣ可変領域　アミノ酸配列 | ２６ | EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSYYWMN<br>WVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYSGRFKGKAT<br>LTADKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARSHGNYFP<br>YWGQGTLVTVSA |

【表１－１１】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－　Ｐ４Ｂ５　（キメラ） | ＨＣ定常領域　核酸配列 | ２７ | GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT<br>GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA<br>CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC<br>TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCATGGAACTC<br>AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC<br>CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC<br>CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG<br>CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA<br>ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG<br>AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC<br>ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT<br>GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA<br>AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC<br>CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT<br>ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG<br>ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC<br>GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC<br>ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG<br>TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC<br>CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC<br>AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC<br>CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT<br>CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC<br>CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT<br>GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC<br>TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC<br>TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG<br>TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT<br>GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC<br>AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA |

【表１－１２】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－　Ｐ４Ｂ５　（キメラ） | ＨＣ定常領域　アミノ酸配列 | ２８ | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL<br>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPGK |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸配列 | ２９ | GACATTGTTCTCAACCAGTCTCCAGCAATCATG<br>TCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTCACCATGAC<br>CTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTA<br>CTTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT<br>CCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAAC<br>CTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGG<br>CAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAT<br>CAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTT<br>ATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCGCTCA<br>CGTTCGGTGCTGGGACCAAACTGGAAATAAAA |
| | ＬＣ可変領域　アミノ酸配列 | ３０ | DIVLNQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHW<br>YQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSY<br>SLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPLTFGAGTKLEIK |
| | ＬＣ定常領域　核酸配列 | ３１ | CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC<br>CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC<br>TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA<br>TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG<br>ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG<br>AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC<br>CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCA<br>AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC<br>TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTTGCC<br>CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT<br>AA |
| | ＬＣ定常領域　アミノ酸配列 | ３２ | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE<br>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNR<br>GEC |

【表１－１３】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｄ３　（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変領域　核酸配列 | ３３ | GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCT<br>GGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCT<br>GCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTTACTACT<br>GGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAG<br>GGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGA<br>GATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAG<br>GGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTC<br>CAGTACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTAA<br>CATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAA<br>GATCGCACGGTAGCTATTTTGCTTACTGGGGC<br>CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA |
| | ＨＣ可変領域　アミノ酸配列 | ３４ | EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSYYWMN<br>WVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKA<br>TLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSHGSYF<br>AYWGQGTLVTVSA |

【表１－１４】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｄ３　（キメラ） | ＨＣ定常領域　核酸配列 | ３５ | GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT<br>GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA<br>CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC<br>TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCATGGAACTC<br>AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC<br>CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC<br>CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG<br>CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA<br>ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG<br>AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC<br>ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT<br>GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA<br>AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC<br>CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT<br>ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG<br>ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC<br>GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC<br>ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG<br>TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC<br>CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC<br>AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC<br>CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT<br>CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC<br>CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT<br>GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC<br>TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC<br>TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG<br>TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT<br>GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC<br>AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA |

【表１－１５】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｄ３　（キメラ） | ＨＣ定常領域　アミノ酸配列 | ３６ | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸配列 | ３７ | GATATTGAGCTGGCCCAATCTCCAGCTTCTTTG GCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATATC CTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTTGATAGTTATG GCAATAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAAC CAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATCTT GCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAG GTTCAGCGGCAGTGGGTCTAGGGCAGACTTCA CCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGAT GCTGCAACCTATTACTGTCTACAATATGCTAGT TCTCCTCCTACGTTCGGTGCTGGGACCAAACT GGAAATAAAA |
| | ＬＣ可変領域　アミノ酸配列 | ３８ | DIELAQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSF MHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGS RADFTLTIDPVEADDAATYYCLQYASSPPTFGAGT KLEIK |
| | ＬＣ定常領域　核酸配列 | ３９ | CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCA AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTTGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT AA |
| | ＬＣ定常領域　アミノ酸配列 | ４０ | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNR GEC |

【表１－１６】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変領域　核酸配列 | ４１ | GAGGTCCAGCTTCAGCAATCTGGGGCTGAGCT<br>GGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCT<br>GCAAGGCTTCTGGCTTTGCATTCAGTAACTACT<br>GGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAG<br>GGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGA<br>GATGGTGATACTAACTTCAATGGAAAGTTCAAG<br>GGTAGAGCCATACTGACTGCAGACATATCCTC<br>CAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTAA<br>CATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAA<br>GATCGCACGGTAACTATTTTCCTTACTGGGGC<br>CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA |
| | ＨＣ可変領域　アミノ酸配列 | ４２ | EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGFAFSNYWMN<br>WVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNFNGKFKGRAI<br>LTADISSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSHGNYFP<br>YWGQGTLVTVSA |

【表１－１７】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１（キメラ） | ＨＣ定常領域　核酸配列 | ４３ | GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT<br>GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA<br>CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC<br>TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCATGGAACTC<br>AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC<br>CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC<br>CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG<br>CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA<br>ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG<br>AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC<br>ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT<br>GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA<br>AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC<br>CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG<br>CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT<br>ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG<br>ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC<br>GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC<br>ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG<br>TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC<br>CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC<br>AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC<br>CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT<br>CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC<br>CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT<br>GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC<br>TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC<br>TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG<br>TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT<br>GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC<br>AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA |

【表１－１８】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１（キメラ） | ＨＣ定常領域　アミノ酸配列 | ４４ | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL<br>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPGK |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸配列 | ４５ | CAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCAATCATG<br>TCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTCACCATGAC<br>CTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTA<br>CTTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT<br>CCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAAC<br>CTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGG<br>CAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAT<br>CAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTT<br>ATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCGCTCA<br>CGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA |
| | ＬＣ可変領域　アミノ酸配列 | ４６ | QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHW<br>YQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSY<br>SLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPLTFGAGTKLEL<br>K |
| | ＬＣ定常領域　核酸配列 | ４７ | CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC<br>CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC<br>TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA<br>TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG<br>ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG<br>AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC<br>CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCA<br>AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC<br>TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTTGCC<br>CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT<br>AA |
| | ＬＣ定常領域　アミノ酸配列 | ４８ | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE<br>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNR<br>GEC |

【表１－１９】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変領域核酸配列 | ４９ | GAGGTCCAGCTTCAGCAATCTGGGGCTGAGCT<br>GGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCT<br>GCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTTACTACT<br>GGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAG<br>GGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGA<br>GATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAG<br>GGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTC<br>CAGTACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTAA<br>CATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAA<br>GATCGCACGGTAACTATTTTGCTTACTGGGGC<br>CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA |
| | ＨＣ可変領域　アミノ酸配列 | ５０ | EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSYYWMN<br>WVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKA<br>TLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSHGNY<br>FAYWGQGTLVTVSA |

【表１－２０】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２（キメラ） | ＨＣ定常領域　核酸配列 | ５１ | GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT<br>GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA<br>CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC<br>TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCATGGAACTCA<br>GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC<br>GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT<br>CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT<br>TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC<br>ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA<br>GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA<br>TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG<br>GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC<br>CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG<br>AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC<br>GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG<br>GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC<br>GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG<br>GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG<br>GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA<br>GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC<br>GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC<br>CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT<br>GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA<br>CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC<br>CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG<br>CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC<br>AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA<br>GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA<br>GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC<br>TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA |

【表１－２１】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２（キメラ） | ＨＣ定常領域　アミノ酸配列 | ５２ | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL<br>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPGK |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸配列 | ５３ | CAAATTGTACTCACCCAGTCTCCAGCAATCATG<br>TCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTCACCATGAC<br>CTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTA<br>CTTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT<br>CCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAAC<br>CTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGG<br>CAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAT<br>CAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTT<br>ATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCCCTC<br>GCGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA<br>A |
| | ＬＣ可変領域　アミノ酸配列 | ５４ | QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHW<br>YQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSY<br>SLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSPLAFGAGTKLEL<br>K |
| | ＬＣ定常領域　核酸配列 | ５５ | CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC<br>CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC<br>TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA<br>TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG<br>ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG<br>AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC<br>CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCA<br>AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC<br>TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTTGCC<br>CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT<br>AA |
| | ＬＣ定常領域　アミノ酸配列 | ５６ | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE<br>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNR<br>GEC |

【表１－２２】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ７（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変領域　核酸配列 | ５７ | GAGGTTCAGCTTCAGCAATCTGGGGCTGAGCT<br>GGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCT<br>GCAAGGCTTCTGGCTTTGCATTCAGTAACTACT<br>GGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCCGGACAG<br>GGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGA<br>GATGGTGATACTAACTTCAATGGAAAGTTCAAG<br>GGTAGAGCCATACTGACTGCAGACATATCCTC<br>CAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTAA<br>CATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAA<br>GATCGCACGGTAACTATTTTCCTTACTGGGGC<br>CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA |
| | ＨＣ可変領域　アミノ酸配列 | ５８ | EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGFAFSNYWMN<br>WVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNFNGKFKGRAI<br>LTADISSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSHGNYFP<br>YWGQGTLVTVSA |

【表１－２３】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ７（キメラ） | ＨＣ定常領域　核酸配列 | ５９ | GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT<br>GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA<br>CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC<br>TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCATGGAACTCA<br>GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC<br>GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT<br>CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT<br>TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC<br>ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA<br>GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA<br>TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG<br>GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC<br>CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG<br>AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC<br>GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG<br>GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA<br>GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC<br>GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG<br>GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG<br>GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA<br>GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC<br>GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC<br>CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT<br>GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA<br>CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC<br>CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG<br>CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC<br>AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA<br>GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA<br>GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC<br>TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA |

10

20

30

40

【表１－２４】

| | | | |
|---|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ７（キメラ） | ＨＣ定常領域　アミノ酸配列 | ６０ | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL<br>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPGK |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸配列 | ６１ | GATATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGCAATCATG<br>TCCGCATCTCTAGGGGAACGGGTCACCATGAC<br>CTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTA<br>CTTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT<br>CCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACCTCCAAC<br>CTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGG<br>CAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAT<br>CAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTT<br>ATTACTGCCACCAGCATCATCGTTCCCCACCC<br>ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA<br>A |
| | ＬＣ可変領域　アミノ酸配列 | ６２ | DIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHW<br>YQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSY<br>SLTISSMEAEDAATYYCHQHHRSPPTFGAGTKLEL<br>K |
| | ＬＣ定常領域　核酸配列 | ６３ | CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC<br>CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC<br>TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA<br>TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG<br>ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG<br>AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC<br>CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCA<br>AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC<br>TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTTGCC<br>CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTT<br>AA |
| | ＬＣ定常領域　アミノ酸配列 | ６４ | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE<br>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSLPVTKSFNR<br>GEC |

【００９５】

【表２－１】

表２．さらなるＣＢ１受容体結合抗体の配列番号

| 名称 | 配列説明 | 配列番号 |
|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ１Ｇ６（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ６５ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ６６ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ６７ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ６８ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ６９ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ７０ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ７１ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ７２ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ１Ｈ４（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ７３ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ７４ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ７５ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ７６ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ７７ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ７８ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ７９ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ８０ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｂ８（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ８１ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ８２ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ８３ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ８４ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ８５ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ８６ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ８７ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ８８ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｅ５（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ８９ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ９０ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ９１ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ９２ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ９３ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ９４ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ９５ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ９６ |

【表２－２】

| | | |
|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ａ８（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ９７ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ９８ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ９９ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １００ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １０１ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １０２ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １０３ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １０４ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ｂ１０　（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １０５ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １０６ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １０７ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １０８ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １０９ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １１０ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １１１ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １１２ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ｂ８（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １１３ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １１４ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １１５ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １１６ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １１７ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １１８ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １１９ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １２０ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ３Ｆ８（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １２１ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １２２ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １２３ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １２４ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １２５ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １２６ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １２７ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １２８ |

【表２－３】

| | | |
|---|---|---|
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｃ６（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １２９ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １３０ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １３１ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １３２ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １３３ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １３４ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １３５ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １３６ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｇ１０　（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １３７ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １３８ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １３９ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １４０ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １４１ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １４２ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １４３ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １４４ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ５Ｅ７（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １４５ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １４６ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １４７ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １４８ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １４９ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １５０ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １５１ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １５２ |
| ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｄ７（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １５３ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １５４ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １５５ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １５６ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １５７ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １５８ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １５９ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １６０ |

【表２－４】

| | | |
|---|---|---|
| ＰＡ２Ｒ３－Ｐ１Ａ７（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １６１ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １６２ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １６３ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １６４ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １６５ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １６６ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １６７ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １６８ |
| ＰＡ２Ｒ３－Ｐ１Ｆ１（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １６９ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １７０ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １７１ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １７２ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １７３ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １７４ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １７５ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １７６ |
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ３Ａ７（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １７７ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １７８ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １７９ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １８０ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １８１ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １８２ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １８３ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １８４ |
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ３Ｃ３（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １８５ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １８６ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １８７ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １８８ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １８９ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １９０ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １９１ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | １９２ |

【表２－５】

| | | |
|---|---|---|
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ３Ｄ１０　（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | １９３ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | １９４ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | １９５ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | １９６ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | １９７ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | １９８ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | １９９ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２００ |
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ３Ｄ１１　（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２０１ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２０２ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２０３ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２０４ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２０５ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２０６ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２０７ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２０８ |
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ３Ｆ６　（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２０９ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２１０ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２１１ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２１２ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２１３ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２１４ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２１５ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２１６ |
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ４Ｃ４　（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２１７ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２１８ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２１９ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２２０ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２２１ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２２２ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２２３ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２２４ |

【表２－６】

| | | |
|---|---|---|
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ４Ｆ８（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２２５ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２２６ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２２７ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２２８ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２２９ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２３０ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２３１ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２３２ |
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ４Ｇ１１（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２３３ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２３４ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２３５ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２３６ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２３７ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２３８ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２３９ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２４０ |
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ４Ｈ１０（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２４１ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２４２ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２４３ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２４４ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２４５ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２４６ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２４７ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２４８ |
| ＰＡ１５Ｒ３－Ｐ３Ａ６（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２４９ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２５０ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２５１ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２５２ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２５３ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２５４ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２５５ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２５６ |

【表２－７】

| | | |
|---|---|---|
| ＰＡ１５Ｒ３－Ｐ３Ａ７（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２５７ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２５８ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２５９ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２６０ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２６１ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２６２ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２６３ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２６４ |
| ＰＡ１５Ｒ３－Ｐ３Ｃ９（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２６５ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２６６ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２６７ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２６８ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２６９ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２７０ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２７１ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２７２ |
| ＰＡ１６Ｒ３－Ｐ２Ｇ６（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２７３ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２７４ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２７５ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２７６ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２７７ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２７８ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２７９ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２８０ |
| ＰＡ１６Ｒ３－Ｐ１Ａ６（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２８１ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２８２ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２８３ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２８４ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２８５ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２８６ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２８７ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２８８ |

【表２－８】

| | | |
|---|---|---|
| ＰＡ１６Ｒ３－Ｐ１Ｂ５（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２８９ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２９０ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２９１ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ２９２ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ２９３ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ２９４ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ２９５ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ２９６ |
| ＰＡ１６Ｒ３－Ｐ１Ｅ５（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ２９７ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ２９８ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ２９９ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ３００ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ３０１ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ３０２ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ３０３ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ３０４ |
| ＰＡ１６Ｒ３－Ｐ１Ｈ５（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ３０５ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ３０６ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ３０７ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ３０８ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ３０９ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ３１０ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ３１１ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ３１２ |
| ＰＡ１８Ｒ３－Ｐ１Ｄ８（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ３１３ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ３１４ |
| | ＨＣ定常領域　核酸 | ３１５ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ３１６ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域　核酸 | ３１７ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ３１８ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ３１９ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ３２０ |

【表２－９】

| | | |
|---|---|---|
| ＰＡ１８Ｒ３－Ｐ１Ｅ５（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ３２１ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ３２２ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ３２３ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ３２４ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ３２５ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ３２６ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ３２７ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ３２８ |
| ＰＡ１８Ｒ３－Ｐ１Ｈ５（キメラ） | 重鎖（ＨＣ）可変核酸 | ３２９ |
| | ＨＣ可変領域アミノ酸 | ３３０ |
| | ＨＣ定常領域核酸 | ３３１ |
| | ＨＣ定常領域アミノ酸 | ３３２ |
| | 軽鎖（ＬＣ）可変領域核酸 | ３３３ |
| | ＬＣ可変領域アミノ酸 | ３３４ |
| | ＬＣ定常領域核酸 | ３３５ |
| | ＬＣ定常領域アミノ酸 | ３３６ |

【００９６】

【表３－１】

表３．例示的ヒト化抗体の配列

| 名称／配列説明 | 配列番号 | 配列 |
|---|---|---|
| ヒト化Ｐ１Ｃ４<br>軽鎖可変領域 | ３３７ | ＥＩＶＬＴＱＳＰＡＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣ<br>ＲＡＳＱＳＶＳＳＳＹＬＨＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＲ<br>ＬＬＩＹＳＴＳＮＬＡＳＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧ<br>ＴＤＦＴＬＴＩＳＲＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＨＱＹ<br>ＨＲＳＰＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４<br>完全軽鎖 | ３３８ | ＥＩＶＬＴＱＳＰＡＴＬＳＬＳＰＧＥＲＡＴＬＳＣ<br>ＲＡＳＱＳＶＳＳＳＹＬＨＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＲ<br>ＬＬＩＹＳＴＳＮＬＡＳＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧ<br>ＴＤＦＴＬＴＩＳＲＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣＨＱＹ<br>ＨＲＳＰＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳ<br>ＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮ<br>ＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ<br>ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫ<br>ＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴ<br>ＫＳＦＮＲＧＥＣ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４<br>－Ｈ０　重鎖可<br>変領域 | ３３９ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫ<br>ＡＳＧＧＴＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥ<br>ＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴ<br>ＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡ<br>ＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶ<br>ＳＳ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４<br>－Ｈ２　重鎖可<br>変領域 | ３４０ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫ<br>ＡＳＧＹＥＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥ<br>ＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴ<br>ＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡ<br>ＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶ<br>ＳＳ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４<br>－Ｈ４　重鎖可<br>変領域 | ３４１ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫ<br>ＡＳＧＹＥＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥ<br>ＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＮＧＫＦＱＧＲＶＴ<br>ＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡ<br>ＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶ<br>ＳＳ |

【表３－２】

| | | |
|---|---|---|
| ヒト化Ｐ１Ｃ４<br>重鎖定常領域 | ３４２ | ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡ<br>ＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬ<br>ＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶ<br>ＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴ<br>ＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰ<br>ＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲ<br>ＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹ<br>ＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲ<br>ＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳ<br>ＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱ<br>ＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫ<br>ＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴ<br>ＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲ<br>ＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ<br>ＳＬＳＬＳＰＧＫ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４<br>Ｈ０　ＩｇＧ<br>２－４ハイブリッド | ３４３ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫ<br>ＡＳＧＧＴＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥ<br>ＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴ<br>ＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡ<br>ＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶ<br>ＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳ<br>ＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧ<br>ＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳ<br>ＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳ<br>ＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＥ<br>ＦＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴ<br>ＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶ<br>ＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶ<br>ＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮ<br>ＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶ<br>ＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ<br>ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴ<br>ＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷ<br>ＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳ<br>ＬＳＬＳＬＧＫ |

【表３－３】

| | | |
|---|---|---|
| ヒト化Ｐ１Ｃ４ Ｈ０ ＩｇＧ ２Ａ３３０Ｓ／ Ｐ３３１Ｓ | ３４４ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫ ＡＳＧＧＴＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥ ＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴ ＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡ ＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶ ＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳ ＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧ ＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳ ＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳ ＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＰ ＶＡＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰ ＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤ ＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＶＶ ＳＶＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫ ＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹ ＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦ ＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰ ＰＭＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱ ＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬ ＳＬＳＰＧＫ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４ Ｈ０ ＩｇＧ ４Ｓ２２８Ｐ | ３４５ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫ ＡＳＧＧＴＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥ ＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴ ＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡ ＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶ ＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳ ＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧ ＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳ ＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＫＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳ ＮＴＫＶＤＫＲＶＥＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥ ＦＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴ ＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶ ＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶ ＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮ ＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶ ＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧ ＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴ ＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷ ＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳ ＬＳＬＳＬＧＫ |

【表３－４】

| | | |
|---|---|---|
| ヒト化Ｐ１Ｃ４Ｈ２　ＩｇＧ２－４ハイブリッド | ３４６ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＥＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＬＧＫ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４Ｈ２　ＩｇＧ２Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ | ３４７ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＥＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＰＶＡＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＶＶＳＶＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＭＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ |

【表３－５】

| | | |
|---|---|---|
| ヒト化Ｐ１Ｃ４Ｈ２　ＩｇＧ４Ｓ２２８Ｐ | ３４８ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＥＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＫＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＬＧＫ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４Ｈ４　ＩｇＧ２－４ハイブリッド | ３４９ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＥＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＮＧＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＬＧＫ |

【表３－６】

| | | |
|---|---|---|
| ヒト化Ｐ１Ｃ４Ｈ４　ＩｇＧ２Ａ３３０Ｓ／Ｐ３３１Ｓ | ３５０ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＥＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＮＧＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＰＶＡＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＶＶＳＶＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＭＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４Ｈ４　ＩｇＧ４Ｓ２２８Ｐ | ３５１ | ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＥＦＳＹＹＷＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹＮＧＫＦＱＧＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＨＧＮＹＬＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＫＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＬＧＫ |

【００９７】

ある態様において、本明細書に記載される抗ＣＢ１受容体抗体は、本明細書に記載される配列またはその保存的変異体を含む。本明細書で用いる“保存的変異体”には、保存的アミノ酸置換、挿入または欠失が含まれる。当業者は、保存的アミノ酸置換とは、１つの

アミノ酸の、例えば、類似の側鎖などの類似の構造または化学的特性を有する別のアミノ酸での置換であり、そして保存的アミノ酸置換、挿入または欠失の結果、対照配列の生物学的活性を保持する配列がもたらされることを認識し得る。例示的な保存的置換は、当技術分野で、例えば、Watson et al., Molecular Biology of the Gene, The Bengamin/Cummings Publication Company, 4th Ed. (1987) に記載されている。

【００９８】

ＩＩＩ．ＣＢ１関連障害の処置法

本明細書に記載の抗体およびその抗原結合フラグメントは、治療目的のためにヒト対象に投与され得る。ある態様において、本明細書に記載の抗体およびその結合フラグメントまたは変異体を対象に投与することを含む処置法を提供する。

【００９９】

任意の態様において、該方法は、末梢ＣＢ１受容体が優先的に標的とされる疾患の処置のために提供される。本明細書で定義される“末梢性ＣＢ１受容体”は、脳または中枢神経系に局在化されていないＣＢ１受容体（例えば、末梢限定的な(peripherally restricted)ＣＢ１受容体）である。対照的に、用語“全身性の（global）ＣＢ１受容体”は、脳およびＣＮＳを含む体内のどこにでもあるＣＢ１受容体を意味する。

【０１００】

一態様において、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、例えば、とりわけ肥満、糖尿病、異脂肪血症、線維症、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、心血管疾患、癌、疼痛、多発性硬化症（ＭＳ）痙縮、緑内障、炎症性疾患、腎症、骨粗鬆症、代謝障害、精神障害、神経障害、神経変性障害、繁殖障害、腎疾患、腎線維症、慢性腎疾患、アテローム性動脈硬化症、癌および皮膚障害などの種々の疾患または障害の処置に有用である。

【０１０１】

ＣＢ１受容体シグナル伝達は、例えば、肥満、糖尿病、線維症、肝疾患、心血管疾患および癌に有害な活性を示すことが示されている（Kunos et al., 2009, Trends Pharmacol Sci 30:1－7）。一面において、本明細書に記載の抗ＣＢ１抗体、またはそのフラグメントは、ＣＢ１活性に拮抗するのに有用である。従って、別の面において、本発明は、それを必要とする対象に本明細書に記載の１つまたはそれ以上の抗ＣＢ１抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を投与することによる、ＣＢ１関連疾患または障害の処置法を提供する。ある態様において、本明細書に記載のアンタゴニスト性ＣＢ１受容体抗体およびそのフラグメントは、肥満、糖尿病、線維症、肝疾患、心血管疾患、ニコチン中毒のような中毒症、または癌の処置または予防のために使用されるとき、有益な効果を提供する。

【０１０２】

非アルコール性脂肪肝疾患（ＮＡＦＬＤ）としても知られている非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）は、過剰なアルコール摂取によるものではない肝臓への脂肪蓄積を意味する。ＮＡＳＨは、脂肪蓄積と同時に肝臓の炎症によって特徴づけられる肝疾患である。ＮＡＳＨはまた、糖尿病および肥満を有する人々でも見いだされ、メタボリックシンドロームに関連している。ＮＡＳＨは、それは肝臓における脂肪の蓄積を起こしてゆっくりと悪化させ、肝硬変をもたらし得るため、比較的良性の非アルコール性脂肪肝疾患の進行型である（Smith, et al., 2011, Crit Rev Clin Lab Sci., 48(3):97－113に報告されている）。現在、ＮＡＳＨに対する特定の治療法は存在しない。

【０１０３】

一面において、本明細書に記載の抗ＣＢ１抗体またはそのフラグメントは、線維症の処置、予防、検出または実験に使用されている。マウスモデルにおけるいくつかの実験により、肝線維症を含む、線維症におけるＣＢ１受容体の役割が確認されている。（例えば、Wei et al., 2014, Exp. Biol. Med. 239(2):183－192; Tam et al., 2010, J. Clin. Invest. 120(8):2953－66; Wan et al., 2014, Cell Metabolism, 19(6):900－1; Takano et al., 2014, Synapse, 68:89－97を参照のこと）。末梢性ＣＢ１は、脂肪症（脂肪肝）

、炎症および肝臓損傷を含む、ＮＡＳＨおよび肝線維症に貢献するいくつかのメカニズムに関与している（Mallat et al., 2013, J Hepatology, 59(4):891－896に報告されている）。ＣＢ１は、筋線維芽細胞に変化して線維症をもたらす活性化したヒト肝星細胞（ＨＳＣ）において上方制御されることが証明されている（Teixeira－Clerc et al., 2006, Nature Med., 12(6):671－76）。ＣＢ１はまた、糖尿病性腎症にも関与している（Lin et al., 2014 J. Mol. Med. 92(7):779－92）。

【０１０４】

肝細胞特異的ＣＢ１および全身性ＣＢ１のノックアウトマウスにおける試験は、いくつかの代謝性疾患および障害に関連している末梢細胞型（肝細胞）におけるＣＢ１の主要な役割を意味する証拠を提供している。食餌性肥満のマウスモデルにおいて、全身性ＣＢ１ノックアウト（ＣＢ１－／－）および肝細胞特異的ＣＢ１ノックアウト（ＬＣＢ１－／－）の両方は、減少した脂肪症（脂肪肝）および増加した肝機能を証明し、従って、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、糖尿病およびメタボリックシンドロームの疾患病理に関連する末梢細胞型（肝細胞）におけるＣＢ１の役割を証明している。（Osei－Hyiaman et al., 2008, J. Clin. Invest., 118(9):3160－3169; Liu et al., 2012, Gastroenterology, 142:1218－1228）。マクロファージ特異的ＣＢ１ノックダウンｓｉＲＮＡ（ＣＢ１Ｒ－ＧｅＲＰ）を用いるＣＢ１の選択的ノックダウンは、Ｔ２Ｄインスリン抵抗性、高血糖およびβ細胞障害の一般的なモデルであるＺｕｃｋｅｒ糖尿病性脂肪（ＺＤＦ）ラットにおいて、進行性の高血糖を阻止し、血漿インスリンおよびＣ－ペプチドを低減させる（Jourdan et al., 2013, Nature Med. 19(9):1132－1140）。アルコール誘導性肝脂肪症のマウスモデルにおいて、全身性ＣＢ１ノックアウト（ＣＢ１－／－）および肝細胞特異的ＣＢ１ノックアウト（ＬＣＢ１－／－）の両方は、脂肪が減少し、肝機能が増加したため、脂肪症疾患病理に関連する末梢細胞型（肝細胞）におけるＣＢ１の役割を実証した（Jeong, et al., 2008, Cell Metabolism, 7:227－235）。脂質蓄積は、野生型対照と比較してＣＢ１ノックアウトマウスから作製された巣上体白色脂肪細胞株において減少することが示された（Wagner et al., 2011, Nutrition and Diabetes, 1:e16）。

【０１０５】

マウスにおける疾患の異なるモデルにおける試験は、末梢限定的なＣＢ１受容体小分子アンタゴニストが肝線維症の進行を効果的に阻害し得ることを示した（例えば、Wei et al., 2014, Exp. Biol. Med. 239(2):183－192; Tam et al., 2010, J. Clin. Invest. 120(8):2953－66; Wan et al., 2014, Cell Metabolism, 19(6):900－1; Takano et al., 2014, Synapse, 68:89－97を参照のこと）。公知のＣＢ１アンタゴニストの非限定的な例には、リモナバン、タラナバン、ＶＤ６０、Ｉｓｉｓ－４１４９３０アンチセンスＣＢ１、ＪＤ５０３７、ＡＭ６５４５およびＴＭ３８８３７が含まれる。リモナバンなどのＣＢ１アンタゴニストは、細胞増殖を阻害し、筋線維芽細胞へ遷移することによって線維症に介在する初代ヒト肝星細胞（ＨＳＣ）における線維化促進性（pro－fibrotic）遺伝子発現を下方制御することが示されている（Patsenker et al., 2011, Mol Med.,17(11－12):1285－1294）。$CCl_4$誘導性肝線維症マウスモデルにおいて、ＣＢ１アンタゴニストＶＤ６０（３，４，２２－３－デメトキシカルボニル－３－ヒドロキシルメチル－４－デアセチル－ビンドリン ３，４－チオノカーボネート）は、線維化促進性（pro－fibrotic）遺伝子発現（αコラーゲン）の産生および活性化した肝星細胞（ＨＳＣ株ＬＸ－２）の増殖を阻害することが証明されたが、選択的ＣＢ１アゴニストＡＣＥＡ（Ｎ－（２－クロロエチル）－５Ｚ，８Ｚ，１１Ｚ，１４Ｚ－エイコサテトラエンアミド）は、この効果を阻害した（Wei Y. et al., 2014, Exp. Biol. Med. 239(2):183－192）。ＣＢ１アンタゴニストＪＤ５０３７は、内在性カンナビノイド誘発性のインスリンシグナル伝達の阻害を逆転することが示された（Cinar et al., 2014, Hepatology, 59(1)143－153）。リモナバンを用いるＣＢ１遮断は、高脂肪食ラットから単離された脂肪細胞におけるグルコース取り込みの炎症誘発性障害を逆転させる（Miranville et al, 2010, Obesity 18: 2247－2254）。

【０１０６】

ヒトの試験はまた、末梢性ＣＢ１受容体を疾患の病因および進行に関連付ける。例えば、ＮＡＳＨおよびＨＣＶ患者の肝臓におけるＣＢ１の上方制御は、肝脂肪症および線維症の重篤度と相関した（Auguet et al., 2014, BioMed Res. Intl. Vol. 2014, Article ID 502542）。加えて、慢性ＣＢ１アゴニスト作用（大麻使用を介する）は、ＨＣＶ患者における肝脂肪症および線維症の増加した重篤度と相関した（Van der Poorten et al., 2010, PlosOne 5, e12841）。さらに、肥満患者でのＣＢ１遮断が肝脂肪症を改善することが示された（Despres et al., 2009, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29:416－423）。

【０１０７】

ＣＢ１アンタゴニスト作用の効果は、受容体の場所によって異なることもまた認識され得る。例えば、ＣＢ１アンタゴニスト作用の効果は、患者において観察されるリモナバンの有益な心血管効果が体重減少とは無関係であるように、組織特異的であることが知られている（Pi－Sunyeret al, 2006, J Am Coll Cardio. 147: 362A）。さらに、リモナバンは、２型糖尿病患者の血糖コントロールを改善するが（例えば、Hollander et al., 2010, 糖尿病 Care. 33(3):605－7を参照のこと）、この効果は、ＣＮＳに局在するＣＢ１受容体によってもたらされる顕著な精神的副作用を伴うことが知られている（Kunos et al, 2009, Trends Pharmacol Sci 30:1－7; Moreira et al., 2009, Rev Bras Psiquiatr. 31(2):145－53; Pacher et al, 2013, FEBS J. 280(9): 1918－1943）。ＣＢ１受容体アンタゴニストリモナバンは、肥満－脂質におけるリモナバン（ＲＩＯ－脂質）試験により、過体重患者において、いくつかの代謝性危険因子（アディポネクチンレベルを含む）のプロファイルを改善することが示された（例えば、Despreus et al., 2005, N Engl J Med, 353:2121－2134を参照のこと）。

【０１０８】

ＣＢ１受容体シグナル伝達は、とりわけ、疼痛、ＭＳ痙縮および緑内障において有益な活性を示すことが示されている（Pacher et al., 2013, FEBS J. 280(9):1918－1943）。ある態様において、本明細書に記載のアゴニスト性ＣＢ１受容体抗体およびそのフラグメントは、疼痛、ＭＳ痙縮または緑内障の処置または予防に使用されるとき、有益な効果をもたらす。ＣＢ１アゴニストは、肝臓の脂肪酸合成、糖新生および他の代謝経路を活性化することが証明されている（例えば、Osei－Hyiaman et al, 2005, J. Clin. Invest., 115(5):1298－1305; Chanda et al., 2012, JBC, 287(45):38041－38049を参照のこと）。

【０１０９】

多発性硬化症（ＭＳ）痙縮は、筋肉のこわばり感（feelings of stiffness）および広範な不随意筋収縮（持続的な筋収縮または突然の動き）を意味する。痙縮は、ＭＳのより一般的な症状の一つであり、軽度の圧迫感から痛みを伴う、四肢の制御不能な痙攣まで程度が変わり得る。未処理のままの痙縮は、関節拘縮（硬化または固定化された関節）および褥瘡を含む重篤な合併症につながり得る。ＭＳ痙縮に対する現在の処置剤には、とりわけ、バクロフェン、チザニジン、ジアゼパム、ダントロレン、フェノールが含まれる。ＣＢ１受容体は、ＭＳのマウスモデルにおける痙縮の制御に介在することが示されている（Pryce et al., 2007, Br J Pharmacol. 150(4): 519－525）。

【０１１０】

ＣＢ１受容体の活性化は、胃腸管から生じる内臓痛を含む、いくつかの実験的疼痛モデルにおける鎮痛効果を生じる。ＷＩＮ５５，２１２－２およびＳＡＢ－３７８などのＣＢ１アゴニストはまた、反復有害刺激に対する疼痛関連応答を阻害することも示されている（Brusberg et al., 2009, J. Neuroscience, 29(5):1554－1564; Talwar et al., 2011, CNS Neurol Disord Drug Targets. 10(5):536－44.）。

【０１１１】

当業者は、抗体（または追加の治療剤）の無毒な有効量が、常套的実験によりＣＢ１関連疾患または障害を処置する目的を達成し得るかどうかを決定することができる。例えば、ポリペプチドの治療的に活性な量は、疾患のステージ（例えば、ステージＩ　対　ステージＩＶ）、対象の年齢、性別、合併症（例えば、免疫抑制状態または疾患）および体重、ならびに対象における所望の応答を誘発する抗体の能力などの要因によって異なり得る

。投与量レジメンは、最適な治療応答を提供するように調整することができる。例えば、いくつかの分割用量が、毎日投与されてよいか、または該用量を、治療状況の緊急性によって示されるように、比例的に減少させてよい。しかしながら、一般的に、有効投与量は、体重１キログラム当たり、１日当たり、約０．０５から１００ｍｇの範囲であることが期待され、一態様において、体重１キログラム当たり、１日当たり、約０．５から１０ｍｇである。

【０１１２】

ある態様において、本明細書に記載の抗ＣＢ１抗体およびフラグメントは、併用療法を利用する方法で使用されており、ここで、ヒト抗体は、他の標的に結合する１つまたはそれ以上の追加の抗体（例えば、他のサイトカインに結合する抗体または細胞表面分子に結合する抗体）のような、別の治療剤と共に対象に投与される。シグナル伝達経路の余剰性(redundancies)は、結果として単一抗体への応答の欠如をもたらし得るため、同じ標的細胞上の異なるエピトープまたは異なる抗原に結合する抗体との併用療法を使用する多様な戦略が、提案されている。抗ＣＤ２０および抗ＣＤ２２（Stein et al., Clin Cancer Res 2004, 10:2868－2878）、抗ＣＤ２０および抗ＨＬＡ－ＤＲ（Tobin et al., Leuk Lymphoma 2007, 48:944－956）、抗ＣＤ２０および抗ＴＲＡＩＬ－Ｒ１（Maddipatla et al., Clin Cancer Res 2007, 13:4556－4564）、抗ＩＧＦ－１Ｒおよび抗ＥＧＦＲ（Goetsche et al., Int J Cancer 2005, 113:316－328）、抗ＩＧＦ－１Ｒおよび抗ＶＥＧＦ（Shang et al., Mol Cancer Ther 2008, 7:2599－2608）、またはヒトＥＧＦＲ２の異なる領域を標的とするトラスツマブおよびペルツズマブ（Nahta et al., 癌 Res 2004, 64:2343－2346）などの組み合わせが、前臨床評価されており、インビトロおよびインビボにおける、増強された、または相乗的抗腫瘍活性が示されている。このような併用療法は、有利には、投与される治療剤のより低い投与量を利用することができ、種々の単剤療法に関連する可能性のある毒性または合併症を回避することができる。

【０１１３】

本明細書に記載の抗体およびフラグメントは、任意の所望の治療剤と組み合わせて投与することができる。任意の態様において、本明細書に記載の抗体およびフラグメントは、例えば、ＬＯＸＬ２抗体、ＴＧＦβ抗体、ニンテダニブ、チロシンキナーゼ阻害剤、ＰＰＡＲアゴニスト、ファルネソイドｘ受容体（ＦＸＲ）アゴニスト、グルカゴン様ペプチド１受容体アゴニスト、またはカスパーゼ阻害剤と組み合わせて投与される。

【０１１４】

ＩＶ．医薬組成物

別の面において、本発明は、抗ＣＢ１抗体、またはそのフラグメントを含む医薬組成物を提供する。

【０１１５】

本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントの製造法および対象へのその投与法は、周知であるか、当業者により容易に決定される。本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントの投与経路は、経口、非経腸、吸入または局所投与であり得る。本明細書で用いる用語「非経腸」には、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸または膣内投与が含まれる。非経腸投与の静脈内、動脈内、皮下および筋肉内形態は、特定の態様において使用できる。投与の全てのこれらの形態は明確に本明細書に記載の範囲内であると考えられるが、投与のための形態は、特に静脈内または動脈内注射または点滴のための、注射用溶液であり得る。通常、好適な注射用医薬組成物は、緩衝液（例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、要すれば安定化剤（例えば、ヒトアルブミン）などを含んでいてよい。しかしながら、本明細書の記載に適合する他の方法において、ポリペプチドは、有害細胞集団の部位に直接送達され得て、それにより罹患組織の治療剤への暴露を増加させることができる。

【０１１６】

非経腸投与用製剤には、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液およびエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油

などの植物油およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体には、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール／水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が含まれる。本発明において、薬学的に許容される担体には、０．０１－０．１Ｍ（例えば、０．０５Ｍ）のリン酸緩衝液または０．８％の生理食塩水が含まれるが、これに限定されない。他の一般的な非経腸ビークルには、リン酸ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または固定油が含まれる。静脈内ビークルには、液体および栄養補給物、電解質補給物（リンゲルデキストロースをベースとするもの）などが含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどの防腐剤および他の添加物もまた、存在していてよい。より具体的には、注射用に適する医薬組成物には、滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための、滅菌水溶液（水溶性である）または分散液および滅菌粉末が含まれる。かかる場合には、組成物は無菌でなければならず、容易に注射が可能である程度に流動性であるべきである。それは、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、一態様において、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護しなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）および好適なそれらの混合物を含む、溶媒または分散液であり得る。適当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合は必要な粒径の維持によって、および界面活性剤の使用により、維持され得る。微生物作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどにより達成され得る。任意の態様において、等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール類、例えばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムが、組成物中に含まれる。注射用組成物の持続的吸収は、組成物中に吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることにより達成することができる。

【０１１７】

何れの場合においても、滅菌注射溶液は、活性化合物（例えば、抗体自体または他の活性剤と組み合わせて）を、適当な溶媒中に必要な量で、必要に応じて本明細書に記載の１成分または成分の組合せと共に、組み込み、その後濾過滅菌することによって調製することができる。一般的に、分散液は、滅菌ビークル中に活性化合物を組み込むことによって調製され、それは基本的な分散媒体および上記に列記した必要な他の成分を含む。滅菌注射溶液の製造のための滅菌粉末の場合、製造法は、真空乾燥および凍結乾燥することであり、活性成分と予め濾過滅菌したその溶液からの任意の追加の所望の成分との粉末を得る。注射用製剤は、当技術分野で公知の方法に従って無菌条件下で、処理され、アンプル、バッグ、ボトル、シリンジ、またはバイアルなどの容器に充填され、そして密封される。さらに、該製剤は、同時継続中の米国特許出願第０９／２５９，３３７号および同第０９／２５９，３３８号（それぞれ、引用により本明細書中に包含させる）に記載されるようなキットの形態で包装され、販売されてよい。一態様において、かかる製品は、関連する組成物が、自己免疫疾患または腫瘍性疾患に罹患している、またはそれに罹患しやすい対象を処置するのに有用であることを示す、ラベルまたは添付文書を含む。

【０１１８】

上記の状態の処置のための、本明細書に記載される安定化された抗体またはそのフラグメントの有効用量は、投与の手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか、または動物であるか、投与される他の薬剤および処置が予防であるか、または治療であるかを含む多くの異なる要因に依存して変化する。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含む非ヒト哺乳動物もまた処置できる。治療用投与量は、安全性および有効性を最適化するために、当業者に公知の常套法を用いて増量されてよい。

【０１１９】

本明細書に記載の抗体を用いた受動免疫のため、投与量は、宿主体重１ｋｇ当たり、例えば約０．０００１から１００ｍｇの範囲、より一般的には、０．０１から５ｍｇ（例えば、０．０２ｍｇ、０．２５ｍｇ、０．５ｍｇ、０．７５ｍｇ、１ｍｇ、２ｍｇなど）で

あり得る。例えば、投与量は、体重１ｋｇ当たり、１ｍｇまたは１０ｍｇ、または１－１０ｍｇの範囲内、または特定の態様において、少なくとも１ｍｇであり得る。上記の範囲の中間用量もまた、本明細書に記載の範囲内であることが意図される。

【０１２０】

対象は、かかる用量を毎日、隔日、毎週、または経験的分析によって決定された任意の他のスケジュールに従って投与され得る。例示的な処置は、長期間、例えば、少なくとも６か月の期間に亘って複数回投与での投与を必要とする。さらなる例示的な処置レジメンは、２週間毎に１回、または月に１回、または３から６カ月に１回の投与を必要とする。例示的な投与スケジュールには、毎日１－１０ｍｇ／ｋｇもしくは１５ｍｇ／ｋｇ、隔日３０ｍｇ／ｋｇ、または毎週６０ｍｇ／ｋｇが含まれる。ある方法において、異なる結合特異性を有する２つまたはそれ以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、その場合、投与される各抗体の投与量は、示された範囲内に入り得る。

【０１２１】

本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントは、複数回投与することができる。単回投与間の間隔は、例えば、毎日、毎週、毎月または毎年とすることができる。間隔は、患者内のポリペプチドまたは標的分子の血中レベルを測定することにより示されるように不規則であってもよい。ある方法において、投与量は、特定の血漿抗体または毒素濃度、例えば、１－１０００ｕｇ／ｍｌまたは２５－３００ｕｇ／ｍｌを達成するように調整される。あるいは、抗体またはそのフラグメントは、持続放出製剤として投与されてよく、その場合、より少ない頻度の投与でよい。投与量および頻度は、患者内での抗体の半減期に応じて変化する。一般的に、ヒト化抗体は、最長の半減期を示し、キメラ抗体および非ヒト抗体が続く。一態様において、本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントは、非コンジュゲート形態で投与され得る。別の態様において、本明細書に記載の抗体は、コンジュゲート形態で複数回投与され得る。さらに別の態様において、本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントは、非コンジュゲート形態で投与され、その後コンジュゲート形態で投与されるか、その逆で投与されてもよい。

【０１２２】

投与量および投与頻度は、処置が予防であるか、または治療であるかによって変化する。予防的適用において、本発明の抗体またはそのカクテルを含む組成物は、未だ疾患状態ではない患者に投与され、患者の抵抗力を向上させる。そのような量は、“予防的有効用量”と定義される。この使用において、正確な量はまた、患者の健康状態および全身免疫によって変わるが、一般的に１用量当たり、０．１から２５ｍｇの範囲、とりわけ０．５から２．５ｍｇの範囲である。比較的低用量が、長期間にわたって比較的低頻度の間隔で投与される。ある患者は、自分たちの残りの生存期間中治療を受け続ける。

【０１２３】

治療的適用において、比較的短い間隔で比較的高用量（例えば、１用量当たり約１から４００ｍｇ／ｋｇの抗体であり、放射性免疫複合体についてより一般的に使用される５から２５ｍｇの投与量および細胞毒素－薬物複合体分子についてより高用量である）が、疾患の進行が低下または終結するまで、特定の態様において、患者が疾患症状の部分的または完全な改善を示すまで必要とされることが多い。その後、患者は予防的レジメを投与され得る。

【０１２４】

一態様において、対象は、本明細書に記載のポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、ベクター中）を用いて処置され得る。ポリペプチドをコードする核酸の用量は、患者当たり、約１０ｎｇから１ｇ、１００ｎｇから１００ｍｇ、１ｕｇから１０ｍｇ、または３０－３００ｕｇのＤＮＡの範囲である。感染性ウイルスベクターの用量は、１用量当たり、１０－１００ウイルス粒子、またはそれ以上である。

【０１２５】

治療剤は、予防的または治療的処置のために、非経腸、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、腹腔内、鼻腔内または筋肉内投与手段によって投与される。筋肉内注射ま

たは静脈内注入は、本明細書に記載の抗体の投与に使用可能である。ある方法において、治療用抗体またはそのフラグメントは、頭蓋内に直接注射される。ある方法において、抗体またはそのフラグメントは、持続放出組成物またはＭｅｄｉｐａｄ(商標)装置のようなデバイスとして投与される。

【０１２６】

本明細書に記載の薬剤は、必要に応じて、（例えば、予防的または治療的）処置を必要とする障害または状態を処置するのに有効な他の薬剤と組み合わせて投与され得る。さらなる薬剤は、当技術分野で認識され、特定の障害のために常套的に投与されるものである。

【０１２７】

かなりの数の臨床経験が１３１Ｉおよび９０Ｙで得られているが、他の放射性標識が、当技術分野で公知であり、同様の目的のために使用されている。さらに他の放射性同位体が画像化するために使用されている。例えば、本発明の範囲と互換性のあるさらなる放射性同位体には、１２３Ｉ、１２５Ｉ、３２Ｐ、５７Ｃｏ、６４Ｃｕ、６７Ｃｕ、７７Ｂｒ、８１Ｒｂ、８１Ｋｒ、８７Ｓｒ、１１３Ｉｎ、１２７Ｃｓ、１２９Ｃｓ、１３２Ｉ、１９７Ｈｇ、２０３Ｐｂ、２０６Ｂｉ、１７７Ｌｕ、１８６Ｒｅ、２１２Ｐｂ、２１２Ｂｉ、４７Ｓｃ、１０５Ｒｈ、１０９Ｐｄ、１５３Ｓｍ、１８８Ｒｅ、１９９Ａｕ、２２５Ａｃ、２１１Ａ、２１３Ｂｉが含まれるが、これに限定されない。この点で、α、γおよびβ放射体は、本発明において全て互換性がある。さらに、更に本開示を考慮して、当業者は、過度の実験をすることなく選択した治療コースと適合する放射性核種を容易に決定できることを述べておく。このために、既に臨床診断に使用されている追加の放射性核種には、１２５Ｉ、１２３Ｉ、９９Ｔｃ、４３Ｋ、５２Ｆｅ、６７Ｇａ、６８Ｇａ、ならびに１１１Ｉｎが含まれる。抗体はまた、標的化免疫療法での潜在的使用のために種々の放射性核種によって標識されている（Peirersz et al. Immunol. Cell Biol. 65: 111, 1987）。これらの放射性核種には、１８８Ｒｅおよび１８６Ｒｅ、ならびにより少ない程度の１９９Ａｕおよび６７Ｃｕが含まれる。米国特許第５，４６０，７８５号は、このような放射性同位体に関する追加のデータを提供し、それは引用により本明細書に包含される。

【０１２８】

上記の通り、本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントは、哺乳動物の疾患のインビボでの処置のために薬学的に有効な量で投与され得る。この点に関して、本明細書に記載の抗体またはそのフラグメントは、投与を容易にし、活性成分の安定性を促進するために製剤され得ることが理解され得る。任意の態様において、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される、非毒性の、滅菌担体、例えば生理食塩水、非毒性緩衝液、防腐剤などを含む。本発明の目的のために、治療剤にコンジュゲートまたは非コンジュゲートされた本明細書に記載の薬学的に有効量の抗体は、標的への有効な結合を達成するのに十分な量、また利益を達成する、例えば疾患または障害の症状を改善するのに十分な量、または物質もしくは細胞を検出するのに十分な量を意味するとみなされる。腫瘍細胞の場合、ポリペプチドは、特定の態様において、腫瘍細胞または免疫反応性細胞の選択した免疫反応性抗原と相互作用することができ、これらの細胞の細胞死を増加させ得る。もちろん、本明細書に記載の医薬組成物は、薬学的に有効量のポリペプチドを提供するために単回用量または複数回用量で投与され得る。

【０１２９】

本開示の範囲に従って、本明細書に記載の抗体は、上述の治療方法に従って、治療効果は予防効果を生じさせるのに十分な量でヒトもしくは他の動物に投与され得る。本明細書に記載のポリペプチドは、このようなヒトもしくは他の動物に、既知の方法に従って、本明細書に記載の抗体を従来の薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせることにより調製された常套の投与量で投与され得る。当業者は、薬学的に許容される担体または希釈剤の形態および特徴が、それと組み合わせる活性成分の量、投与経路および他の周知の変形によって決定されることを理解し得る。当業者は、本発明によるポリペプチドの１種またはそれ以上を含むカクテルが特に有効であると立証し得ることを、さらに理解し得

る。
【０１３０】
また、本明細書中、患者または他の対象に、薬学的に有効量のＣＢ１抗体を、経口投与、注射溶液による非経腸投与、吸入、または局所投与することを含む、ＣＢ１の増加した発現またはＣＢ１に対する増加した感受性により引き起こされる状態を治療する方法も記載される。
【０１３１】
また、本明細書中、患者または他の対象に、経口投与、注射溶液による非経腸投与、吸入、または局所投与することを含む、ＣＢ１の増加した発現またはＣＢ１に対する増加した感受性により引き起こされる状態を処置するための医薬の製造を目的とする、薬学的に有効量のＣＢ１抗体の使用も記載される。
【０１３２】
ある態様において、記載された単離された抗体およびその抗原結合フラグメントは、最小限の脳透過性という利点を有する。ある態様において、単離された抗体およびそのフラグメントは、ＣＮＳ副作用が最小化されるように、ＣＢ１受容体に対する高い選択性を示し、血液脳関門を通過しない、または小分子ＣＢ１受容体化合物と比較して低い血液脳関門のの透過性を示す。さらなる態様において、単離された抗体およびそのフラグメントは、静脈内注射後、血液脳関門を通過しないか、またはリモナバンなどの小分子ＣＢ１受容体化合物と比較して低い血液脳関門の通過を示す。
【０１３３】
一態様において、本明細書に記載の抗体およびその結合フラグメントまたは変異体は、非経腸、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳内、結腸内、頸管内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内の、腹腔内、胸腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液包内、胸腔内、鼓室内、子宮内、膀胱内、硝子体内、ボーラス注入、結膜下、経膣、経直腸、口腔、舌下、鼻腔内、および経皮から選択される少なくとも１つの経路により対象に投与され得る。
【０１３４】
本発明は、単離された抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびにかかる抗体およびフラグメントをコードする核酸、ならびにかかる単離された抗体、フラグメントおよび核酸を含む組成物を提供する。本発明はさらに、単離された抗体またはそのフラグメント、あるいはかかる抗体またはフラグメントをコードする核酸を含み、かつ１つまたはそれ以上の薬学的に許容される担体をさらに含む医薬組成物を提供する。薬学的に許容される担体には、例えば、賦形剤、希釈剤、封入材、充填剤、緩衝剤、または他の薬剤が含まれる。
【０１３５】
特定の面および態様の説明
本明細書に記載の他の面およびそれらの態様は、互いに組み合わせることができる。加えて、上記の何れかの面およびそれらの態様は、以下の特定の面および態様のいずれかと組み合わせることができる。
【０１３６】
さらに本発明を説明するのに役立ついくつかの特定の面および態様を以下に提供する：
【０１３７】
１．カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に対して約１μＭまたはそれ未満の結合親和性Ｋｄを有する、該ＣＢ１受容体に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１３８】
２．カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に対して約１００ｎＭまたはそれ未満の結合親和性Ｋｄを有する、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１３９】
３．カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に対して約１０ｎＭまたはそれ未満の結合親和性

Ｋｄを有する、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１４０】
４．カンナビノイド１（ＣＢ１）受容体に対して約１ｎＭまたはそれ未満の結合親和性Ｋｄを有する、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１４１】
５．ＣＢ１受容体上の細胞外エピトープに結合する、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１４２】
６．ヒトＣＢ１受容体に結合する、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１４３】
７．ＣＢ１受容体のシグナル伝達活性を阻害する、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１４４】
８．抗体またはフラグメントが、小分子リモナバンと比較して少なくとも同等の効力のＣＢ１受容体シグナル伝達阻害活性を有し、該効力が、ｃＡＭＰアッセイにおいて、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するシグナル伝達の阻害により測定される、態様７に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１４５】
９．抗体またはフラグメントが、小分子リモナバンと比較して少なくとも３倍以上の効力のＣＢ１受容体シグナル伝達阻害活性を有し、該効力が、ｃＡＭＰアッセイにおいて、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するシグナル伝達の阻害により測定される、態様７に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１４６】
１０．抗体またはフラグメントが、小分子リモナバンと比較して少なくとも同等の効力のＣＢ１受容体シグナル伝達阻害活性を有し、該効力が、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するＥＲＫリン酸化により測定される、態様７に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１４７】
１１．抗体またはフラグメントが、小分子リモナバンと比較して少なくとも３倍以上の効力のＣＢ１受容体シグナル伝達阻害活性を有し、該効力が、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するＥＲＫリン酸化により測定される、態様７に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１４８】
１２．抗体またはフラグメントがＣＢ１受容体活性を活性化するか、または増強する、態様１に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１４９】
１３．抗体またはフラグメントが、ＣＢ１受容体のアロステリックモジュレーターである、態様１に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１５０】
１４．抗体またはフラグメントが、ＣＢ１受容体のインバースアゴニストである、態様１に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１５１】
１５．抗体またはフラグメントがマウスのものである、態様１に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１５２】
１６．抗体またはフラグメントがキメラである、態様１に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１５３】
１７．抗体またはフラグメントがヒト化されている、態様１に記載の単離された抗体また

は抗原結合フラグメント。
【０１５４】
１８．抗体またはフラグメントが、ＣＢ１に選択的に結合する、態様１に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。
【０１５５】
１９．抗体が、薬剤、例えば、追加の治療剤、細胞毒性剤、免疫付着分子、または造影剤と複合体を形成している、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１５６】
２０．薬剤が、追加の治療剤、細胞毒性剤、免疫付着分子、または造影剤である、態様１９に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１５７】
２１．　　治療剤がリモナバンである、態様２０に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１５８】
２２．造影剤が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識、およびビオチンからなる群より選択される、態様２０に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１５９】
２３．抗体が、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有さない、態様１８に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６０】
２４．ＣＢ１受容体への結合に対して態様１に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと競合し得る、抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６１】
２５．態様１に記載の抗体または抗原結合フラグメントと本質的に同じＣＢ１受容体上のエピトープに特異的に結合することができる、抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６２】
２６．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号２、１０、１８および２６からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；ならびに、
配列番号６、１４、２２および３０からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６３】
２７．抗体またはフラグメントが、配列番号４、１２、２０および２８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；ならびに
配列番号８、１６、２４および３２からなる群より選択される軽鎖定常領域を含む、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６４】
２８．抗体またはそのフラグメントが、配列番号２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号４に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号６に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；ならびに、配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６５】
２９．抗体またはそのフラグメントが、配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号１２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；ならびに、配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６６】
３０．抗体またはそのフラグメントが、配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号２２に記載の

アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；ならびに、配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６７】
３１．抗体またはそのフラグメントが、配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域；配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；ならびに、配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む、態様１に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１６８】
３２．ＣＢ１受容体を発現する細胞と態様１に記載の抗体または結合フラグメントとを接触させることを含む、ＣＢ１をアンタゴナイズする方法。
【０１６９】
３３．ＣＢ１受容体を発現する細胞と態様１に記載の抗体または結合フラグメントとを接触させることを含む、ＣＢ１をアゴナイズする方法。
【０１７０】
３４．態様１に記載の抗体または抗原結合フラグメントをそれを必要とする対象に投与することを含む、該対象におけるＣＢ１受容体のアンタゴニスト作用またはアゴニスト作用に応答する疾患または障害の処置法。
【０１７１】
３５．対象がヒトである、態様３４に記載の方法。
【０１７２】
３６．細胞と態様１に記載の抗体または抗原結合フラグメントを接触させることを含む、ＣＢ１の検出法。
【０１７３】
３７．疾患または障害が、肥満、糖尿病、異脂肪血症、代謝性疾患、線維症、非アルコール性脂肪性肝炎（ＮＡＳＨ）、肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、腎疾患、腎線維症、慢性腎疾患、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患、癌および炎症性疾患からなる群より選択される態様３４に記載の方法。
【０１７４】
３８．疾患または障害が、疼痛、多発性硬化症の痙縮および緑内障からなる群より選択される、態様３４に記載の方法
【０１７５】
３９．疾患または障害が線維症である、態様３７に記載の方法。
【０１７６】
４０．抗体または抗原結合フラグメントがＣＢ１をアンタゴナイズする、態様３７に記載の方法。
【０１７７】
４１．抗原結合フラグメントがＣＢ１をアゴナイズする、態様３８に記載の方法。
【０１７８】
４２．細胞と態様１に記載の抗体または抗原結合フラグメントを接触させることを含む、ＣＢ１と関連する疾患または障害を診断するための方法
【０１７９】
４３．細胞と態様１に記載の抗体またはそのフラグメントを接触させることによりＣＢ１発現を測定することを含む、ＣＢ１と関連する疾患または障害を有すると診断された対象の予後を決定するための方法。
【０１８０】
４４．疾患または障害が、肥満、糖尿病、異脂肪血症、代謝性疾患、線維症、ＮＡＳＨ、肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、腎疾患、腎線維症、慢性腎疾患、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患、癌、炎症性疾患、疼痛、ＭＳ痙縮、および緑内障を含む眼疾患からなる群より選択される、請求項４３または４３に記載の方法。
【０１８１】

４５．疾患または障害が線維症である、態様４４に記載の方法。
【０１８２】
４６．単離された抗体またはその抗原結合フラグメントが、造影剤と複合体を形成している、態様３６に記載の方法。
【０１８３】
４７．造影剤が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識、およびビオチンからなる群より選択される、態様４６に記載の方法。
【０１８４】
４８．細胞が対象内に存在する、態様４２または４３に記載の方法。
【０１８５】
４９．対象がヒトである、態様４８に記載の方法。
【０１８６】
５０．態様１に記載の単離された抗体またはフラグメントを発現する宿主細胞。
【０１８７】
５１．哺乳動物を、精製したＣＢ１受容体またはその抗原フラグメント、ＣＢ１／脂質複合体、および／またはＣＢ１受容体ＤＮＡを用いて免疫化することを含む、ＣＢ１に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの作製法。
【０１８８】
５２．抗体またはそのフラグメントが、免疫化された哺乳動物由来の細胞を含むハイブリドーマ細胞株から作製される、態様５１に記載の方法。
【０１８９】
５３．抗体またはそのフラグメントがファージライブラリーから作製される、態様５１に記載の方法。
【０１９０】
５４．ヒト初代血中リンパ球由来の可変重鎖および軽鎖領域を含むファージライブラリーを作製し、該ファージライブラリーをＣＢ１受容体結合についてパンニングすることを含む、ＣＢ１に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの作製法。
【０１９１】
５５．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３５２、３５３および３５４のそれぞれで示される重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１９２】
５６．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３５５、３５６および３５７のそれぞれで示される軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１９３】
５７．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３５２、３５３および３５４のそれぞれで示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１９４】
５８．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３５５、３５６および３５７のそれぞれで示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％または少なくとも９９％の相同性を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１９５】

６０．態様１から５９のいずれかの、または本明細書に記載の、抗体または抗原結合フラグメントと同じエピトープに特異的に結合する、抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１９６】
６１．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号４４３－４６３からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１；配列番号４６４－５７７からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２；および、配列番号５７８－６２５からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１９７】
６１．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号６２６－６６１からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１；配列番号６６２－７４２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２；および、配列番号７４２－８２４からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０１９８】
６２．抗体またはその抗原結合フラグメントがヒト化抗体である、態様１に記載の単離された抗体またはそのフラグメント。
【０１９９】
６３．抗体またはその抗原結合フラグメントが、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域を含む、本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０２００】
６４．抗体またはその抗原結合フラグメントが修飾されたＦｃ領域を含む、態様１から６３のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０２０１】
６５．抗体またはその抗原結合フラグメントが、ＩｇＧ２／ＩｇＧ４ハイブリッド、Ａ３３０ＳおよびＰ３３１Ｓ変異を含むＩｇＧ２、ならびにＳ２２８Ｐ変異を含むＩｇＧ４からなる群より選択されるＦｃ領域を含む、態様６４に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０２０２】
６６．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３３９－３４１からなる群より選択される重鎖可変領域アミノ酸配列、および要すれば、配列番号３３７に記載の軽鎖可変領域を含む、カンナビノイド受容体１（ＣＢ１）に結合する単離された抗体またはその抗原結合フラグメント
【０２０３】
６７．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３４２に記載の重鎖定常領域を含む、態様６６に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０２０４】
６８．抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号３４３－３５１からなる群より選択される重鎖アミノ酸配列、および配列番号３３８に記載の軽鎖アミノ酸配列を含む、態様６６に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０２０５】
６９．配列番号３４１を含む重鎖可変領域、および配列番号４３３、配列番号４３４または配列番号４３５を含む重鎖定常領域を含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０２０６】
７０．配列番号３４０を含む重鎖可変領域、および配列番号４３３、配列番号４３４または配列番号４３５を含む重鎖定常領域を含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。
【０２０７】
７１．配列番号１－３５１および配列番号４３６－８２４からなる群より選択されるアミ

ノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％同一である、核酸配列またはアミノ酸配列を含む、単離された抗体またはそのフラグメント。

【０２０８】

７２．抗体またはフラグメントが、ＣＢ１受容体に対して約１００ｎＭまたはそれ未満の結合親和性Ｋｄを有する、ＣＢ１に結合する単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

【０２０９】

７３．抗体またはフラグメントが、ＣＢ１受容体に対して約５ｎＭまたはそれ未満の結合親和性Ｋｄを有する、態様７２に記載の単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

【０２１０】

７４．抗体またはフラグメントが、小分子リモナバンと比較して少なくとも１０倍以上の効力のＣＢ１受容体阻害活性を有し、該効力が、ｃＡＭＰアッセイにおいて、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するシグナル伝達の阻害により測定される、ＣＢ１に結合する単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

【０２１１】

７５．抗体またはフラグメントが、小分子リモナバンと比較して少なくとも５倍以上の効力のＣＢ１受容体シグナル伝達阻害活性を有し、該効力が、ｃＡＭＰアッセイにおいて、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するシグナル伝達の阻害により測定される、態様７４に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。

【０２１２】

７６．抗体またはフラグメントが、小分子リモナバンと比較して少なくとも同等の効力のＣＢ１受容体シグナル伝達阻害活性を有し、該効力が、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するシグナル伝達の阻害により測定される、態様７４に記載の単離された抗体または抗原結合フラグメント。

【０２１３】

７７．抗体またはフラグメントが、対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体よりも強い効力を示し、該ヒト化抗体またはフラグメントおよび対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体が、同じ重鎖および軽鎖ＣＤＲを含み、そして該効力が、ｃＡＭＰアッセイにおいて、ＣＢ１受容体アゴニストが介在するシグナル伝達の阻害により測定される、ＣＢ１に結合する単離されたヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント。

【０２１４】

７８．ヒト化抗体またはフラグメントが、対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体またはフラグメントと比較して少なくとも２倍以上の効力のＣＢ１受容体阻害活性を有する、態様７７に記載の単離されたヒト化抗体または抗原結合フラグメント。

【０２１５】

７９．ヒト化抗体またはフラグメントが、対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体またはフラグメントと比較して少なくとも３倍以上の効力のＣＢ１受容体阻害活性を有する、態様７８に記載の単離されたヒト化抗体または抗原結合フラグメント。

【０２１６】

８０．ヒト化抗体またはフラグメントが、対応する非ヒト化抗体またはキメラ抗体またはフラグメントと比較して少なくとも５倍以上の効力のＣＢ１受容体阻害活性を有する、態様７９に記載の単離されたヒト化抗体または抗原結合フラグメント。

【０２１７】

８１．抗体またはフラグメントが、低下した脳透過性または脳透過性がないことを示す、態様１から８０のいずれかに記載の単離されたヒト化抗体または抗原結合フラグメント。

【０２１８】

８２．抗体またはフラグメントの脳透過性が、小分子ＣＢ１受容体アゴニストまたはアンタゴニストと比較して低下した脳透過性を示す、態様８１に記載の単離されたヒト化抗体

または抗原結合フラグメント。
【０２１９】
８３．抗体またはフラグメントが、小分子ＣＢ１受容体アゴニストまたはアンタゴニストと比較して減少した中枢神経系（ＣＮＳ）副作用を示す、態様８１に記載の単離されたヒト化抗体または抗原結合フラグメント。
【０２２０】
８４．小分子ＣＢ１受容体アゴニストまたはアンタゴニストが、ＡＭ６５４５、ＡＭ２５１、タラナバンまたはリモナバンである、態様８３に記載の単離されたヒト化抗体または抗原結合フラグメント。
【０２２１】
８５．態様５５－８４のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをそれを必要とする態様に投与することを含む、該対象におけるＣＢ１受容体のアンタゴニスト作用またはアゴニスト作用に応答する疾患または障害の処置法。
【０２２２】
８６．対象がヒトである、態様８５に記載の方法。
【０２２３】
８７．該疾患または障害が、肥満、糖尿病、異脂肪血症、代謝性疾患、線維症、ＮＡＳＨ、肝疾患、原発性胆汁性肝硬変、腎疾患、腎線維症、慢性腎疾患、骨粗鬆症、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患、癌、炎症性疾患、疼痛、ＭＳ痙縮、および緑内障を含む眼疾患からなる群より選択される、態様８５に記載の方法。
【０２２４】
８８．抗体または抗原結合フラグメントが低下した脳透過性または脳透過性がないことを示す、態様８５に記載の方法。
【０２２５】
上記の本発明は、理解を明確にする目的のために説明および例示によっていくつか詳細に記載されているが、特定の変更および改変が、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなくなされ得ることは、本発明の教示に照らして当業者に容易に理解され得る。以下の実施例は、説明のみのために提供され、それに限定するものではない。当業者は、本質的に同様の結果を得るために変更または改変することができる種々の重要でないパラメータを容易に認識し得る。
【実施例】
【０２２６】
実施例１．ＣＢ１受容体抗体の作製のためのマウスの免疫化
ヒトＣＢ１受容体のクローニングのためのｃＤＮＡ配列およびプライマーは、ｐｕｂｍｅｄのＮＣＢＩ参照配列ｎＭ＿００１１６０２５８に基づく。ＣＢ１受容体を、２９３細胞におけるリポフェクタミンを用いる一過性発現により、または安定な細胞株の作製によって発現させた。安定な細胞株の作製のために、ｐｃＤＮＡ４／ＴＯの天然の完全長ヒトＣＢ１受容体構築物をテトラサイクリン発現誘導システムＴｒｅｘ－ＣＨＯおよびＴｒｅｘ－２９３細胞にトランスフェクトした。細胞を抗生物質ゼオシンおよびブラスチシジン下で培養した。テトラサイクリン発現誘導によりＣＢ１を発現したクローンを、Ｒ＆Ｄの抗ＣＢ１受容体抗体を用いるＦＡＣＳ染色によって同定した（クローン３６８３０２）。膜を調製し、直接免疫化に用いるか、または界面活性剤で膜タンパク質を可溶化後、ｔａｌｏｎ精製した。精製されたＣＢ１受容体を、脂質二重層に安定化させた。ＣＢ１／脂質複合体をＣＢ１受容体ｉＣＡＰＳと命名した。
【０２２７】
Ｂａｌｂ／ｃマウスを、ＣＢ１受容体ＤＮＡを用いて２回免疫し、次いで、ＣＢ１受容体膜またはＣＢ１受容体ｉＣＡＰＳを用いてブーストした。免疫化前後に血液サンプルを採取し、血清を、ＥＬＩＳＡにおいて、ＣＢ１受容体を発現する膜　対　天然の膜への結合について試験した。マウス血清が、天然の膜よりもＣＢ１受容体発現膜に対して陽性シグナルを示したとき、マウスを屠殺し、脾臓をハイブリドーマおよびファージライブラリ

ーの作成のために取り出した。
【０２２８】
実施例２．リンパ球の回収、Ｂ細胞単離、融合およびＣＢ１受容体に結合するハイブリドーマの選択
免疫化したマウスから脾臓を取り出し、単細胞懸濁液を作成した。単細胞懸濁液を作成するために、脾臓を５０ｍＬのコニカル遠心チューブの上部の面まで移し、３ｍＬシリンジのプランジャーを用いて、該脾臓の細胞を破砕した。赤血球を氷冷ＡＣＫ緩衝液で１０分間溶解させ、５ｍｌのＤＭＥＭを添加し、細胞を遠心分離した。この工程をもう一度繰り返した後、細胞を、ＤＭＥＭ培地中、２ｘ１０$^{7}$／ｍｌの濃度に再懸濁した。
【０２２９】
骨髄腫細胞の回収および調製：ＳＰ２／０細胞をおよそ５ｘ１０$^{4}$細胞／ｍＬの密度で播種し、２日毎に継代した。細胞融合の前に、親の骨髄腫細胞を、５０ｍＬのコニカル遠心チューブ中、室温（ＲＴ）にて５００ｘｇで１０分間、遠心して回収した。細胞を、３０ｍＬの無血清培地を加えて３回洗浄し、遠心分離を繰り返した。上清をピペットで除去し、細胞ペレットを２５ｍＬの培地に再懸濁し、２ｘ１０$^{7}$／ｍｌの生細胞の濃度に調整した。
【０２３０】
細胞融合：骨髄腫細胞および脾臓細胞を１：５の混合比で混ぜた。細胞混合物を１０００ｒｐｍで５分間スピンダウンし、その後上清を捨てて細胞ペレットを得た。細胞混合物を融合ワーキングバッファーで２回洗浄し、遠心して、細胞ペレットを得た。細胞ペレットを融合バッファーに穏やかに懸濁して８ｘ１０$^{7}$／ｍｌの最終細胞濃度を得た。細胞混合物を電極槽に添加し、電気融合を行った。細胞を細胞融合後に５分間放置し、ＤＭＥＭ培地で１回洗浄し、そして予め温めたＨＡＴ培地を融合細胞に添加して、０．５×１０$^{6}$Ｂ細胞／ｍｌの終濃度とした。その後、１００μｌの細胞懸濁液（５ｘ１０$^{4}$Ｂ細胞）を９６ウェルプレートの各ウェルに添加した。平均融合効率は、１ハイブリドーマ／１ｘ１０$^{4}$Ｂ細胞であるため、プロトコルは、各ウェル中に５個のハイブリドーマを目指している。
【０２３１】
ハイブリドーマ細胞培養。融合したハイブリドーマを、細胞培養インキュベーター中、５％ＣＯ２、３７℃にて培養した。ハイブリドーマの増殖条件は毎日チェックした。コロニーは、通常、５日後に見られた。培地は、ポジティブスクリーニングの前の７日目に新鮮なＤＭＥＭ培地と交換した。
【０２３２】
ポジティブスクリーニング：細胞融合の７－９日後、コロニーが大きくなったとき、各ハイブリドーマウェルからの１００μＬの上清を、新たな９６ウェルプレート上の別個のウェルに移し、ＥＬＩＳＡとＣＢ１タンパク質とを用いて分析した。
【０２３３】
実施例３．ファージライブラリーの作製およびスクリーニング
全ＲＮＡ抽出：脾臓組織をＲＮＡｌａｔｅｒ中に回収した。凍結組織の小片（～３０ｍｇ）を、液体Ｎ２で冷却したモーター内で均質化し、微粉末に粉砕した。ＴＲＩｚｏｌ(登録商標)試薬を加えて、３０秒間手で激しく振盪した。１ｍＬの溶液を室温で２－３分で１．５マイクロチューブに移し、数分間の間、室温で置いた。混合物に、溶液１ｍＬ当たり０．２ｍｌのクロロホルムを添加し、３０秒間手で激しく振盪した。混合物を５分間室温でインキュベートし、その後、４℃にて、１２，０００ｘｇで２０分間、遠心した。水相を取り出し、新しいチューブに移した。等量のイソプロピルアルコールを該チューブに加え、３０秒間混合した。室温で５分間インキュベート後、混合物を、４℃にて、１２，０００ｇで１５分間、遠心した。ペレットを、５００μＬの７５％エタノールを添加することにより洗浄し、４℃にて、１２，０００ｇで１５分間、遠心した。得られた全ＲＮＡペレットを空気乾燥させ、予想される１μｇのＲＮＡ当たり、５０μＬのＲＮａｓｅ不含有水で溶解させた。ＲＮＡサンプルの１：１０希釈のＯＤを、２６０ｎＭおよび２８０

ｎＭで測定した。

【０２３４】

ｃＤＮＡ調製：第一鎖ｃＤＮＡ合成を市販のキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号：１８０８０－０５１）を用いて行い、すなわち、２０μｇの全ＲＮＡを、４０μｌのＤＥＰＣ処理水中、５μＭのオリゴ（ｄＴ）２０および１ｍＭのｄＮＴＰと混合し、６５℃にて５分間インキュベートし、その後、８０μＬのＲＴバッファーと５ｍＭ　ＭｇＣｌ２、１０μＭ　ＤＴＴ、１６ユニットのＲＮａｓｅＯＵＴおよび８０ユニットのSuperscript III逆転写酵素とを添加した。得られた混合物を、５０℃にて５０分間インキュベートし、４μｌのＲＮａｓｅ　Ｈを添加して残留ＲＮＡを除去する前に、熱不活性化した。ｃＤＮＡを、その後のライブラリーの構築のために使用した。

【０２３５】

キメラＦａｂライブラリーを以下のように構築した。重鎖または軽鎖の可変領域を、上記で調製したマウスｃＤＮＡテンプレートを用いて、Ｂａｒｂａｓらが報告した複数の生殖細胞系列ファミリーを代表する重鎖または軽鎖特異的プライマーによって増幅させた。ヒト重鎖および軽鎖定常領域、それぞれＣｈ１およびＣＬ１を、既存のクローンｐＣＯＭ３ｘＴＴから増幅させた。重鎖可変領域および定常領域を、オーバーラップＰＣＲにより互いに連結させた。得られた重鎖および軽鎖を、再びオーバーラップＰＣＲによって連結し、キメラＦａｂ　ＤＮＡフラグメントを得て、それをライゲーションによってＳｆｉＩフラグメント挿入として改変ｐＣＯＭ３ｘベクター中にクローニングした。ライゲーションライブラリーＤＮＡを洗浄し、ＳＳ３２０高効率コンピテント細胞に形質転換した。得られた総ユニーク形質転換体の数は、少なくとも$5x10^7$であった。

【０２３６】

ファージライブラリーのパンニングのために、免疫したマウスからのファージライブラリーを、空のｉＣＡＰＳでコーティングされたＭａｘｉｓｏｒｐイムノチューブ（Thermo Scientific）中、２回サブトラクションし、その後、ビオチニル化ブリルタンパク質でコーティングしたＤｙｎａｂｅａｄｓのＭｙＯｎｅストレプトアビジンＴ１（Life Technologies）で２回サブトラクションした。全てのサブトラクション工程は３０分続いた。一方、ビオチニル化ＣＢ１受容体ｉＣＡＰＳを、ＤｙｎａｂｅａｄｓのＭｙＯｎｅストレプトアビジンＴ１（Life Technologies）上にコーティングした。次いで、ビーズ上のサブトラクションされたファージプールおよびＣＢ１　ｉＣＡＰＳを、競争のための非ビオチニル化ブリルタンパク質および空のｉＣＡＰＳと混合し、回転させながら室温で１時間インキュベートした。ビーズを、磁石を用いて結合混合物から分離し、非結合ファージを除去するために複数回（ラウンド１を５回、ラウンド２および３をそれぞれ１０回）洗浄した。結合したファージを１０分毎にグリシンバッファーｐＨ２．２で２回溶出した。溶出液を合わせ、トリス－ＨＣｌｐＨ８．０で中和し、ＴＧ１細胞の感染に用いて、パニングの次のラウンドのためのファージを産生した。３ラウンドのパンニング後、単一コロニーを採取し、モノクローナルファージＥＬＩＳＡによりスクリーニングした。

【０２３７】

ファージ結合剤のスクリーニングのために、パンニング結果物で感染させたＴＧ１の単一コロニーを、２ＹＴ／カルベニシリン／グルコース培地を含む９６ウェルプレートに採取し、３０℃にて一晩振盪させた。次の日、少量の飽和培地を新鮮な２ＹＴ／カルベニシリン／グルコース培地に移し、３７℃にて、ＯＤ６００ｎｍが０．６－０．７に達するまで振盪した。その後、培養物を、ＫＯ７ヘルパーファージで感染させた。感染したＴＧ１細胞をスピンダウンし、２ＹＴ／カルベニシリン／カナマイシン培地に再懸濁し、３０℃にて一晩振盪した。一方、マキシソープ９６ウェルプレート（Thermo Scientific）を、４℃にて一晩、ストレプトアビジン（Ｗａｋｏ）でコーティングした。３日目、ビオチニル化抗原をストレプトアビジンでコーティングしたプレート上で捕捉し、その後、それをＰＢＳＴ中、３％脱脂粉乳を用いてブロッキングした。ＴＧ１細胞を再度スピンダウンした。ファージを含む上清を、３％脱脂粉乳でブロッキングし、次いでＥＬＩＳＡプレートにローディングし、室温にて１時間インキュベートした。ＰＢＳＴで３回洗浄後、ＰＢＳ

Ｔ中、３％脱脂粉乳で１：２０００希釈したＨＲＰマウス抗Ｍ１３抗体（GE Healthcare）を、該プレートに添加し、室温にてさらに１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、その後、ＴＭＢ（Biopanda）で現像した。ＨＣｌをプレートに添加して反応を停止させた。４５０ｎｍでの吸光度を、Ｅｍａｘの精密マイクロプレートリーダー（Molecular Devices）で読み取った。ｉＣＡＰＳに特異的に結合したクローンを、さらなる特徴付けおよび配列決定のために採取した。

【０２３８】

ファージ上に提示されたＦａｂを産生するプラスミドを含む大腸菌コロニーを回収した。プラスミドＤＮＡを抽出し、配列決定して、ＦａｂＤＮＡ情報を得た。重鎖のＶ領域を増幅するための特異的プライマーを設計し、ＰＣＲ産物を、ＡｐａＩおよびＳａｃＩ制限酵素で予め処理したｐＴＴ５発現ベクターの改変体であるｐＴＴ５－ＨＣＶ３中に、seamless cloningによりヒト重鎖定常領域の前にクローニングした。特異的プライマーはまた、Ｆａｂフラグメントの全体の軽鎖領域を増幅するように設計された。得られたＰＣＲフラグメントを、改変されたｐＴＴ５ベクターであるｐＴＴ５－ＩＬ２－ＬＣＣ中に、seamless cloningによりＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩで処理してクローニングした。得られた２プラスミドの配列を検証した。

【０２３９】

実施例４．ハイブリドーマシーケンシング

ハイブリドーマ細胞（１ｘ１０$^{7}$）を回収し、全ＲＮＡを、脾臓組織について上述したようにＴｒｉ試薬を用いて抽出した。ｃＤＮＡを、上記のとおり、製造者の指示に従ってＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩキットを用いて調製した。得られたｃＤＮＡ産物を、プライマー　ＶｈＲｅｖＵおよびＶｈＦｏｒＵと共に、ＰＣＲのためのテンプレートとして用いて、得られた３００ｂｐのＰＣＲ産物をＰＣＲクリーンアップキットを用いてクリーンアップし、同じプライマーを用いて配列決定した。ＰＣＲ反応はまた、軽鎖Ｖ領域特異的プライマーＶｋＲｅｖ７およびＶｋＦｏｒ（可変領域のみ用）またはＫａｐｐａＦｏｒプライマー（全体のκ軽鎖用）を用いて行った。シーケンシング反応をクリーンアップしたＰＣＲ産物に対して行い、ＤＮＡ配列を得た。

【０２４０】

実施例５．ＩｇＧの発現および分析

ＩｇＧ発現：２つのｐＴＴ５ベースのプラスミド（一方は重鎖ＤＮＡを含み、他方は、軽鎖ＤＮＡを含む）を、ＩｇＧ発現のために、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞に同時トランスフェクションした。トランスフェクションの２４時間前に、２９３Ｆ細胞を、８Ｘ１０$^{5}$細胞／ｍｌの密度に希釈した。トランスフェクション１日目に、細胞を１．１－１．３Ｘ１０$^{6}$細胞／ｍｌで維持した。１μｇのプラスミドＤＮＡを、１ｍｌの細胞懸濁培養物のトランスフェクションのために使用した。８０μｇのＤＮＡを、４ｍｌの新鮮な２９３Ｆフリースタイル培地中に希釈した。２４０μｇのトランスフェクション試薬のポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を、４ｍｌの最終容量の２９３Ｆフリースタイル培地に希釈した。インキュベーションの３分後、４ｍｌのＤＮＡを４ｍｌのＰＥＩ中に混合した。８ｍｌのＤＮＡおよびＰＥＩ混合物を室温で１５分間インキュベートし、８０ｍｌの２９３Ｆ細胞懸濁培養液にゆっくり添加した。細胞を、オービタルシェーカープラットフォームで、１３０ｒｐｍの速度で、３７℃、５％ＣＯ２にてインキュベートし、４日目に回収した。

【０２４１】

ＩｇＧ精製：０．４ｍｌのベッドボリューム（Bed Volume）のタンパク質Ａを、１ｍＬカラムに入れ、１０ｍＬのｄＨ２Ｏおよび１０ｍｌのＰＢＳ（ｐＨ８．０）で洗浄した。トランスフェクトされた２９３Ｆ細胞懸濁液を、４℃にて、４０００ｒｐｍで４５分間スピンダウンした。ペレットを捨て、上清を氷上でｐＨ８．０に調整し、準備したタンパク質Ａカラムに入れた。上清の充填が終了したとき、カラムを５ｍｌのＰＢＳ（ｐＨ８．０）で洗浄し、４ｍｌの０．１Ｍクエン酸Ｎａ－ＨＣｌ（ｐＨ３．５）で溶出した。ＩｇＧを含む溶出液を２００μＬの１．５Ｍトリス－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．８）で中和し、３０ｋＤ　４ｍｌコンセントレーターで濃縮した。４．５ｍｌのＰＢＳで該コンセントレー

ターをいっぱいにし、スピンダウンした。最後に、ＩｇＧを交換し、ＰＢＳ中に貯蔵した。ＩｇＧをＯＤ２８０で検出し、純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルおよびＳＥＣにより測定した。

【０２４２】

４つの異なる試験で達成されたＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４の濃度、容量および収量を、表４に示す。種々のクローンの濃度、容量および量を以下の表５に示す。

【０２４３】

【表４】

表４．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４発現

| 名称 | 濃度(mg/ml) | 用量(μl) | 量(μg) | 収量(mg/L) |
|---|---|---|---|---|
| PA13R3－P1C4 | 0.3 | 200 | 60 | 0.75 |
| PA13R3－P1C4 | 1.01 | 500 | 505 | 3.2 |
| PA13R3－P1C4 | 0.49 | 500 | 245 | 1.5 |
| PA13R3－P1C4 | 1.25 | 1250 | 1562.5 | 3.9 |

【表５】

表５．クローンの発現

| クローン | 濃度（ｍｇ／ｍｌ） | 容量（μｌ） | 量（μｇ） |
|---|---|---|---|
| PA13R3－P1C4(機能的) | 0.3 | 200 | 60 |
| PA2LR3－P2D3 | 0.31 | 250 | 77.5 |
| | 0.18 | 200 | 36 |
| PA2LR3－P1G6 | 1.99 | 350 | 696.5 |
| PA2LR3－P3B10 | 0.23 | 600 | 138 |
| | 0.64 | 200 | 128 |
| PA2R3－P1A7 | 1.93 | 400 | 772 |
| | 3.1 | 300 | 930 |
| | 0.06 | 250 | 15 |
| | 1.07 | 1200 | 1284 |
| PA2LR3－P1H4 | 1.94 | 300 | 582 |
| PA2LR3－P4B1 | 1.62 | 250 | 405 |
| | 0.98 | 200 | 196 |
| PA2LR3－P4B5 | 0.8 | 200 | 160 |
| | 0.85 | 450 | 382.5 |
| | 0.61 | 200 | 122 |
| | 1.68 | 600 | 1008 |
| PA2LR3－P4G10 | 1.32 | 250 | 330 |
| PA2LR3－P4C6 | 1.63 | 250 | 407.5 |
| | 0.56 | 250 | 140 |
| PA2LR3－P3B8 | 4.13 | 250 | 1032.5 |
| PA2LR3－P2B8 | 1.01 | 550 | 555.5 |
| | 1.78 | 500 | 890 |
| | 1.1 | 500 | 550 |
| | 3.3 | 900 | 2970 |
| PA2LR3－P2E5 | 0.47 | 550 | 258.5 |
| PA2R3－P1F1 | 0.8 | 500 | 400 |
| PA2LR3－P3A8 | 1.65 | 200 | 330 |
| PA2LR3－P3F8 | 1.97 | 150 | 295.5 |
| PA2LR3－P5E7 | 0.74 | 250 | 185 |
| PA2LR3－P6B12 | 2.45 | 200 | 490 |
| PA2LR3－P6G7 | 0.92 | 200 | 184 |

【０２４４】

実施例６．ＥＬＩＳＡによるＣＢ１　ｉＣＡＰＳへのＩｇＧの結合

精製したＩｇＧを、精製したＣＢ１受容体（ＣＢ１立体構造抗原提示システム（ｉＣＡＰＳ））への結合についてＥＬＩＳＡにより試験した。非ビオチニル化抗原（例えば、空のｉＣＡＰＳ）をＭａｘｉｓｏｒｐプレート上に直接コーティングした。一次抗体は、１：３で連続希釈した精製したＩｇＧであって、プレート上で１時間インキュベートした。ＰＢＳＴで３回洗浄後、二次抗体ＨＲＰヤギ抗マウスＩｇＧ（Ａｂｍａｒｔ）またはＨＲＰヤギ抗ヒトＩｇＧ（Sigma）、をＩｇＧの種類に応じて添加し、さらに１時間インキュ

ベートした。プレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、次いでＴＭＢ（Biopanda）を用いて発光させた。ＨＣｌをプレートに添加して反応を停止させた。４５０ｎＭでの吸光度をＥｍａｘ精密マイクロプレートリーダー（Molecular Devices）で読み取った。結合データを表６にまとめる。

【０２４５】

【表６】

表６．ＣＢ１　ｉＣＡＰＳへの結合

| クローン | A139 EC50(nM) | A138 EC50(nM) |
|---|---|---|
| | | |
| PA2LR3－P1G6 | 35 | 81 |
| PA2LR3－P1H4 | 33.52 | 21.04 |
| PA2LR3－P2B8 | 1.8 | 6.7 |
| PA2LR3－P2D3 | 2.6 | 4.9 |
| PA2LR3－P2E5 | 3.2 | 10 |
| PA2LR3－P3B10 | 0.78 | 1.4 |
| PA2LR3－P3B8 | | 71 |
| PA2LR3－P4B1 | 1.406 | 1.277 |
| PA2LR3－P4B5 | 0.24 | 0.24 |
| PA2LR3－P4C6 | 0.4 | 0.4 |
| PA2LR3－P4G10 | 1.354 | 1.189 |
| PA2R3－P1A7 | 3.5 | 7.5 |
| PA2R3－P1F1 | 1.1 | 1.3 |
| PA13R3－P1C4 | 0.175 | 0.1719 |

【０２４６】

実施例７．ＦＡＣＳによるＩｇＧの結合

ＴＲｅｘ　ＣＨＯ親細胞、ＣＢ１を過剰発現するＴＲｅｘ　ＣＨＯ　Ａ５６（ＣＢ１　Ｔ２１０Ａ／融合パートナー）および天然のヒトＣＢ１　ＴＲｅｘ　ＣＨＯ　Ａ１５６を、フラスコから回収した。１００μＬの１ｘ１０$^{6}$細胞／ｍｌの細胞を、一次抗体ＩｇＧと共にインキュベートした。抗ヒトおよび二次抗体ＰＥ結合抗マウス抗体を１：２００倍希釈した。抗ヒトＦａｂ　ＦＩＴＣを１：３２倍希釈した。細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、ＢＤ　５ｍｌファルコンチューブに移し、フローサイトメトリーにより分析した。初めに、精製したＩｇＧの結合を、３０ｎＭおよび３００ｎＭの濃度で試験した。結合体を図１Ａ－１Ｆに示すように同定した。

【０２４７】

ＴＲｅｘ　ＣＨＯ親細胞、ＣＢ１を過剰発現するＴＲｅｘ　ＣＨＯ　Ａ５６、天然のヒトＣＢ１　ＴＲｅｘ　ＣＨＯ　Ａ１５６、５ＨＴ２Ｂをさらに評価するために、マウスＣＢ１およびヒトＣＢ２を用いて、ＩｇＧ結合の特異性を調べた。１００μｌの１ｘ１０$^{6}$細胞／ｍｌの細胞を、氷上にて３０分間、１μＭから０．５ｎＭまでの３倍連続希釈した一次抗体ＩｇＧと共にインキュベートした。２００μｌのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄後、細胞を、氷上で３０分間、二次抗体と共にインキュベートした。細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、ＢＤファルコン５ｍｌチューブに移し、ＦＡＣＳによって分析した。

【０２４８】

Santa Cruzの抗ＣＢ１ウサギポリクローナル抗体および二次抗体ＦＩＴＣ結合抗ウサギ抗体を用いて、マウスＣＢ１の発現を検出した。Ｒ＆Ｄマウスモノクローナル抗ＣＢ２およびヒトＩｇＧ　Ｐ２Ｃ２を用いて、ＣＢ２および５ＨＴ２Ｂの発現をそれぞれ確認した

。抗マウスおよび抗ヒト二次抗体の両方は、ＰＥ結合型であった。

【０２４９】

選択した結合体について、完全な結合曲線を、ある濃度範囲を試験することによりＣＢ１受容体に対して作成した。１μＭから０．１μＭまでの３倍の連続希釈を調製した。選択性を、それぞれＡ１５６（天然にＣＢ１受容体を発現する）またはＡ５６（Ｔ２１０Ａ修飾および融合パートナーとのＩＣＬ３置換を有するＣＢ１受容体を過剰発現する）への結合と比較して、フローサイトメトリーにより、５ＨＴ２ＢまたはＣＢ２を発現する細胞への結合を測定することにより決定した。図２Ｃおよび図２Ｄに示す通り、ＣＢ２および５ＨＴ２Ｂの発現をマウスモノクローナル抗ＣＢ２およびＰ２Ｃ２ヒトＩｇＧを用いて確認し、ＣＢ２および５ＨＴ２Ｂ発現をそれぞれ確認した。ＰＥ結合抗マウス（抗ＣＢ２の検出のための）およびＰＥ結合抗ヒト抗体を用いて、ＣＢ２および５ＨＴ２Ｂをそれぞれ検出した。抗体ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２は、図２Ａおよび図２Ｂに示すように、ＣＢ１に選択的に結合した。加えて、表７は、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２のいくつかのバッチのそれぞれについて、濃度および解離定数（Ｋｄ）を示している。

【０２５０】

試験結果は、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ＩｇＧおよびＦａｂおよび３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２が、Ａ５６およびＡ１５６の両方に結合するが、親ＴＲｅｘ　ＣＨＯには結合せず、それらは、５ｈｔ２ｂ、ヒトＣＢ２またはマウスＣＢ１との交差活性を有していないことを示した。

【０２５１】

【表７】

**表７．抗体の種々のバッチについてのフローサイトメトリー結果**

| ＩｇＧ | 濃度 | 細胞株 | Ｋｄ |
|---|---|---|---|
| PA13R3－P1C4 | 1.01mg/ml | A156 | 40.54nM |
| PA13R3－P1C4 | 1.01mg/ml | A156 | 171nM |
| PA13R3－P1C4 | 0.49mg/ml | A156 | 187nM |
| PA13R3－P1C4 | 1.25mg/ml | A156 | 72.6nM |
| 36E12B2E5 | 4mg/ml | A156 | 37.4nM |
| 36E12B2H8 | 7.05mg/ml | A156 | 25.89nM |
| 36E12B6C2 | 4.85mg/ml | A156 | 63.95nM |
| 36E12B6F2 | 5.57mg/ml | A156 | 61.87nM |
| 36E12B6C2 | 5.78mg/ml | A156 | 151.1nM |
| 36E12B6C2 | 5.9mg/ml | A156 | 25.97nM |
| 36E12B6C2 | 5.28mg/ml | A156 | 27.66nM |
| PA13R3－P1C4 | 1.01mg/ml | A56 | 27.3nM |
| PA13R3－P1C4 | 1.25mg/ml | A56 | 50.59nM |
| 36E12B2E5 | 4mg/ml | A56 | 30.95nM |
| 36E12B2H8 | 7.05mg/ml | A56 | 20.34nM |
| 36E12B6C2 | 4.85mg/ml | A56 | 29.32nM |
| 36E12B6F2 | 5.57mg/ml | A56 | 23.91nM |
| 36E12B6C2 | 5.78mg/ml | A56 | 69.42nM |
| 36E12B6C2 | 5.9mg/ml | A56 | 60.24nM |
| 36E12B6C2 | 5.28mg/ml | A56 | 51.94nM |

【０２５２】

実施例８．競合アッセイ

ＴＲｅｘ ＣＨＯ Ａ１５６天然ヒトＣＢ１細胞を用いて、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２およびＰ１Ｃ４が同様のエピトープに結合するかどうかを試験した。Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２のＥＣ８０およびＥＣ５０での濃度を染色のために用いた。過剰量のＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ＩｇＧ、Ｆａｂおよび３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２を競合のために用いた。１００μｌの１ｘ１０$^{6}$細胞／ｍｌのＡ１５６細胞を、氷上で３０分間、競合用（competitor）ＩｇＧと共にインキュベートし、その後、染色用ＩｇＧを混合物に添加して、氷上で３０分間インキュベーションした。２００μｌのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄後、細胞を二次抗体と共に氷上で３０分間インキュベートした。ＰＥ結合抗ヒトおよび抗マウス抗体を１：２００倍に希釈した。細胞を２００μｌのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、ＢＤファルコン５ｍｌチューブに移し、ＦＡＣＳによって分析した。

【０２５３】

試験結果は、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ＦａｂおよびＩｇＧがＣＢ１結合について３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２と競合したことを示し、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２が重複するエピトープに結合することが示唆された（図３ＡおよびＢ）。１００ｎＭから５００ｎＭに増加した競合体３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２もまた、ＣＢ１への結合についてＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４と競合することができた。

【０２５４】

実施例９．ｃＡＭＰ機能アッセイ

ｃＡＭＰ機能アッセイを行い、抗体のアンタゴニスト作用を測定した。ｃＡＭＰ機能アッセイ（Cisbio）を、白色３８４ウェル低容量プレート（Greiner）で行った。８０００細胞／ウェルのＣＢ１を安定発現するＴＲｅｘ ＣＨＯ細胞を該プレートに播種し、次いで種々の濃度のアンタゴニスト（１０μＭから０μＭの範囲）と共に、室温で１０分間インキュベートした。５μＭのフォルスコリン（Sigma Aldrich）および９μＭのカンナビノイドＣＰ５５９４０（Sigma Aldrich）を細胞刺激混合物に加え、室温で３０分間インキュベートして、ＣＢ１を活性化した。インキュベーションの３０分後、５μＬのｃＡＭＰ－ｄ２（Ｃｉｓｂｉｏ社が提供する複合体および溶解バッファーで１：３９希釈）および５μＬの抗ｃＡＭＰクリプテート（Ｃｉｓｂｉｏ社が提供する複合体および溶解バッファーで１：９希釈）を細胞刺激物に添加し、１時間インキュベートした。ＦＲＥＴシグナルを、Ｅｎｖｉｓｉｏｎマルチラベルプレートリーダー（Perkin Elmer）を用いて、６２０ｎＭでの抗ｃＡＭＰクリプテート励起および６６５ｎＭでの放出において、検出した。データ分析をＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いて行った。

【０２５５】

図４に示す通り、２つの抗体、３６Ｅ１２Ｂ２Ｈ８（ハイブリドーマ）およびＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（ファージ由来）は、アンタゴニスト活性等価（３６Ｅ１２Ｂ２Ｈ８）を示すか、または小分子陽性対照（ＣＢ１受容体インバースアゴニストであるＳＲ１４１７１６Ａ（リモナバン）およびＡＭ２５１ならびにニュートラルアンタゴニストであるＡＭ６５４５）よりも強力な活性（ＰＡ１３Ｒ３－ＰＩＣ４）を示し、それぞれＩＣ５０値は、３５０±２８ｎＭおよび９０±１３ｎＭであった。

【０２５６】

実施例１０：ＥＲＫ活性化アッセイ

ｍＡｂのアンタゴニスト活性をさらに確認するため、ＣＢ１受容体シグナル伝達経路の一部としてのＥＲＫ活性化を評価した。試験の２日前に、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ　ＣＢ１受容体細胞を、５００，０００細胞／ウェルで６ウェルプレート中に播種した。１μｇ／ｍＬのテトラサイクリンを用いて、２４時間後にＣＢ１受容体発現を誘導した。細胞を、試験の少なくとも２時間前から血清枯渇状態にした。３００ｎＭの精製したＩｇＧを該培養培地に添加し、３０分後、細胞をＣＢ１受容体アゴニストＷＩＮ５５，２１２（１００ｎＭ）で１０分間および１５分間刺激した。細胞溶解物を集め、ＥＲＫ活性化レベルをウェスタンブロットにより決定した。抗ＥＲＫおよび抗リン酸特異的ＥＲＫ抗体は、Cell Signaling Inc社から入手した。

【０２５７】

ＣＢ１受容体アゴニストＷＩＮ５５，２１２での処理は、リン酸化ＥＲＫシグナルの増加によって証明されるように、ＥＲＫ活性化を誘導した。総ＥＲＫをウェスタンブロットのローディング対照として用いて、サンプルの等ローディング量を示した。図５Ａに示すように、ファージ由来の抗体ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（３００ｎＭ）は、ＷＩＮ５５，２１２（１００ｎＭ）により誘導されるＥＲＫリン酸化を阻害したが、対照ＩｇＧ（無関係な結合体(irrelevant binder)）またはＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｅ４は阻害しなかった。図５Ｂに示す通り、ハイブリドーマ由来の抗体３６Ｅ１２Ｂ２Ｅ５、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２および３６Ｅ１２Ｂ６Ｆ２は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＥＲＫリン酸化を阻害したが、対照ＩｇＧは阻害しなかった。図５Ａおよび５Ｂの両方に示す通り、ＡＭ６５４５（ニュートラルアンタゴニスト）を陽性対照として用いた。

【０２５８】

実施例１１．ＡＭＰ機能アッセイ

ｃＡＭＰアゴニスト機能アッセイ(Cisbio)を、白色３８４ウェル低容量プレート（Greiner）で行った。８０００細胞／ウェルのＣＢ１を安定に発現するＴＲｅｘ ＣＨＯ細胞をプレートに播種し、次いで種々の濃度のアゴニスト（１．５μＭから０μＭの範囲）と共に室温にて１０分間インキュベートした。アゴニスト活性（図６Ａおよび６Ｂ）について試験するために、５μＭのフォルスコリン（Sigma Aldrich）を細胞刺激混合物に添加して、室温にて３０分間インキュベートした。正のアロステリックモジュレーター活性（図６Ｃおよび６Ｄ）を評価するために、５μＭのフォルスコリン（Sigma Aldrich）および１μＭのＣＰ５５９４０を細胞刺激混合物に添加し、室温にて３０分間インキュベートした。

【０２５９】

３０分間のインキュベーション後、５μＬのｃＡＭＰ－ｄ２（Ｃｉｓｂｉｏ社が提供する複合体および溶解バッファーで１：３９希釈）および５μＬの抗ｃＡＭＰクリプテート（Ｃｉｓｂｉｏ社が提供する複合体および溶解バッファーで１：９希釈）を細胞刺激物に添加し、１時間インキュベートした。ＦＲＥＴシグナルを、６２０ｎＭでの抗ｃＡＭＰクリプテート励起および６６５ｎＭでの放出の際に、Ｅｎｖｉｓｉｏｎマルチラベルプレートリーダー（Perkin Elmer）を用いて検出した。データ分析をＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェアを用いて行った。

【０２６０】

ｃＡＭＰアゴニストスクリーニングの結果は、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｄ３、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ７およびＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２を含むつの可能性のあるアゴニストＩｇＧを同定した。特に、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ２Ｄ３、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ４Ｂ１およびＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｇ７は、図６Ａおよび６Ｂに示す通り、ＥＣ５０＞３００ｎＭを示した。また、ＰＡ２ＬＲ３－Ｐ６Ｂ１２は、図６Ｃに示す通り、ＣＰ５５９４０の存在下で約１０００ｎＭのＥＣ５０を有する、可能性のあるアロステリックモジュレーターである。陽性対照および陰性対照は図６Ｂおよび６Ｄに示されている。

【０２６１】

ｃＡＭＰアッセイもまた、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２をさらに特徴付けるために行った。ｃＡＭＰ機能アッセイ(Cisbio)を、白色の３８４ウェル低容量プレート（Greiner）にて行った。８０００細胞／ウェルのＣＢ１を安定に発現するＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を該プレートに播種し、次いで、３μＭから０μＭの範囲の濃度のＡＭ６５４５、ＳＲ１４１７１６Ａ、ＰＡ１２Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２を含むアンタゴニストと共に、室温にて１０分間インキュベートした。１０分間インキュベーション後、５μＭのフォルスコリン（Sigma Aldrich）を細胞刺激混合物に添加し、室温にて３０分間インキュベートした。ｃＡＭＰ産生を定量するために、５μＬのｃＡＭＰ－ｄ２および５μＬの抗ｃＡＭＰクリプテートを細胞刺激物に添加し、１時間インキュベートした。ＦＲＥＴシグナルを、６２０ｎＭでの抗ｃＡＭＰクリプテート励起および６６５ｎＭでの放出の際に、ＥｎＶｉｓｉｏｎマルチラベルプレートリーダー（Perkin Elmer）で検出した。データ分析をＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェアを用いて行った。

試験結果を図７に示す。これまで、ＡＭ６５４５およびＳＲ１４１７１６Ａは、それぞれニュートラルアンタゴニストおよびインバースアゴニストとして特徴付けられていた。ｃＡＭＰ機能アッセイの結果は、ＰＡ１２Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２が、ＳＲ１４１７１６Ａド同様の阻害パターンを有することを示し、ＰＡ１２Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２がインバースアゴニストであることが示唆された。

【０２６２】

実施例１２．ｉＣＡＰＳ　ＥＬＩＳＡ結合アッセイ

ＥＬＩＳＡ結合アッセイを行い、ＣＢ１を発現するｉＣＡＰＳ（タンパク質１配列とのＩＣＬ３天然配列置換を含むＡ１３８およびＢＲＩＬとのＩＣＬ３天然配列置換を含むＡ１３９）、５ＨＴ２Ｂを発現するｉＣＡＰＳ（ｈ１３ｈ）、空のｉＣＡＰＳ、またはｒＢｒｉｌ－０９１８へのＣＢ１受容体ＩｇＧまたはＦａｂ抗体ン結合を評価した。試験されたＩｇＧ分子およびＦａｂ分子は、陰性対照ＢＲＩＬ結合体であるＰ１Ｆ７　ＩｇＧおよびＰ１Ｆ７　Ｆａｂと比較して、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２　ＩｇＧ、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２　Ｆａｂ、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ＩｇＧおよびＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　Ｆａｂであった。ＩｇＧ抗体の場合、結合を検出するために用いた二次抗体は、抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰであった。Ｆａｂの場合、結合を検出するために用いた二次抗体は抗ヒトＩｇＧ－ＨＲＰであった。試験結果は、図８Ａおよび８Ｂならびに以下の表８に示す。Ａ１３８　ｉＣＡＰＳおよびＡ１３９　ｉＣＡＰＳ結合の両方について、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２　Ｆａｂは、３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２　ＩｇＧより顕著に高いＣ５０値を示した。対照的に、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ＩｇＧおよびＦａｂは、Ａ１３９およびＡ１３８の両方への結合について、ほぼ等しいＥＣ５０値を示した。ＣＢ１抗体またはＦａｂのいずれも、ｒＢｒｉｌ－０９１８、空のｉＣＡＰ、または５ＨＴ２Ｂを発現するｉＣＡＰＳへの結合を示さなかった。対照ｍＡｂ　Ｐ１Ｆ７はＢＲＩＬを認識し、それ故に、ＩＣＬ３中にＢＲＩＬ融合を含むＡ１３９への結合を示すが、ＢＲＩＬを欠くＡ１３８には結合しなかった。

【０２６３】

【表８】

**表８．３６Ｅ１２Ｂ６Ｃ２およびＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ＩｇＧおよびＦａｂ　ＥＬＩＳＡにおけるＥＣ５０値**

| ＥＣ５０ | Ａ１３９ | Ａ１３８ |
|---|---|---|
| 36E12B6C2 Fab | 0.8054 | 1.017 |
| 36E12B6C2 IgG | 0.19 | 0.2011 |
| PA13R3－P1C4 Fab | 0.27 | 0.23 |
| PA13R3－P1C4 IgG | 0.17 | 0.17 |

【０２６４】

実施例１３．Ｂ１受容体の内在化の試験

ＣＢ１内在化を誘導するＷＩＮ５５，２１２（ＣＢ１特異的アゴニスト）に対するＣＢ１抗体の影響を、フローサイトメトリーによって調べた。５ｘ１０$^{5}$細胞／ウェルのＣＢ１を安定に発現するＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を６ウェルプレートに播種した。テトラサイクリン（１μｇ／ｍｌ）を、２４時間、培養培地に添加して、ＣＢ１発現を誘導した。試験日、細胞を２時間、血清飢餓にした。その後、細胞をＣＢ１抗体（３００ｎＭ）、ＡＭ６５４５（ＣＢ１ニュートラルアンタゴニスト）および陰性対照（ＢＲＩＬ結合体）と共に３０分間プレインキュベートした。次いで、ＣＢ１アゴニスト（１μＭ　ＷＩＮ５５，２１２）を培養培地に１時間添加し、受容体内在化を誘導した。ＣＢ１の表面発現を、Ｒ＆Ｄからの抗ＣＢ１　Ｎ末端マウスモノクローナル抗体で染色し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）をフローサイトメトリーを用いて測定した。試験結果を図９Ａに示す。ＣＢ１アゴニストＷＩＮ５５，２１２での処理は、対照と比較してＭＦＩの減少を示し、ＣＢ１の内在化を示唆した（図９Ａ、ヒストグラムの上列）。ＣＢ１特異的ニュートラルアンタゴニスト

ＡＭ６５４５での前処理は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＣＢ１受容体内在化を阻害した（図９Ａ、ヒストグラムの上列）。ＣＢ１抗体（３００ｎＭ）の前処理は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＣＢ１受容体内在化に影響を与えなかった（図９Ａ、ヒストグラムの中央と下列）。

【０２６５】

受容体内在化に対するＣＢ１抗体の影響も調べた。血清飢餓の２時間後、３００ｎＭのＣＢ１抗体、Ｐ２Ａ１２陰性対照（ＢＲＩＬ結合体）およびＣＢ１アゴニストであるＷＩＮ５５，２１２を培養培地に１時間添加した。細胞を回収し、抗ＣＢ１　Ｎ末端マウスモノクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ）で染色した。試験結果を図９Ｂに示す。ここでも、ＷＩＮ５５２１２によりＣＢ１受容体内在化を誘導し、ＣＢ１ニュートラルアンタゴニストであるＡＭ６５４５での前処置により該内在化が阻害された（図９Ｂ、ヒストグラムの上列）。ＣＢ１の表面発現は、ＣＢ１抗体によって影響を受けず、ＣＢ１抗体が受容体内在化を誘導しなかったことが示唆された（図９Ｂ、ヒストグラムの中央と下列）。

【０２６６】

実施例１４．ヒト化ＣＢ１抗体の効力

ヒト化Ｐ１Ｃ４抗体を作製し、効力、特異性および親和性について試験した。ヒト化Ｐ１Ｃ４抗体を作製するために、ヒトフレームワークを、Ｐ１Ｃ４とヒト生殖系列ＶＨおよびＶＫ遺伝子との相同性に基づいて選択した。選択されたフレームワークは、ＰＩＣ４ＶＨおよびＶＫ領域と最も高い相同性を有し、ＰＩＣ４によって提示されると予測されるＣＤＲ構造を支持することができるように、コンピュータモデリングに基づいて選択された。

以下のヒト化抗体を作製した：（１）Ｐ１Ｃ４－Ｈ０－ＩｇＧ；（２）Ｐ１Ｃ４－Ｈ２（ＹＥ）－ＩｇＧ（重鎖可変領域におけるＧ２７ＹおよびＴ２８Ｅ変異を含む）；および、（３）Ｐ１Ｃ４－Ｈ４（ＹＥＮＧ）－ＩｇＧ（重鎖可変領域におけるＧ２７Ｙ、Ｔ２８Ｅ、Ａ６０Ｎ、Ｑ６１Ｇ変異を含む）。

【０２６７】

ｃＡＭＰアッセイを、キメラＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４およびヒト化ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４抗体の効力を決定するために行った。ｃＡＭＰ機能アッセイ(Cisbio)を、白色３８４ウェル低容量プレート（Greiner）で行った。８，０００細胞／ウェルの天然ヒトＣＢ１を安定に発現するＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を該プレートに播種し、次いで、１μＭから０μＭの範囲の濃度で、リモナバン（ＳＲ１４１７１６Ａ）、ＰＡ１２Ｒ３－Ｐ１Ｃ４キメラ、ＰＡ１２Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　Ｈ０（復帰変異なし）、ＰＡ１２Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　Ｈ２（ＹＥ）、ＰＡ１２Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　Ｈ４（ＹＥＮＧ）およびＰ２Ａ１２（陰性対照）と共に、室温にて１０分間、インキュベートした。１０分後、５μＭのフォルスコリン（Sigma Aldrich）を刺激混合物に添加し、室温にて３０分間インキュベートした。ｃＡＭＰ産生を定量するために、５μＬのｃＡＭＰ－ｄ２および５μＬの抗ｃＡＭＰクリプテートを添加し、１時間インキュベートした。ＦＲＥＴシグナルを、６２０ｎＭでの抗ｃＡＭＰクリプテート励起および６６５ｎＭでの放出の際に、ＥｎＶｉｓｉｏｎマルチラベルプレートリーダー（Perkin Elmer）を用いて検出した。データ分析をＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを用いて行った。

【０２６８】

試験結果を図１０および以下の表９に示す。ｃＡＭＰ機能アッセイは、ヒト化Ｐ１Ｃ４－Ｈ２およびＰ１Ｃ４－Ｈ４が、それぞれ２１ｎＭおよび１７ｎＭのＩＣ５０を有したことを示した。従って、試験した抗体のうち、ヒト化抗体Ｈ１Ｃ４－Ｈ２およびＰＩＣ４－Ｈ４は、ｃＡＭＰの阻害により測定される通り、対応するキメラ抗体よりもさらに大きな効力を示した。

【０２６９】

【表９】

表9．キメラおよびヒト化ＣＢ１抗体のＩＣ５０

| | PA13R3－P1C4キメラ | P1C4－H0変異なし | P1C4－H2(YE) | P1C4－H4(YENG) | リモナバン |
|---|---|---|---|---|---|
| IC50(nM) | ９３ | １４６ | ２１ | １７ | ４１５ |

【０２７０】

ヒト化Ｐ１Ｃ４抗体の結合親和性、交差反応性および特異性を、フローサイトメトリーによりＴＲｅｘ ＣＨＯ親細胞、ＴＲｅｘ ＣＨＯ Ａ５６ ＣＢ１過剰発現細胞（Ｔ２１０Ａ／融合パートナー）、天然のヒトＣＢ１ ＴＲｅｘ ＣＨＯ Ａ１５６細胞、Ｔｒｅｘ親（ＣＢ１なし）細胞、マウスＣＢ１細胞およびヒトＣＢ２安定化細胞を用いて決定した。１００μＬの１ｘ１０$^{6}$細胞／ｍｌの細胞を、３００ｎＭから０．５ｎＭまでの３倍連続希釈液の、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ キメラ、ヒト化Ｐ１Ｃ４－Ｈ０（変異なし）、Ｐ１Ｃ４－Ｈ２（ＹＥ）、Ｐ１Ｃ４－Ｈ４（ＹＥＮＧ）またはＰ２Ａ１２（対照）ＩｇＧと共に、氷上で３０分間インキュベートした。２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄後、細胞を、ＰＥ結合抗ヒト二次抗体（Southern Biotech）と共に氷上で３０分間インキュベートした。細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、ＢＤファルコン５ｍｌチューブに移し、フローサイトメトリー（ＢＤ ＦＡＣＳｃａｌｉｂｕｒ）により分析した。

【０２７１】

【表１０】

表１０．ヒト化Ｐ１Ｃ４抗体の結合親和性および交差反応性

| Ｋｄ（ｎＭ） | ＴＲｅｘＣＨＯ Ａ５６ ＣＢ１ Ｔ２１０Ａ／融合パートナー | ＴＲｅｘＣＨＯ Ａ１５６ 天然ヒト ＣＢ１ | ＴＲｅｘＣＨＯ 親 | ＴＲｅｘＣＨＯ マウスＣＢ１ | ＴＲｅｘＣＨＯ ヒトＣＢ２ |
|---|---|---|---|---|---|
| ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ キメラ | １０．５ | ２５ | 結合なし | 結合なし | 結合なし |
| Ｐ１Ｃ４－Ｈ０ 変異なし | ４．５ | ２５ | 結合なし | 結合なし | 結合なし |
| Ｐ１Ｃ４－Ｈ２（ＹＥ） | ４．２ | ９．４ | 結合なし | 結合なし | 結合なし |
| Ｐ１Ｃ４－Ｈ４（ＹＥＮＧ） | ４．０ | ９．６ | 結合なし | 結合なし | 結合なし |
| Ｐ２Ａ１２（対照） | 結合なし | 結合なし | 結合なし | 結合なし | 結合なし |

【０２７２】

試験結果を図１１および上記の表１０に示す。ヒト化ＣＢ１抗体はＡ５６細胞およびＡ１５６細胞に結合した。ヒト化抗体Ｐ１Ｃ４－Ｈ２およびＰＩＣ４－Ｈ４は両方とも、キメラＰ１Ｃ４抗体と比較してより高い親和性で、ＴＲｅｘ ＣＨＯ Ａ５６ ＣＢ１過剰発現細胞ならびに天然ヒトＣＢ１ Ａ１５６細胞に結合した（図１１Ａ）。また、試験した

抗体はいずれも、マウスＣＢ１またはヒトＣＢ２との交差反応性を示さなかった（図１１Ｂ）。

【０２７３】

実施例１５．低下したエフェクター機能のＣＢ１抗体

低下したエフェクター機能を示すように設計されたＣＢ１アンタゴニスト抗体を構築し、試験した。次のＦｃ改変の１つまたはそれ以上を有するＣＢ１アンタゴニスト抗体を作製した：（１）位置２２８でのセリンからプロリンへの変異（Ｓ２２８Ｐ）を有するＩｇＧ４定常領域；（２）位置３３０でのアラニンからセリンへの変異（Ａ３３０Ｓ）および位置３３１でのプロリンからセリンへの変異（Ｐ３３１Ｓ）を有するＩｇＧ２定常領域；ならびに、（３）ＩｇＧ２／ＩｇＧ４ハイブリッド定常領域。

【０２７４】

フレームワーク領域における０、２または４個の復帰変異を有する得られたヒト化ＣＢ１抗体を、配列番号３４３－３５１として提供する。該抗体を、Ｆｃγ受容体および補体Ｃ１ｑへの結合の程度についてＥＬＩＳＡにより試験した。得られたＣＢ１抗体を、インビトロにおいて、初代ヒト免疫細胞を活性化する能力についても試験した。具体的には、１つまたはそれ以上のＦｃ改変を有するＣＢ１抗体を、免疫細胞の活性化について、例えば、その架橋能力または活性化マーカーの発現を誘導する抗体の能力を評価することにより、試験した。試験結果は、ＣＢ１アンタゴニスト抗体が、定常領域の改変を含まない対応するＣＢ１アンタゴニスト抗体と比較して、低下したＦｃγＲ結合および／または低下したＣ１ｑ結合および／または低下した免疫細胞活性化を有することを示す。

【０２７５】

実施例１６．生体内分布の試験

試験を、マウスにおいてインビボで、ＣＢ１抗体Ｐ４Ｂ５の生体内分布を決定するために行った。抗体Ｐ４Ｂ５をＶｉｖｏｔａｇ ６８０ ＸＬ（Perkin Elmer）で標識し、無毛マウス（群当たりｎ＝４）に５ｍｇ／ｋｇまたは２５ｍｇ／ｋｇの標識した抗体を静脈内（ＩＶ）注射した。全身のイメージングを、以下の時点で、蛍光媒介断層撮影（ＦＭＴ）を用いて行い、種々の組織の蛍光を測定した：０時間（０ｈ）、１ｈ、５ｈ、２４ｈ、４８ｈ、７２ｈ、９６ｈおよび１４４ｈ。標識したＰ４Ｂ５は、図１２に示す通り、標識していないＰ４Ｂ５と比較して、ＣＢ１細胞に対して同様の結合親和性を示した。標識していないＰ４Ｂ５についてのＥＣ５０は６０．５ｎＭであり、Ｖｉｖｏｔａｇ ６８０ ＸＬで標識したＰ４Ｂ５についてのＥＣ５０は５７．８ｎＭであった。

【０２７６】

試験結果を図１３Ａおよび１３Ｂに示す。標識した抗体を、図１３Ａ．１およびＡ．２に示す通り、時間経過に亘って検出し、それは、より高い抗体用量（２５ｍｇ／ｋｇ）を受容した代表的なマウスからのデータを提供する。しかしながら、血液からのバックグラウンドシグナルを差し引いたとき、抗ＣＢ１抗体は脳内で検出されず（図１３Ｂ）、抗体が、ＩＶ注射後、血液脳関門を通過しなかったことが示唆された。

【０２７７】

実施例１７．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体についてのＩｇＧの発現および分析

異なるヒトＩｇＧサブクラスのうち、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４サブクラスのＦｃ領域は、ＦｃγＲまたは補体１ｑ（Ｃ１ｑ）を活性化するようなエフェクター分子にほとんど結合せず、結果として、低いエフェクター機能活性となる。免疫エフェクター機能の活性化を最小限にするために、ヒト化リード抗体シリーズのＰ１Ｃ４－Ｈ２およびＰ１Ｃ４－Ｈ４を、さらなる特徴付けのために、３つのヒトＦｃフレームワーク変異体、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４およびＩｇＧ２とＩｇＧ４とのハイブリッドにクローニングした。

【０２７８】

ヒト化Ｐ１Ｃ４－Ｈ２の重鎖の可変領域（配列番号３４０）、ヒト化Ｐ１Ｃ４－Ｈ４の重鎖の可変領域（配列番号３４１）およびヒト化Ｐ１Ｃ４の軽鎖（配列番号３３８）を下の表１１に示す。太字の残基は復帰変異であり、下線の残基はＣＤＲ領域を示す。異なるＩｇＧファミリーにおけるＦｃ変異体を作製するために、３つの重鎖定常領域配列を用い

た。ＩｇＧ２重鎖定常領域（配列番号４３３）、ＩｇＧ４重鎖定常領域（配列番号４３４）、ハイブリッドＩｇＧ２／４重鎖定常領域（配列番号４３５）の配列を下の表１１に示す。

【０２７９】

【表１１－１】

表１１．Ｆｃ変異体の設計

| 抗体／フラグメント　名称または配列の説明 | 配列 | 配列番号 |
|---|---|---|
| ヒト化Ｐ１Ｃ４－Ｈ２　重鎖可変領域 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYEFSYYWMNWVRQAPGQGLEWMGQIYPGDGETKYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHGNYLPYWGQGTLVTVSS | 340 |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４－Ｈ４　重鎖可変領域 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYEFSYYWMNWVRQAPGQGLEWMGQIYPGDGETKYNGKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSHGNYLPYWGQGTLVTVSS | 341 |
| ヒト化Ｐ１Ｃ４完全軽鎖 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLHWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 338 |
| ＩｇＧ２　重鎖定常領域 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 433 |
| ＩｇＧ４　重鎖定常領域 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK | 434 |
| Ｈｙｂｒｉｄ　ＩｇＧ２／４　重鎖定常領域 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK | 435 |

【表１１－２】

表１１つづき

| | | |
|---|---|---|
| Ｐ１Ｃ４<br>－Ｈ２－<br>ＩｇＧ２ | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYEFSYYWMNWVRQAPGQGLEWM<br>GQIYPGDGETKYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS<br>HGNYLPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC<br>NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS<br>VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR<br>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFF<br>LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 436 |
| Ｐ１Ｃ４<br>－Ｈ２－<br>ＩｇＧ４ | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYEFSYYWMNWVRQAPGQGLEWM<br>GQIYPGDGETKYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS<br>HGNYLPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC<br>NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF<br>FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK | 437 |
| Ｐ１Ｃ４<br>－Ｈ２－<br>ＩｇＧ２<br>／４ | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYEFSYYWMNWVRQAPGQGLEWM<br>GQIYPGDGETKYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS<br>HGNYLPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC<br>NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF<br>FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK | 438 |
| Ｐ１Ｃ４<br>－Ｈ４－<br>ＩｇＧ２ | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYEFSYYWMNWVRQAPGQGLEWM<br>GQIYPGDGETKYNGKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS<br>HGNYLPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC<br>NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS<br>VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR<br>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFF<br>LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 439 |

【表１１－３】

表１１つづき

| | | |
|---|---|---|
| Ｐ１Ｃ４－Ｈ４－ＩｇＧ４ | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYEFSYYWMNWVRQAPGQGLEWM GQIYPGDGETKYNGKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS HGNYLPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK | 440 |
| Ｐ１Ｃ４－Ｈ４－ＩｇＧ２／４ | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYEFSYYWMNWVRQAPGQGLEWM GQIYPGDGETKYNGKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS HGNYLPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK | 441 |
| Ｐ１Ｃ４－Ｌｃヒト化 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLHWYQQKPGQAPRLLIYST SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSPPTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC | 442 |

【０２８０】

抗体変異体を、異なる日に異なるバッチで２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ、ＣＨＯ－ＳおよびＣＨＯ－Ｋ１細胞中で発現させ、精製した。

【０２８１】

２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ発現について、重鎖および軽鎖配列をコードする個々のｐＴＴ５プラスミドを、完全ＩｇＧ抗体の発現のためにＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ＨＥＫ２９３Ｆ細胞中に同時トランスフェクトした。細胞を、３７℃、５％$CO_2$にて、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３発現培地中で培養した。トランスフェクションの２４時間前に、細胞を８ｘ１０$^5$細胞／ｍＬの密度に希釈した。トランスフェクション溶液を調製するために、８０μｇのＤＮＡ（４０μｇ軽鎖＋４０μｇ重鎖）および２４０μｇのポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を、８ｍＬのＦｒｅｅｓｔｙｌｅ ２９３Ｆ培地に希釈し、十分に混合し、そして０．２μｍのシリンジトップフィルターに通して５０ｍＬコニカルチューブ中に濾過し、次いで、２２℃にて１５分間インキュベートした。８ｍＬのトランスフェクション溶液を８０ｍＬの２９３Ｆ細胞培養物（ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３発現培地中に１．１－１．３ｘ１０$^6$細胞／ｍＬの密度に希釈）にゆっくり添加し、それを、１３０ｒｐｍで回転しながら４日間、３７℃、５％$CO_2$にて、インキュベートした。トランスフェクトされた細胞培養物から上清を、４℃にて、４０００ｒｐｍで４５分遠心することにより回収し、０．１Ｍ ＮａＯＨでｐＨ８．０に調整し、そしてタンパク質精製まで氷上に保持した。

【０２８２】

ＣＨＯ－Ｓ発現について、重鎖および軽鎖配列をコードする個々のｐＴＴ５プラスミドを、完全ＩｇＧ抗体の発現のためにＣＨＯ－Ｓ細胞中に同時トランスフェクトした。細胞を、３７℃、５％$CO_2$にて、ＣＤ－ＣＨＯ培地中で培養した。トランスフェクションの２４時間前に、細胞をＣＤ－ＣＨＯ培地中０．６－０．７ｘ１０$^6$細胞／ｍＬ８ｘ１０$^5$細胞／ｍＬの密度に希釈した。トランスフェクションの日に、細胞を、２５０ｍＬ振盪フラスコ中、ＣＤ－ＣＨＯ培地中、１．１－１．３ｘ１０$^6$細胞／ｍＬの密度まで希釈した。各２５０ｍＬ振盪フラスコに、８ｍＬの細胞を添加した。８０μｇのプラスミドＤＮＡ（４０μｇ軽鎖＋４０μｇ重鎖）を、最終容量４ｍＬのＣＤ－ＣＨＯ培地に希釈し、０．２μｍのシリンジトップフィルターに通して５０ｍＬコニカルチューブ中に濾過した。別個の５０ｍＬコニカルチューブにおいて、８０μＬのＦｒｅｅＳｔｙｌｅ Ｍａｘ試薬を

最終容量４ｍＬのＣＤ－ＣＨＯ培地に希釈した。これらの２つの混合物を２２℃にて３分間インキュベートし、その後、それらを合わせ、混合し、さらに１５分間、２２℃にてインキュベートした。８ｍＬのＤＮＡ／トランスフェクション試薬混合物を、２５０ｍＬフラスコ中の８０ｍＬの細胞培養物にゆっくり添加した。これを、～１．０ｘ１０$^{6}$細胞／ｍＬの最終細胞密度にした。その後、培養フラスコを、１３３ｒｐｍで回転しながら6日間、３７℃、５％$CO_2$にて、オービタル振盪プラットフォーム上でインキュベートした。培養上清を、４℃にて、４０００ｒｐｍで４５分間遠心（Ａｌｌｅｇｒａ　Ｘ－１５Ｒ、Ｂｅｃｋｍａｎ）することにより回収し、０．１Ｍ　ＮａＯＨでｐＨ８．０に調整し、そしてタンパク質精製まで氷上に保持した。

【０２８３】

２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅおよびＣＨＯ－Ｓからの１ｇＧ精製を、以下の通りに行った：上清をタンパク質Ａカラム（０．４ｍＬベッドボリューム（Bed Volume））上に入れ、ＰＢＳでｐＨ７．４に予め平衡化し、重力によって流下させた。カラムを５ｍＬのＰＢＳ　ｐＨ７．４で洗浄し、タンパク質を４ｍＬの０．１Ｍクエン酸Ｎａ－ＨＣｌ　ｐＨ３．５で溶出した。溶離液を２００μＬの１．５Ｍトリス－ＨＣｌ緩衝液ｐＨ８．８で中和し、濃縮し、アミコン３０ｋＤａ　４ｍＬ濃縮器（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を製造者の指示書に従って用いてＰＢＳ　ｐＨ７．４でバッファー交換し、最終容量約０．５－１ｍＬを得た。タンパク質濃度を、２８０ｎｍでの吸光度によって決定し、純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＳＥＣにより測定した。

【０２８４】

ＣＨＯ－Ｋ１におけるタンパク質発現および精製を、医薬品開発業務受託機関（ＣＲＯ）でその独自の（proprietary）方法で行った。要約すると、ＣＨＯ－Ｋ１細胞をトランスフェクションのために使用した。１ｇＧをＭａｂＳｅｌｅｃｔ(商標)ＳｕＲｅ(商標)ビーズを用いて精製し、洗浄工程でダルベッコのＰＢＳ（Ｌｏｎｚａ　ＢＥ１７－５１２Ｑ）を用いた。１ｇＧを０．１Ｍグリシンｐ３．５で溶出した。

【０２８５】

タンパク質ＱＣについて、３μｇの抗体を各試験、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＳＥＣ分析に用いた。ＱＣ通過基準は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいて純度＞９０％であり、ＳＥＣにおいて単量体ピーク＞９０％であった。ＱＣ試験に合格した精製した１ｇＧタンパク質について、タンパク質を、スクリューキャップチューブに１００μＬ／チューブ、～５ｍｇ／ｍＬ濃度で分配した。アリコートを液体窒素中で急速冷凍し、－８０℃で貯蔵した。

【０２８６】

２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅにおけるタンパク質収量は、低いｍｇ／Ｌから５３ｍｇ／Ｌの範囲であった。ＣＨＯ－Ｓ細胞における収量は、約１ｍｇ／Ｌと低かった。ＣＨＯ－Ｋ１細胞における収量は、１９８ｍｇ／Ｌから３５０ｍｇ／Ｌの範囲であった。ＳＤＳ－ＰＡＧＥは、非還元条件下で約１５０ｋＤａで泳動する完全なタンパク質、および目に見える分解または凝集のない、重鎖および軽鎖を代表する２つのバンドが見られた。例として、２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅバッチの１つについてのＳＥＣプロファイルおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を図１４Ａに示し、ＣＨＯ－Ｋ１バッチの１つについて図１４Ｂに示した。２９３ＦｒｅｅＳｔｙｌｅおよびＣＨＯ－Ｓバッチについてのタンパク質精製データを表１２にまとめる。

【０２８７】

【表１２】

表１２．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ｍＡｂ　タンパク質精製のまとめ

| サンプル | タンパク質濃度(mg/mL) | 容量(uL) | 量(ug) | 培養量(mL) | 収量(mg/L) | ＳＥＣによる単量体(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| P1C4－H2－IgG2 | 2.10 | 11500 | 24150.00 | 600.00 | 40.25 | >90 |
| P1C4－H2－IgG2 | 2.94 | 500 | 1470.00 | 160.00 | 9.19 | >90 |
| P1C4－H2－IgG4 | 2.24 | 14400 | 32256.00 | 600.00 | 53.76 | >90 |
| P1C4－H2－IgG4 | 2.22 | 500 | 1110.00 | 160.00 | 6.94 | >90 |
| P1C4－H2－IgG4 (CHO－S) | 0.28 | 250 | 69.00 | 80.00 | 0.86 | >90 |
| P1C4－H2－IgG2/4 | 2.18 | 12500 | 27250.00 | 600.00 | 45.42 | >90 |
| P1C4－H2－IgG2/4 | 1.01 | 600 | 606.00 | 160.00 | 3.79 | >90 |
| P1C4－H4－IgG2 | 2.23 | 7200 | 16056.00 | 600.00 | 26.76 | >90 |
| P1C4－H4－IgG2 | 3.43 | 750 | 2572.50 | 160.00 | 16.08 | >90 |
| P1C4－H4－IgG4 | 2.39 | 10700 | 25573.00 | 600.00 | 42.62 | >90 |
| P1C4－H4－IgG4 | 5.45 | 500 | 2725.00 | 160.00 | 17.03 | >90 |
| P1C4－H4－IgG4 (CHO－S) | 0.28 | 250 | 68.75 | 80.00 | 0.86 | >90 |
| P1C4－H4－IgG2/4 | 2.02 | 9700 | 19594.00 | 600.00 | 32.66 | >90 |
| P1C4－H4－IgG2/4 | 3.14 | 750 | 2355.00 | 160.00 | 14.72 | >90 |

【０２８８】

実施例１８．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体についてのｃＡＭＰ機能アッセイ

クリプテート標識した抗ｃＡＭＰ抗体およびｄ２標識したｃＡＭＰを用いる競合イムノアッセイフォーマットに基づく市販のキット(Cisbio)を使用して、ＣＢ１を安定に発現するＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞において細胞内ｃＡＭＰレベルの変化を測定することにより、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体抗体を特徴付けた。細胞数、フォルスコリン濃度およびＣＰ５５，９４０濃度を、製造者の指示書に従って最適化した。ｃＡＭＰアンタゴニスト機能アッセイを白色３８４ウェル低容量プレート（Greiner）にて行った。ヒトＣＢ１を発現するＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を、８０００細胞／ウェルの密度で血清不含有ＨａｍのＦ１２培地に播種し、次いで種々の濃度のｍＡｂまたは対照化合物と共に２２℃にて１０分間インキュベートした。５μＭのフォルスコリン（ＥＣ２０にて、Sigma Aldrich）および９ｎＭのＣＰ５５，９４０（ＥＣ８０にて、Sigma Aldrich）を、続けて細胞に添加し、２２℃にて３０分間インキュベートして、それぞれがアデニリルシクラーゼ活性を増強させ、ＣＢ１シグナル伝達を活性化させた。その後、５μＬのｃＡＭＰ－ｄ２（Ｃｉｓ

ｂｉｏが提供する複合体および溶解バッファーで１：３９希釈）および５μＬの抗ｃＡＭＰクリプテート（Ｃｉｓｂｉｏが提供する複合体および溶解バッファーで１：９希釈）を細胞に添加し、２２℃にて１時間インキュベートした。ＦＲＥＴシグナルを、６２０ｎＭでの抗ｃＡＭＰクリプテート励起および６６５ｎＭでの放出にて、Ｅｎｖｉｓｉｏｎマルチラベルプレートリーダー（Perkin Elmer）で検出した。データ分析をＧｒａｐｈＰａｄプリズムを用いて行った。

【０２８９】

このアッセイにおけるヒト化ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４抗体の活性を、親キメラＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４、リモナバン、ＣＢ１の小分子インバースアゴニストおよびＰ２Ａ１２ ｍＡｂ、ＩｇＧ１アイソタイプの非ＧＰＣＲ標的化ｍＡｂ陰性対照抗体と比較した。ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ｍＡｂおよびそのヒト化変異体は、用量依存的に、ＣＰ５５，９４０により誘導される細胞内ｃＡＭＰの低下を阻害するが、陰性対照であるＰ２Ａ１２　ｍＡｂは、何らの効果も有さなかった（図１５）。ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の平均ＩＣ５０±ＳＤを表１３に列記する。

【０２９０】

【表１３】

**表１３．ｃＡＭＰアンタゴニストアッセイにより決定されるヒト化Ｐ１Ｃ４変異体のＩＣ$_{50}$のまとめ**

| | cAMP IC50 (nM) | cAMP IC50 (nM) | cAMP IC50 (nM) | cAMP IC50 (nM) |
|---|---|---|---|---|
| | 平均±SD[n] | ﾊﾞｯﾁ1の平均[n] | ﾊﾞｯﾁ2の平均[n] | CHO－S[n] |
| ｷﾒﾗ P1C4－IgG | 138±21 [6] # | 120±11 [3] | 155±8 [3] | N/A |
| P1C4－h0－IgG1 | 195±96 [5] # | 158±57 [4] | 343 [1] | N/A |
| P1C4－h2－IgG1 | 41±4 [3]** ## | 41±4 [3] | N/A | N/A |
| P1C4－h2－IgG2 | 84±13 [6] ** ## | 77±13 [3] | 91±11 [3] | N/A |
| P1C4－h2－IgG4 | 61±13 [7] ** ## | 54±8 [3] | 63±17 [3] | 72 [1] |
| P1C4－h2－IgG2/4 | 79±13 [6] ** ## | 74±14 [3] | 85±13 [3] | N/A |
| P1C4－h4－IgG1 | 42±7 [6] ** ## | 40±6 [3] | 44±7 [3] | N/A |
| P1C4－h4－IgG2 | 81±19 [6] ** ## | 82±28 [3] | 80±13 [3] | N/A |
| P1C4－h4－IgG4 | 54±9 [7] ** ## | 54±12 [3] | 54±11 [3] | 51 [1] |
| P1C4－h4－IgG2/4 | 80±17 [6] ** ## | 69±9 [3] | 90±17 [3] | N/A |
| リモナバン | 417±82 [3]* | n/a | n/a | n/a |

**＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．００５；および、リモナバンと比較して、$^{\#}$ｐ＜０．０５、$^{\#\#}$ｐ＜０．０２．**

【０２９１】

ヒト化Ｐ１Ｃ４－ｈ２およびｈ４変異体は、ｃＡＭＰアンタゴニストアッセイにおいて、キメラＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ｍＡｂよりも強力（１．６－３．３倍）であった（ｐ

＜０．００５）。Ｐ１Ｃ４－ｈ２およびＰ１Ｃ４－ｈ４ヒト化変異体は、同等の効力を有していたが、ヒト化ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４変異体の異なるアイソタイプのうち、ＩｇＧ２およびＩｇＧ２／４変異体に対してＩｇＧ１およびＩｇＧ４変異体でより高い効力が観察される傾向があった。

【０２９２】

本発明者らはさらに、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体抗体アンタゴニスト作用の機序、特にかかる抗体がＣＢ１インバースアゴニストまたはニュートラルアンタゴニストとして作用するかどうかを特徴付けた。リモナバン（ＳＲ１４１７１６Ａ）、既知のＣＢ１インバースアゴニストおよびＡＭ６５４５、既知のＣＢ１ニュートラルアンタゴニストを、対照化合物として用いた。

【０２９３】

ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体抗体が、インバースアゴニストまたはニュートラルアンタゴニストとして作用するかどうかを特徴付けるために、ｃＡＭＰアッセイを外因性アゴニストの不存在下で行った。非特異的なアデニル酸シクラーゼアクティベーターであるフォルスコリンを、該アッセイ培地に添加し、検出の限界内に基礎ｃＡＭＰレベルを上昇させた。ｃＡＭＰアゴニスト機能アッセイ(Cisbio)を白色３８４ウェル低容量プレート（Greiner）で行った。血清不含有ＨａｍのＦ１２培地中、８０００細胞／ウェルのヒトＣＢ１を発現するＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を該プレートに播種し、その後種々の濃度のｍＡｂまたは対照化合物と共に、２２℃にて１０分間インキュベートした。５μＭのフォルスコリン（Sigma Aldrich）を細胞に添加し、２２℃にて３０分間インキュベートした。２２℃にて３０分間のインキュベーション後、５μＬのｃＡＭＰ－ｄ２（Ｃｉｓｂｉｏが提供する複合体および溶解バッファーで１：３９希釈）および５μＬの抗ｃＡＭＰクリプテート（Ｃｉｓｂｉｏが提供する複合体および溶解バッファーで１：９希釈）を細胞に添加し、１時間インキュベートした。ＦＲＥＴシグナルを、６２０ｎＭでの抗ｃＡＭＰクリプテート励起および６６５ｎＭでの放出にて、Ｅｎｖｉｓｉｏｎマルチラベルプレートリーダー（Perkin Elmer）で検出した。データ分析をＧｒａｐｈＰａｄプリズムを用いて行った。

【０２９４】

本発明者らは、１．５μＭのフォルスコリンで刺激したＴＲｅｘ－ＣＨＯ　ＣＢ１細胞（図１６Ａ）ならびに５μＭのフォルスコリンで刺激したＴＲｅｘ－ＣＨＯ　ＣＢ１細胞（図１６Ｂ）において、ヒト化変異体Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４と、リモナバン、ＡＭ６５４５およびＰ２Ａ１２－ＩｇＧ１陰性対照抗体との活性を比較した。結果は、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ１、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４およびリモナバンがｃＡＭＰレベルを用量依存的に増加させ、それらはインバースアゴニスト機序を示していた。これに対して、ＣＢ１ニュートラルアンタゴニストであるＡＭ６５４５およびＰ２Ａ１２－ＩｇＧ１陰性対照抗体は、ｃＡＭＰレベルに影響を及ぼさなかった。

【０２９５】

シルドプロット分析を行い、用いたアゴニストの性質および濃度とは関係のない、その受容体に対するアンタゴニストの結合親和性の尺度である、平衡解離定数（$K_B$）を決定した。ｃＡＭＰ ＨＴＲＦアンタゴニストアッセイにおける、ＣＢ１アゴニストであるＣＰ５５，９４０およびＷＩＮ５５，２１２の用量応答曲線は、種々の濃度のＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４の存在下で決定された。

【０２９６】

図１７Ａ－Ｄは、ｃＡＭＰアッセイにより、ＣＰ５５，９４０およびＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＣＢ１活性に対する、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４濃度の増加の効果を示す（それぞれ）。用量比（Ｒ）は、ＣＢ１アゴニスト（ＣＰ５５，９４０またはＷＩＮ５５，２１２）の濃度を、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４不存在下で得られるのと同じ反応をその存在下で得るために増加する必要があることによる、ＣＰ５５，９４０またはＷＩＮ５５，２１２のＥＣ５０に基づいて計算された。以下の表１４および１５は、４つの異な

る試験から測定されたシルトスロープ（Schild slope）および平衡解離定数（$K_B$）を示す。

【０２９７】

【表１４】

表１４．シルトスロープおよび平衡解離定数ＣＰ５５，９４０

| CP55,940 | 試験１ | 試験２ | 試験３ | 試験４ |
|---|---|---|---|---|
| シルトスロープ | １．７５ | １．７５５ | １．３２ | １．４４ |
| $K_B$（ｎＭ） | ４８ | １５ | ２６ | ２８ |

【０２９８】

【表１５】

表１５．シルトスロープおよび平衡解離定数ＷＩＮ５５，２１２

| WIN55,212 | 試験１ | 試験２ | 試験３ | 試験４ |
|---|---|---|---|---|
| シルトスロープ | １．４ | ２．１ | １．５ | １．６ |
| $K_B$（ｎＭ） | ２１ | １７ | ２２．４ | ２８ |

【０２９９】

実施例１９．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体についてのＥＲＫ活性化アッセイ

本発明者らは、親抗体ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４が、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＥＲＫ活性化を阻害することを実施例１０および図５Ａに示した。ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体もまたＷＩＮ５５，２１２により誘導されたＥＲＫ活性化を阻害することを確認するために、本発明者らは、これらの抗体のＷＩＮ５５，２１２により誘導されたＥＲＫリン酸化を阻害する能力を試験した。

【０３００】

試験の２日前、Ｔｒｅｘ－ＣＨＯ　ＣＢ１受容体を発現する細胞を、６ウェルプレートに５００，０００細胞／ウェルで播種した。１μｇ／ｍＬのテトラサイクリンを用いて、２３時間後にＣＢ１受容体発現を誘導した。細胞を、試験の少なくとも２時間前に血清飢餓状態にした。３００ｎＭの精製したＩｇＧを培養培地に添加し、３０分後、細胞をＣＢ１受容体アゴニストであるＷＩＮ５５，２１２（１００ｎＭ）で１０分間および１５分間刺激した。細胞溶解物を回収し、ＥＲＫ活性化レベルをウェスタンブロットにより決定した。抗ＥＲＫ抗体および抗リン酸特異的ＥＲＫ抗体をCell Signaling Inc.から入手した。

【０３０１】

図１８Ａに示す通り、ＣＢ１アゴニストであるＷＩＮ５５，２１２での処理は、リン酸化ＥＲＫレベルを増加させ、ＣＢ１受容体がＥＲＫ経路を経てシグナル伝達することが示唆された。ＣＢ１特異的アンタゴニストであるリモナバンでの前処理は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＥＲＫ活性化を阻害した。リモナバンと同様に、抗ＣＢ１抗体Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ１およびＰ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ１での前処理は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＥＲＫ活性化を阻害した（図１８Ａ）。Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＥＲＫ活性化を阻害しなかった。このことは、Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１が、他のヒト化Ｐ１Ｃ４変異体よりも効力が低いことを示す、ｃＡＭＰアンタゴニストアッセイと一致し、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されたＥＲＫ活性化を阻害する効果がないとの仮説が成り立つ。

【０３０２】

ＷＩＮ５５，２１２により活性化されたＥＲＫ経路へのＩｇＧ２およびＩｇＧ４フレームワークにおけるＰ１Ｃ４－ｈ２の効果も調べた。キメラＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４および

ヒト化Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ１と同様に、ＣＢ１抗体であるＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４での前処理は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＥＲＫリン酸化を阻害した（図１８Ｂ）。ＧＰＣＲを標的化しないｍＡｂであるＰ２Ａ１２は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＥＲＫ活性化を阻害しなかった。これらの結果は、これらのＦｃフレームワークがＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４のアンタゴニスト特性に影響を与えないことを示している。

【０３０３】

実施例２０．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体についてのＣＢ１受容体内在化の試験

フローサイトメトリーを用いて、アゴニストまたはアンタゴニスト化合物の存在下または不存在下での、ＣＢ１受容体内在化アッセイにおいて、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４およびヒト化変異体抗体の活性を特徴付けた。

【０３０４】

試験の日、細胞を２時間血清飢餓状態にした。その後、細胞をＣＢ１抗体（３００ｎＭ）、ＡＭ６５４５（ＣＢ１ニュートラルアンタゴニスト）および陰性対照（ＢＲＩＬ結合体）と共に３０分間前処理した。次いで、ＣＢ１アゴニスト（１μＭのＷＩＮ５５，２１２）を培養培地に１時間添加し、受容体内在化を誘導した。ＣＢ１の表面発現を、Ｒ＆Ｄから入手した抗ＣＢ１　Ｎ末端マウスモノクローナル抗体を用いて染色し、平均蛍光強度（ＭＦＩ）をフローサイトメトリー（Ｇｕａｖａ）を用いて決定した。

【０３０５】

ＴＲｅｘ－２９３細胞におけるＣＢ１発現は、ＣＢ１　Ｎ末端を標的とするマウスモノクローナル抗体を用いる表面染色の増加によって明らかなように、テトラサイクリンにより誘導された（図１９Ａ、パネルＡ、点線）。テトラサイクリンおよびＣＢ１アゴニストであるＷＩＮ５５，２１２での処理は、表面染色を減らし、内在化を介して細胞表面上のＣＢ１の喪失を示した（図１９Ａ、パネルＡ、破線）。ＣＢ１特異的アンタゴニストであるリモナバンでの前処理（図１９Ａ、パネルＢ、黒一色線）は、細胞表面のＣＢ１染色におけるアゴニストにより誘導される減少を阻害した。リモナバンと同様に、抗ＣＢ１抗体（ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（図１９Ａ、パネルＤ、黒一色線）、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ１（図１９Ａ、パネルＦ、黒一色線）およびＰ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ１（図１９Ａ、パネルＧ、黒一色線））での前処理は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＣＢ１受容体内在化を阻害した。Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１（図１９Ａ、パネルＥ、黒一色線）および陰性対照抗体であるＰ２Ａ１２－ＩｇＧ１（図１９Ａ、パネルＣ、黒一色線）は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＣＢ１内在化を阻害しなかった。ｃＡＭＰアンタゴニストおよびＥＲＫ活性化アッセイと一致して、Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１は、他のヒト化Ｐ１Ｃ４変異体よりも効力が低く、ＷＩＮ５５，２１２により誘導される受容体内在化を阻害する効果の欠如は、Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１の高いオフレート（off-rate）のためであり得る。

【０３０６】

異なるヒトＩｇＧサブクラスのうち、ＩｇＧ２およびＩｇＧ４サブクラスのＦｃ領域は、ＦｃγＲおよび補体１ｑ（Ｃ１ｑ）を活性化するようなエフェクター分子に弱く結合し、結果として、より低いエフェクター機能の活性をもたらす。例えば、Ｐ１Ｃ４－ｈ２は、免疫エフェクター機能の活性化が望ましくない、本発明者らの治療適用として、ヒトＦｃフレームワークＩｇＧ２およびＩｇＧ４中にクローニングされた（実施例１７に記載）。その後、ヒト化変異体Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ１、Ｐ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ１、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４を、ＣＢ１受容体内在化の阻害についてアッセイした。上記のとおり、ＴＲｅｘ－２９３細胞におけるＣＢ１発現は、ＣＢ１Ｎ末端を標的とするマウスモノクローナル抗体を用いる表面染色の増加によって明らかとなるように、テトラサイクリンにより誘導された（図１９Ｂ、パネルＡ、点線）。テトラサイクリンおよびＣＢ１アゴニストであるＷＩＮ５５，２１２での処理は、表面染色を減らし、内在化を介して細胞表面上のＣＢ１の喪失を示した（図１９Ｂ、パネルＡ、破線）。ＣＢ１特異的アンタゴニストであるリモナバンでの前処理（図１９Ｂ、パネルＢ、黒

一色線）は、細胞表面のＣＢ１染色におけるアゴニストにより誘導される減少を阻害した。リモナバンと同様に、抗ＣＢ１抗体（ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（図１９Ｂ、パネルＤ、黒一色線）、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ１（図１９Ｂ、パネルＦ、黒一色線）およびＰ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ１（図１９Ｂ、パネルＧ、黒一色線））での前処理は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＣＢ１受容体内在化を阻害した。Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１（図１９Ｂ、パネルＥ、黒一色線）および陰性対照抗体であるＰ２Ａ１２－ＩｇＧ１（図１９Ｂ、パネルＣ、黒一色線）は、ＷＩＮ５５，２１２により誘導されるＣＢ１内在化を阻害しなかった。

【０３０７】

実施例２１．フローサイトメトリーによる、ヒト化ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４抗体変異体の結合

ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の結合親和性を、ＣＢ１を安定にトランスフェクトしたＴＲｅｘ ＣＨＯ細胞を用いてフローサイトメトリーにより決定した。テトラサイクリンを誘導可能なヒトＣＢ１、ヒトＣＢ２またはマウスＣＢ１発現構築物を安定にトランスフェクトしたＴＲｅｘ ＣＨＯ親細胞およびＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を回収した。試験抗体の結合を決定するために、１００μＬの１ｘ１０$^{6}$細胞／ｍＬの細胞を、１μＭから１．３ｎＭの濃度範囲の試験抗体と共に氷上で３０分間インキュベートした。その後、細胞を、４℃にて、１６００ｒｐｍで３分間遠心した。上清を吸引し、細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で洗浄した。洗浄手段を２回繰り返した。最後の洗浄後、細胞を、ＰＥ結合抗ヒトＦｃ二次抗体（１：２００希釈）を含むＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、４℃で３０分間インキュベートした。細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、フローサイトメトリー（Ｇｕａｖａ）により分析した。データ分析および結合親和性（$K_D$）の測定を、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェアを用いて行った。ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の平均解離定数（$K_D$）を、タンパク質の少なくとも２つの異なるバッチを用いて、少なくとも４つの異なる試験を平均することにより、決定した（図２０Ａ－Ｄおよび表１６）。

【０３０８】

【表１６】

表１６．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の平均解離定数（$K_D$）

| | 結合親和性$K_D$（ｎＭ） | 結合親和性$K_D$（ｎＭ） | | |
|---|---|---|---|---|
| | 平均±ＳＤ［ｎ］ | バッチ１の平均［ｎ］ | バッチ２の平均［ｎ］ | バッチ３の平均［ｎ］ |
| PA13R3－P1C4 | 103±18 [7] | 92 [3] | 116 [3] | 96 [1] |
| P1C4－h0－IgG1 | 24±6 [7] *** | 23 [4] | 24 [3] | 24 [3] |
| P1C4－h2－IgG1 | 41±18 [4] ** | 41 [4] | N/A | N/A |
| P1C4－h2－IgG2 | 78±24 [6] | 74 [3] | 77 [3] | N/A |
| P1C4－h2－IgG4 | 57±11 [7] *** | 59 [3] | 59 [3] | 43 [1] |
| P1C4－h2－IgG2/4 | 82±24 [6] | 82 [3] | 82 [3] | N/A |
| P1C4－h4－IgG1 | 37±12 [7] *** | 37 [4] | 37 [3] | N/A |
| P1C4－h4－IgG2 | 65±26 [6] * | 65 [3] | 65 [3] | N/A |
| P1C4－h4－IgG4 | 49±15 [7] *** | 51 [3] | 49 [3] | 49 [1] |
| P1C4－h4－IgG2/4 | 75±41 [6] | 69 [3] | 74 [3] | N/A |

*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１、***ｐ＜０．００１。

【０３０９】

ｈ２－ＩｇＧ２、ｈ２－ＩｇＧ２／４およびｈ４－ＩｇＧ２／４を除くヒト化変異体は、親キメラ抗体ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４と比較してヒトＣＢ１に対する統計的に有意に増加した結合親和性を示した。それぞれの種の平均解離定数を、少なくとも２つの異なるタンパク質調製物（唯一のタンパク質調製物を有するＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ１を除く）を用いて決定した。それぞれの種解離定数は、異なるタンパク質調製物間で同等であった（表１６）。Ｐ１Ｃ４－ｈ２およびＰ１Ｃ４－ｈ４変異体の結合親和性は、類似していた。しかしながら、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４およびＩｇＧ２／４変異体と比べて、ＩｇＧ１変異体のより高い結合親和性が、統計的に有意ではないが、わずかな傾向で観察された。

【０３１０】

Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１は、測定された最低の見かけの解離定数（$K_D$ ２４ｎＭ）を有する。しかしながら、Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１の最大ＦＡＣＳシグナル（平均蛍光強度）は、他のＰ１Ｃ４変異体ほど高くならなかった。このことは、Ｐ１Ｃ４－ｈ０－ＩｇＧ１のより高いオフレートを示し得る。

【０３１１】

ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４の結合選択性および交差反応性ならびにそのヒト化変異体もまた、目的のＧＰＣＲを安定にトランスフェクトしたＴＲｅｘ ＣＨＯ細胞を用いてフローサイトメトリーにより特徴付けた。具体的には、ＣＢ２を超えるＣＢ１の結合選択性が決定された。マウスＣＢ１に対する交差反応性も決定された。マウスＣＢ１の発現を決定するために、１００μＬの１ｘ１０$^6$細胞／ｍＬの細胞を、１μｇ／１００μＬの抗ＣＢ１

ウサギポリクローナル抗体（Santa Cruz）と共に、氷上で３０分間インキュベートした。Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから入手したマウスモノクローナル抗ＣＢ２抗体を用いて、ＣＢ２の発現を確認した。１００μＬの１ｘ１０$^{6}$細胞／ｍＬの細胞を、０．５μｇ／１００μＬの抗ＣＢ２抗体と共に、氷上で３０分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を４℃にて１６００ｒｐｍで３分間遠心した。上清を吸引し、細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で洗浄した。この手順を２回繰り返した。最後の洗浄後、細胞を、マウスＣＢ１検出のためのＦＩＴＣ結合抗ウサギ二次抗体（１：２００希釈）およびＣＢ２発現のためのＰＥ結合抗マウスＩｇＧ二次抗体（１：２００希釈）を含むＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、４℃にて３０分間インキュベートした。３０分間、二次抗体と共にインキュベーション後、細胞を４℃にて１６００ｒｐｍで３分間遠心した。上清を吸引し、過剰量の二次抗体を除いた。細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、フローサイトメトリー（Ｇｕａｖａ）により分析した。１μＭから１．３ｎＭの完全な濃度曲線の範囲の精製したＩｇＧの結合を決定した。データ分析及び結合親和性（$K_D$）の測定を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを用いて行った。

【０３１２】

ｏｆ　ヒト化ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４変異体の、ヒトＣＢ２およびマウスＣＢ１よりもヒトＣＢ１に対する結合選択性および交差反応性を、図２０Ｅ－Ｍに示す。ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４と同様に、ヒト化変異体は、ヒトＣＢ２よりもヒトＣＢ１に選択的に結合した。マウスＣＢ１への実質的な結合は、１μＭまでの濃度で観察され、細胞外ドメインにおけるヒトおよびマウスＣＢ１間の高いアミノ酸同一性（９７％の同一性）にもかかわらず、この種との交差反応性の欠如が示唆された。

【０３１３】

実施例２２．ＥＬＣ２の交換（swapping）はＦＡＣＳ結合へ作用する

細胞表面に発現されるＣＢ１へのＰ１Ｃ４の結合能力に対するＥＣＬ２変異の効果を試験するために、本発明者らは、　部位特異的変異誘発によってＣＢ１細胞発現構築物を構築した。該して、２つのオリゴ、Ａｐｏｌｌｏ＿ＥＣＬ２＿ｈ２ｍ＿Ｆ（ＣＴＧＣＡＡＴＣＴＧＴＴＴＧＣＴＣＡＧＡＣＡＴＴＴＴＣＣＣＡＣＴＣＡＴＴＧＡＴＧＡＡＡＣＣＴＡＣＣＴ）（配列番号８２６）およびＡｐｏｌｌｏ＿ＥＣＬ２＿ｈ２ｍ＿Ｒ（ＧＧＡＡＡＡＴＧＴＣＴＧＡＧＣＡＡＡＣＡＧＡＴＴＧＣＡＧＴＴＴＣＴＴＧＣＡＧＴＴＣＣＡＧＣＣＣＡＧＧ）（配列番号８２７）をＰＣＲ反応のプライマーとして用い、テンプレートとしてｐｃＤＮＡ４ＴＯ－ヒトＣＢ１を用いた。ＥＣＬ２にＥ→ＫおよびＨ→Ｌ変異を導入する反応により、マウスＣＢ１　ＥＣＬ２と同一のヒトＣＢ１　ＥＣＬ２配列を作製した。５０μＬのＰＣＲ反応混合物は、１０μＬの５×ＰＣＲ緩衝液、２μＬのｄＮＴＰ（各１０ｍＭ）、０．２５μＬの各フォワードおよびリバースプライマー（１００μＭストック）、５０ｎｇのテンプレートＤＮＡ、１μＬのＤＭＳＯおよび１μＬのＰｈｕｓｉｏｎポリメラーゼ（ＮＥＢ）を含んだ。ＰＣＲサイクルは、９５℃にて３０秒、５５℃にて１分、７２℃にて７分であって、これを１６回繰り返す。ＰＣＲ反応の完了後、１μＬのＤｐｎＩ（２０Ｕ／μＬ）をＰＣＲ産物に添加した。ＰＣＲ産物を３７℃にて１時間インキュベートし、その後、その１μＬをＤｈ５α　大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体を播種し、単一コロニーを、変異を確認するために配列決定した。得られた構築物を、ｐｃＤＮＡ４ＴＯ－ヒト／マウスＥＣＬ２交換ＣＢ１－ＩＲＥＳ－ＧＦＰと名付けた。

【０３１４】

ＥＣＬ２におけるＥ→ＫおよびＨ→Ｌ部位がＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ＣＢ１結合に重要であることを確認するために、ヒトＣＢ１、マウスＣＢ１またはヒト／マウスＥＣＬ２交換発現構築物で一過性にトランスフェクトしたＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を用いて、フローサイトメトリーによりＰ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ１の結合を調べた。

【０３１５】

ＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を、１０％ウシ胎仔血清、１％ペニシリンおよびストレプトマイシンならびに１０μｇ／ｍｌのブラストサイジンを添加したＨａｍのＦ１２培養培地中で増殖させた。トランスフェクションの前日、細胞を継代し、６ウェルプレートにおいて、

１ウェル当たり２ｍｌの培養培地に０．５ｘ１０$^{6}$細胞で播種した。トランスフェクションの日、細胞を、Life Technologiesの指示に従って、リポフェクタミン２０００を用いて、ｐｃＤＮＡ４ＴＯ－ヒトＣＢ１、ｐｃＤＮＡ４ＴＯ－マウスＣＢ１－ＩＲＥＳ－ＧＦＰ、ｐｃＤＮＡ４ＴＯ－ヒト／マウスＥＣＬ２ｌ交換ＣＢ１－ＩＲＥＳ－ＧＦＰまたはｐｃＤＮＡ４ＴＯ－ＧＦＰ陰性対照でトランスフェクトした。トランスフェクションの１日後、細胞を１μｇ／ｍｌのテトラサイクリンで２４時間処理して、ＣＢ１発現を誘導した。試験日に、培地を吸引した。細胞をＤＰＢＳで１回洗浄し、細胞解離緩衝液と共に５分間インキュベートした。細胞を回収し、１６００ｒｐｍで３分間遠心した。上清を吸引し、細胞をＤＰＢＳで洗浄した。細胞数をＢｉｏ－Ｒａｄ　Ｔ１０細胞カウンターを用いて決定した。細胞を１６００ｒｐｍで３分間遠心した。上清を吸引してＤＰＢＳを除去し、１ｘ１０$^{6}$細胞／ｍＬでＦＡＣＳ緩衝液（ＤＰＢＳ中、３％ＦＢＳ、０．０９％アジ化ナトリウム）に再懸濁した。ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ｍＡｂのヒトＣＢ１への結合を決定するために、マウスＣＢ１、ヒト／マウスＥＣＬ２交換ＣＢ１および対照細胞、１００μＬの１ｘ１０$^{6}$細胞／ｍＬの細胞を、Ｐ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ１、Ｒ＆Ｄ　ＣＢ１　ｍＡｂまたはＰ２Ａ１２と共に氷上で３０分間インキュベートした。二次ＰＥ結合抗ヒトｍＡｂまたはＰＥ結合抗マウスｍＡｂを、ＦＡＣＳ緩衝液で１：２００倍に希釈した。二次抗体でのみ染色された細胞を陰性対照として用いた。二次抗体と共にインキュベーション後、細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、フローサイトメトリー（Ｇｕａｖａ）で分析した。

【０３１６】

図２１に示す通り、Ｐ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ１はヒトＣＢ１に結合するが、マウスＣＢ１またはヒト／マウスＥＣＬ２交換ＣＢ１には結合しなかった。ヒトＣＢ１とヒト／マウスＥＣＬ２交換ＣＢ１との唯一の違いは、ＥＣＬ２の残基Ｅ→ＫおよびＨ→Ｌである。フローサイトメトリー結合結果は、ＥＣＬ２がＰ１Ｃ４結合に重要であることを示唆した。Ｒ＆Ｄ　ＣＢ１モノクローナル抗体を、ＣＢ１の発現を示す陽性対照として用いた。Ｐ２Ａ１２およびｐｃＤＮＡ４ＴＯ－ＧＦＰを、それぞれ染色対照および空のベクター対照として使用した。

【０３１７】

実施例２３．ＡＤＣＣおよびＣＤＣエフェクター機能分析

ヒト化Ｐ１Ｃ４変異体Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４のエフェクター機能の推定される不存在を確認するために、抗体依存性細胞細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイおよび補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイをＤａｕｄｉ細胞を用いて行った。

【０３１８】

ＡＤＣＣアッセイについて、Ｄａｕｄｉ標的細胞濃度を、ＡＤＣＣ培地で１２．５×１０$^{4}$細胞／ｍＬに調整した。８０μＬの細胞懸濁液（１×１０$^{4}$生細胞）を丸底９６ウェルプレートの各ウェルに添加した。ＡＤＣＣ培地で連続希釈した２０μＬの抗体を、三連で各ウェルに分注した。リツキシマブおよび抗ｈｅｌ－ｈＩｇＧ１の終濃度は、０．１２８ｎｇ／ｍＬ、０．６４ｎｇ／ｍＬ、３．２ｎｇ／ｍＬ、１６ｎｇ／ｍＬ、８０ｎｇ／ｍＬ、０．４μｇ／ｍＬ、２μｇ／ｍＬであった。抗ｈｅｌ－ｈＩｇＧ２、抗ｈｅｌ－ｈＩｇＧ４、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４の終濃度は、３．２ｎｇ／ｍＬ、１６ｎｇ／ｍＬ、８０ｎｇ／ｍＬ、０．４μｇ／ｍＬ、２μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、５０μｇ／ｍＬであった。プレートを２２－２５℃にて３０分間インキュベートした。ＰＢＭＣ濃度をＡＤＣＣ培地で調整し、それにより１００μＬのＰＢＭＣ細胞を標的細胞に添加することになり、エフェクター：標的細胞比はそれぞれ２５：１および５０：１であった。プレートを２５０ｘｇで４分間遠心し、その後、３７℃でインキュベートした。上清を回収する４５分前に、ＣｙｔｏＴｏｘ９６キット（Ｐｒｏｍｅｇａ）からの２０μＬの溶解溶液を、最大溶解対照ウェルに添加した。インキュベーションの５時間後、プレートを２５０ｘｇで４分間遠心した。各ウェルから５０μＬの上清を新しい平底９６ウェルアッセイプレートに移した。ＣｙｔｏＴｏｘ　９６キット（Ｐｒｏｍｅｇａ

）からの５０μＬの基質を各ウェルに添加し、３０秒間混合した。プレートを室温にて３０分間インキュベートし、その後、５０μＬの停止溶液を各ウェルに添加し、３０秒間混合した。吸光度を４９０ｎＭで読み取った。データ分析のために、％溶解は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ５．０を用いて以下のように計算され、ＩＣ$_{50}$値を求めた：

【化１】

$$\%\ \text{溶解} = \frac{(\text{試験的放出}) - (\text{標的} + \text{PBMC})}{(\text{最大溶解}) - \text{Ave}(\text{標的のみ})} \times 100\%$$

【０３１９】

リツキシマブは、５０：１のＥ／Ｔ比で１．１９ｎｇ／ｍＬのＩＣ５０、２５：１のＥ／Ｔ比で０．９２ｎｇ／ｍＬのＩＣ５０で、Daudi細胞にＡＤＣＣ効作用を誘導した。図２２Ａ－Ｃに示す通り、Ｐ１Ｃ４　Ｆｃ変異体抗体は、５０：１および２５：１のＥ／Ｔ比でＤａｕｄｉ細胞にＡＤＣＣ効作用を有しなかった。

【０３２０】

ＣＤＣアッセイについて、Ｄａｕｄｉ標的細胞を回収し、細胞濃度を、細胞培養培地で$80\times10^4$細胞／ｍＬに調整した。平底９６ウェル白色プレートに、２５μＬ／ウェルの細胞を添加した。その後、ＡＤＣＣ培地で連続希釈した、１２．５μＬ／ウェルのＰ１Ｃ４、リツキシマブ、抗ＨＥＬ－ｈＩｇＧ１および抗ＨＥＬ－ｈＩｇＧ２を各ウェルに二連で添加した。リツキシマブおよび抗ｈｅｌ－ｈＩｇＧ１の終濃度は、０．１２８ｎｇ／ｍＬ、０．６４ｎｇ／ｍＬ、３．２ｎｇ／ｍＬ、１６ｎｇ／ｍＬ、８０ｎｇ／ｍＬ、０．４μｇ／ｍＬ、２μｇ／ｍＬであった。抗ｈｅｌ－ｈＩｇＧ２、抗ｈｅｌ－ｈＩｇＧ４、Ｐ１Ｃ４－Ｈ２－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－Ｈ２－ＩｇＧ４の終濃度は、３．２ｎｇ／ｍＬ、１６ｎｇ／ｍＬ、８０ｎｇ／ｍＬ、０．４μｇ／ｍＬ、２μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、５０μｇ／ｍＬであった。プレートを１５分間インキュベートした。ＡＤＣＣ培地で希釈したヒト補体を、１０％の終濃度に達するように１２．５μＬ／ウェルで細胞を含むプレートに添加した。最大溶解ウェルについて、５μＬの溶解溶液を添加した。全てのウェルの最終容量を、ＡＤＣＣ培地で５０μＬに合わせた。プレートを３７℃にて２時間インキュベートし、その後、５０μＬ／ウェルのＣＴＧ溶液を細胞に添加した。プレートを、２００の速度で２分間、マイクロプレートシェーカー上で振盪し、次いで、室温で１０分間インキュベートした。発光シグナルはＥｎｖｉｓｉｏｎを用いて赤であった。データ分析のために、％細胞傷害性およびＩＣ$_{50}$をＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　５．０を用いて以下のように計算した。

【化２】

$$\%\ \text{細胞傷害性} = \frac{\text{試験値} - \text{Ave}(\text{細胞} + \text{補体})}{\text{Ave}(\text{最大溶解}) - \text{Ave}(\text{細胞のみ})} \times 100\%$$

【０３２１】

抗体のＣＤＣ作用をＤａｕｄｉ細胞で試験し、ＰＢＭＣによるＤａｕｄｉの細胞溶解を、CellTiter－Gloアッセイにより実行し、補体の終濃度は１０％であった。リツキシマブは、３９９ｎｇ／ｍＬのＩＣ５０でＤａｕｄｉ細胞においてＣＤＣ作用を誘導した。図２２Ｄに示す通り、Ｐ１Ｃ４　Ｆｃ変異体抗体は、Ｄａｕｄｉ細胞においてＣＤＣ作用を有さなかった。

【０３２２】
実施例２４．Ｐ１Ｃ４抗体による変性ＣＢ１タンパク質の認識
試験を、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４およびそのヒト化変異体抗体が、ウェスタンブロット分析により変性したＣＢ１タンパク質（Ｈｉｓタグを付した、Ｎ／Ｃ末端切断型ＣＢ１）上のエピトープ(複数可)を認識するかどうかを調べるために、行った。精製したヒトＣＢ１タンパク質（レーンあたり７５０ｎｇ）を、ベーターメルカプトエタノール（二重らせん）を含むＳＤＳ還元バッファーと混合した。変性したＣＢ１組換えタンパク質を、１２％還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上にローディングし、タンパク質を１２０Ｖで１時間分離させ、その後、ＰＶＤＦ膜（メタノールに予め浸した）に３００ｍＡで７０分間、電気的に転写した。膜を、２２℃にて、５％ＮＦＤＭ／ＰＢＳ－Ｔで１時間ブロッキングし、次いで、５％ＮＦＤＭ／ＰＢＳ－Ｔ中で、４℃にて一晩、試験抗体（２μｇ／ｍＬ）で免疫ブロッティングした。市販のマウス抗Ｈｉｓ抗体およびマウス抗ＣＢ１抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を陽性対照として用いて、本試験で使用する組換えＣＢ１タンパク質からのぞかれたＣ末端領域を認識するウサギ抗ＣＢ１抗体（Ｃａｙｍａｎ）を陰性対照として用いた。
【０３２３】
一晩インキュベーション後、膜を、２２℃にて、０．５％Ｔｗｅｅｎ－２０ＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｔ）で３回洗浄した。５％ＮＦＤＭ／ＰＢＳ－Ｔ中、二次抗体ＡＰ結合抗ヒトＩｇＧ（１：５０００）または抗マウスＩｇＧまたは抗ウサギＩｇＧをそれぞれの膜に添加し、２２℃にて１時間インキュベートした。膜を、各５分間、ＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。最後の洗浄後、シグナルを、ＮＢＴ／ＢＣＩＰ基質溶液と共に２２℃にてインキュベートすることにより発色させ、流水下で膜を洗浄することによって反応を停止させた。
【０３２４】
ウェスタンブロットの結果は、陽性対照抗体が、６３ｋＤａの正確な見かけの分子量を有する変性したＣＢ１タンパク質を検出することができたことを示した（図２３Ｂ、レーン９および１０）。陰性対照Ｃ末端特異的抗体（図２３Ｂ、レーン１１）、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４（図２３Ａ、Ｌレーン２）またはヒト化変異体抗体（図２３Ａ、レーン３から６）によってはバンドは検出されなかった。試験に用いた抗ヒトＦｃ二次抗体は、精製したヒトＩｇＧを検出することができた（図２３Ａ、レーン１）。これらの結果は、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４およびヒト化変異体抗体が、変性し、線形化したＣＢ１タンパク質を認識できなかったことを示す。フローサイトメトリー試験を加えて、これらの結果は、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４およびヒト化変異体抗体がエピトープの立体構造を認識するが、線形エピトープを認識しないことを確認する。
【０３２５】
実施例２５．キメラおよびヒト化Ｐ１Ｃ４　Ｆａｂ　ｃＡＭＰおよびＦＡＣＳ結合
ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　Ｆａｂ結合親和性を決定するため、完全な結合曲線を、フローサイトメトリーによってテトラサイクリンで誘導されるＣＢ１発現構築物を安定にトランスフェクトしたＴＲｅｘ－ＣＨＯ細胞を用いて、ある範囲の濃度で試験することによりＣＢ１受容体に対して作成した。３μＭから０．１μＭの３倍連続希釈液を調製した。ＦＩＴＣ結合抗ヒト抗体を用いて、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　Ｆａｂを検出した。ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　Ｆａｂは、ＴＲｅｘ－ＣＨＯ　ＣＢ１細胞に用量依存的に結合した（図２４Ａおよび表１７）。
【０３２６】
ｃＡＭＰ機能アッセイを行い、Ｐ１Ｃ４　Ｆａｂのアンタゴニスト作用を測定した。ｃＡＭＰ機能アッセイ(Cisbio)を白色３８４ウェル低容量プレート（Greiner）で行った。８０００細胞／ウェルのＣＢ１を安定に発現するＴＲｅｘ　ＣＨＯ細胞を該プレートに播種し、次いで種々の濃度のＰ１Ｃ４　Ｆａｂと共に室温にて１０分間インキュベートした。５μＭのフォルスコリン（Sigma Aldrich）および９ｎＭのカンナビノイドＣＰ５５９４０（Sigma Aldrich）を細胞刺激混合物に添加し、室温にて３０分間インキュベートしてＣＢ１を活性化させた。３０分間インキュベーション後、５μＬのｃＡＭＰ－ｄ２（Ｃ

ｉｓｂｉｏが提供する複合体および溶解バッファーで１：３９希釈）および５μＬの抗ｃＡＭＰクリプテート（Ｃｉｓｂｉｏが提供する複合体および溶解バッファーで１：９希釈）を細胞刺激物に添加し、１時間インキュベートした。ＦＲＥＴシグナルを、６２０ｎＭでの抗ｃＡＭＰクリプテート励起および６６５ｎＭでの放出にて、Ｅｎｖｉｓｉｏｎマルチラベルプレートリーダー（Perkin Elmer）を用いて検出した。データ分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いて行った。結果を、図２４Ｂおよび表１７に示す。示されるＩＣ$_{50}$および解離定数（Ｋｄ）の平均±ＳＤは、少なくとも２つの異なる試験から測定された。

【０３２７】

【表１７】

表１６．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４　ＦａｂのＩＣ$_{50}$および解離定数

| Ｆａｂ | 細胞株 | フローサイトメトリーによるＫｄ | ＩＣ$_{50}$　ｃＡＭＰアッセイ |
|---|---|---|---|
| キメラＰ１Ｃ４ | ヒトＣＢ１ | １３０±９ｎＭ | ４２７±１２１ｎＭ |
| Ｐ１Ｃ４－ｈ２ | ヒトＣＢ１ | １４±０．４ｎＭ | ５２±２２ｎＭ |
| Ｐ１Ｃ４－ｈ４ | ヒトＣＢ１ | １６．２±２．３ｎＭ | ４３±５ｎＭ |

【０３２８】

実施例２６．Ｐ１Ｃ４　ヒト化変異体の生物物理特性評価

本発明者らは、低および高ｐＨ下での安定性を測定し、最大溶解度をテストするための試験を行うことにより、ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ヒト化Ｆｃ変異体の安定性および溶解性を特徴付けた。本発明者らはまた、複数回の凍結／解凍サイクルおよびｐＨシフトの条件下後に、ヒトおよび非ヒト霊長動物血清中、加速条件下でこれらの分子の安定性を特徴づけた。

【０３２９】

Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体のｐＨ安定性を特徴付けるために、２００μＬの各抗体（～５ｍｇ／ｍＬ）およびＰＢＳ対照を調製し、Ｐｕｒ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ　Ｍａｘｉ　１２０００透析カセット（Sigma、カタログ番号ＰＵＲＸ１２０１５－１ＫＴ）に導入した。タンパク質を、それぞれ２ＬのｐＨ３の緩衝液（ＮａＯＨによりｐＨ３に調整した０．１Ｍ酢酸）またはｐＨ９の緩衝液（ＮａＯＨによりｐＨ９に調整した０．２Ｍグリシン）に対して４℃で一晩透析した。事前に計量した空のエッペンドルフチューブに、透析カセットからタンパク質サンプルを回収し、可視沈殿を調べた。サンプル容量は重量で測定した。透析の成功を確認するために、３μＬの透析したサンプルを取り出し、ｐＨ試験紙により確認した。５０μＬのサンプルをＳＥＣ分析のために取り出した。残りのサンプルを４０℃のインキュベーター中で４８時間維持した。その後、サンプルを再度、可視沈殿について調べた。６μＬの４８時間インキュベートしたサンプルをＴＳＫ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ　ＳＥＣカラムに入れ、タンパク質濃度をＳＥＣピーク面積によって計算した（４０℃でインキュベーション後）。タンパク質の回収率を決定するために、以下の式を用いた。透析前（容量ｘ濃度）／透析後（容量ｘ濃度）ｘ１００％。

【０３３０】

ｐＨ３およびｐＨ９の緩衝液に対して透析し、その後、４０℃にて４８時間インキュベーション後、４つのＩｇＧの沈殿は観察されなかった。４つすべてのＩｇＧについて、回収率は約７１－８３％であった。低い回収率は、透析カセットにサンプルが残っている可能性が高かった。ＳＥＣプロファイルによって計算された単量体ＩｇＧは、全ての４つの透析したＩｇＧについて９９％以上であった。４０℃にて４８時間インキュベーション後のｐＨ３緩衝液中のＩｇＧは、より広範なＳＥＣピークを示し、ｐＨ３緩衝液での長いインキュベーション後のより高いＩｇＧの異質性（heterogeneity）が示唆された。ｃＡＭＰおよびＣＢ１を発現する細胞の結合活性を、実施例１１および７に従って測定し、結果を表１８および１９にそれぞれまとめている。結果は、ｐＨ３下では、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－

ＩｇＧ４、Ｐ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ４のｃＡＭＰ活性が減少し、ｐＨ９下ではＰ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ２が減少したことを示した。

【０３３１】

【表１８】

表１８．Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体のｐＨ安定性：溶解性

| Sample | pH | 元の濃度 (mg/mL) | 元の容量 (uL) | 濃度 (mg/mL) | 回収容量 (uL) | 回収率 % | 単量体 SEC (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1C4-H2-IgG2 | 3 | 4.6 | 200 | 3.79 | 189 | 77.86 | >99 |
| P1C4-H2-IgG4 | 3 | 5.2 | 200 | 4.06 | 184 | 71.83 | >99 |
| P1C4-H4-IgG2 | 3 | 4.6 | 200 | 3.85 | 177 | 74.07 | >99 |
| P1C4-H4-IgG4 | 3 | 5.5 | 200 | 2.99 | 282 | 76.65 | >99 |
| P1C4-H2-IgG2 | 9 | 4.6 | 200 | 4.23 | 176 | 80.92 | >99 |
| P1C4-H2-IgG4 | 9 | 5.2 | 200 | 4.6 | 182 | 80.50 | >99 |
| P1C4-H4-IgG2 | 9 | 4.6 | 200 | 4.26 | 179 | 82.88 | >99 |
| P1C4-H4-IgG4 | 9 | 5.5 | 200 | 4.77 | 188 | 81.52 | >99 |


| Sample | pH | 元の濃度 (mg/mL) | 元の容量 (uL) | 濃度 (mg/mL) | 回収容量 (uL) | 回収率 % | 単量体 SEC (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1C4-H2-IgG2 | 3 | 4.6 | 200 | 3.79 | 189 | 77.86 | >99 |
| P1C4-H2-IgG4 | 3 | 5.2 | 200 | 4.06 | 184 | 71.83 | >99 |
| P1C4-H4-IgG2 | 3 | 4.6 | 200 | 3.85 | 177 | 74.07 | >99 |
| P1C4-H4-IgG4 | 3 | 5.5 | 200 | 2.99 | 282 | 76.65 | >99 |
| P1C4-H2-IgG2 | 9 | 4.6 | 200 | 4.23 | 176 | 80.92 | >99 |
| P1C4-H2-IgG4 | 9 | 5.2 | 200 | 4.6 | 182 | 80.50 | >99 |
| P1C4-H4-IgG2 | 9 | 4.6 | 200 | 4.26 | 179 | 82.88 | >99 |
| P1C4-H4-IgG4 | 9 | 5.5 | 200 | 4.77 | 188 | 81.52 | >99 |


【０３３２】

【表１９】

**表１９．Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体のｐＨ安定性：ｃＡＭＰ活性**

| $IC_{50}$(nM) | h2－IgG2 | h2－IgG4 | h4－IgG2 | h4－IgG4 |
|---|---|---|---|---|
| 平均±ＳＤ（Ｅｖｉｔｒａ） | 69±16 | 58±5 | 50±17 | 61±23 |
| 許容される範囲（５０－１５０％） | 34.5－103.5 | 29－87 | 25－75 | 30.5－91.5 |
| ｐＨ３ | 83 | 104 | 115 | 139 |
| ｐＨ９ | 87 | 85 | 97 | 64 |

【０３３３】

４００μＬのＩｇＧ（～５ｍｇ／ｍＬ）を、１４０００ｘｇで４℃にて、遠心濾過（Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ－０．５ｍＬ ３０Ｋ）して、～１００μＬまで濃縮することにより、Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の溶解性を特徴付けた。２００μＬのさらなるＩｇＧを遠心フィルターに添加し、１４０００ｘｇで４℃にて～１００μＬまで濃縮した。その後、さらに２００μＬのＩｇＧを遠心フィルターに添加し、１４０００ｘｇで４℃にて～１００μＬまで濃縮した（全８００μＬから１００μＬ）。濃縮したタンパク質を、ピペッティングを繰り返して可視沈殿を調べた。その後、濃縮を１４０００ｘｇで４℃にて、容量が５０μＬになるまで継続した。遠心フィルターを逆にし、事前に計量した空のチューブにセットした。遠心フィルターを１０００ｘｇで、４℃にて５分間スピンダウンして、濃縮サンプルを集めた。チューブを計量してサンプル容量を得た。沈殿が見えた場合、チューブを１４０００ｘｇで４℃にて１０分間スピンダウンした。上清を新たな１．５ｍＬのエッペンドルフチューブに取り出し、室温にて２４時間インキュベートした。その後、沈殿物を、１４０００ｘｇで、４℃にて１０分間の遠心によりスピンダウンし、上清を新しい１．５ｍＬのエッペンドルフチューブに移した。ＳＥＣ特性化のために、６μＬの濃縮サ

ンプルの上清をＴＳＫ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ　ＳＥＣカラムに入れ、タンパク質濃度をＳＥＣピーク面積により計算した。タンパク質回収率を以下のように計算した。濃縮前（容量ｘ濃度）／濃縮後（容量ｘ濃度）ｘ１００％。

【０３３４】

４つのＦｃ変異体を濃縮して、タンパク質濃度を８５ｍｇ／ｍＬより高くした。タンパク質回収率は９９％以上であった。インキュベーション前および室温にて２４時間インキュベーション後に、９３．９ｍｇ／ｍＬにてＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４のわずかな可視沈殿が観察された。他の３つのＩｇＧでは、８５ｍｇ／ｍＬより高い濃度で、室温にて２４時間インキュベーション後に、可視沈殿は観察されなかった。ＳＥＣプロファイルにより計算された単量体ＩｇＧは、～９９％での開始レベルと比較して、４つ全ての濃縮ＩｇＧについて９６％以上であった。データを表２０にまとめる。

【０３３５】

【表２０】

表２０．Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の溶解性

| サンプル | 元の濃度 (mg/mL) | 元の容量 (uL) | 濃度 (mg/mL) | 容量 (uL) | 回収率 % | 単量体　SEC (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| P1C4-H2-IgG2 | 4.6 | 800 | 85.6 | 43.6 | >99 | 96.84 |
| P1C4-H2-IgG4 | 5.2 | 800 | 93.9 | 44.5 | >99 | 97.39 |
| P1C4-H4-IgG2 | 4.6 | 800 | 87.84 | 42.2 | >99 | 97.05 |
| P1C4-H4-IgG4 | 5.5 | 800 | 116.51 | 38.7 | >99 | 96.38 |

【０３３６】

Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の加速安定性も評価した。１．５ｍＬのエッペンドルフチューブに、１００μＬのタンパク質サンプル（～５ｍｇ／ｍｌ）を入れた。該チューブをパラフィルムで密封した。２つのチューブをセットし、１つは４℃で維持し、もう１つは４０℃で３３日間維持した。ＳＥＣ分析のために、２０μｌのアリコートを取り出し、可視沈殿を調べた。ＳＥＣ分析について、６μＬのサンプルをＴＳＫ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ　ＳＥＣカラムに注入し、タンパク質濃度をＳＥＣピーク面積により測定した。タンパク質回収率を以下のように計算した。インキュベーション前（容量ｘ濃度）／インキュベーション後（容量ｘ濃度）ｘ１００％。

【０３３７】

３３日間、４℃および４０℃でインキュベーション後に、沈殿は観察されなかった。ＳＥＣプロファイルにより計算された単量体ＩｇＧは、４つ全てのＩｇＧについて４℃および４０℃の両方で９８％以上であった。ＳＥＣプロファイルにより計算された回収率は、４つ全てのＩｇＧについて４℃および４０℃の両方で９６％以上であった（表２１）。Ｐ１Ｃ４　Ｆｃ変異体の効力の変化は、その効力がわずかに低下したことを示す参照範囲外のＩＣ$_{50}$を示すＰ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ２以外は、４℃および４０℃で３３日後に観察されなかった（表２２）。

【０３３８】

【表２１】

表２１．加速安定性：溶解性

| サンプル | 温度 (C) | インキュベーションの日数 | 元の濃度 (mg/mL) | 濃度 (mg/mL) | 回収率 % | 単量体 SEC (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| P1C4-H2-IgG2 | 4 | 33 | 4.6 | 4.66 | >99 | >99 |
| P1C4-H2-IgG4 | 4 | 33 | 5.2 | 5.23 | >99 | >99 |
| P1C4-H4-IgG2 | 4 | 33 | 4.6 | 4.71 | >99 | >99 |
| P1C4-H4-IgG4 | 4 | 33 | 5.5 | 5.47 | >99 | >99 |
| P1C4-H2-IgG2 | 40 | 33 | 4.6 | 4.66 | >99 | >99 |
| P1C4-H2-IgG4 | 40 | 33 | 5.2 | 5.28 | >99 | 98 |
| P1C4-H4-IgG2 | 40 | 33 | 4.6 | 4.46 | 96.96 | >99 |
| P1C4-H4-IgG4 | 40 | 33 | 5.5 | 5.28 | 96.00 | >99 |

【０３３９】

【表２２】

表２２．加速安定性：効力

| $IC_{50}$(nM) | h2－IgG2 | h2－IgG4 | h4－IgG2 | h4－IgG4 |
|---|---|---|---|---|
| 平均±ＳＤ（Ｅｖｉｔｒａ） | 69±16 | 58±5 | 50±17 | 61±23 |
| 許容される範囲（５０－１５０%） | 34.5－103.5 | 29－87 | 25－75 | 30.5－91.5 |
| ４℃で３３日間 | 75 | 55 | 69 | 62 |
| ４０℃で３３日間 | 65 | 68 | 88 | 71 |

【０３４０】

ＰＩＣ４ヒト化変異体の血清安定性も特徴付けた。ヒト血清をSigmaから入手した。非ヒト霊長動物血清をＣｒｏｗｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社から集めた。エッペンドルフチューブ中で、９５０μＬの血清を５０μＬの終濃度２５０μｇ／ｍｌ（～１．６７μＭ）のＩｇＧと混合し、３７℃でインキュベートした。２００μＬのサンプルを、０、２４、４８および７２時間の時点で、ＣＢ１を発現する細胞を用いるフローサイトメトリー結合アッセイのために取り出した。試験したＩｇＧの開始濃度は５００ｎＭであって、サンプルを、フローサイトメトリーアッセイ用に連続的に３倍希釈して、結合$K_D$を決定した。表２３および２４に示す結果は、ヒトまたはＮＨＰ血清と共に３７℃にて、２４時間インキュベーション後に親和性が変化しなかったことを示した。$K_D$の有意な変化は、ヒトおよびＮＨＰ血清と共に４８時間インキュベーション後にＣＢ１を発現する細胞の結合親和性の低下を示すＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２を除いて、サンプルについて観察されなかった。加えて、Ｐ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ２はまた、４８時間後に、ＣＢ１を発現する細胞の結合親和性の低下を示した。

【０３４１】

【表２３】

表２３．２４時間での、Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体のヒト血清安定性

| ヒト血清におけるＫ$_d$（ｎＭ） | h2－IgG2 | h2－IgG4 | h4－IgG2 | h4－IgG4 |
|---|---|---|---|---|
| 平均±ＳＤ（Ｅｖｉｔｒａ） | 69±16 | 58±5 | 50±17 | 61±23 |
| 許容される範囲（５０－１５０％） | 14.5－43.5 | 17－51 | 15.5－46.5 | 15－45 |
| ０時間 | 21 | 16 | 23 | 16 |
| ２４時間 | 21 | 11 | 17 | 12 |
| ４８時間 | 56 | 19 | 31 | 12 |
| ７２時間 | 38 | 20 | 11 | 15 |

【０３４２】

【表２４】

表２４．Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体のＮＨＰ血清安定性

| ＮＨＰ血清におけるＫｄ（ｎＭ） | h2－IgG2 | h2－IgG4 | h4－IgG2 | h4－IgG4 |
|---|---|---|---|---|
| 平均±ＳＤ（Ｅｖｉｔｒａ） | 69±16 | 58±5 | 50±17 | 61±23 |
| 許容される範囲（５０－１５０％） | 14.5－43.5 | 17－51 | 15.5－46.5 | 15－45 |
| ０時間 | 21 | 19 | 20 | 20 |
| ２４時間 | 15 | 12 | 16 | 13 |
| ４８時間 | 57 | 37 | 48 | 28 |
| ７２時間 | 41 | 29 | 33 | 26 |

【０３４３】

Ｐ１Ｃ４ヒト化変異体の凍結／解凍安定性を以下のように特徴付けた。各ヒト化Ｐ１Ｃ４　Ｆｃ変異体の凍結ストックからの１００μＬアリコートを、２２℃の水浴中で解答後、液体窒素で急速凍結した。凍結サンプルを、少なくとも２０分間－８０℃で維持した後、それを再び２２℃の水浴中で解凍した。サンプルに、そのような凍結／解凍サイクルを１０回繰り返した。沈殿を調べるために目視検査した。２０μＬのアリコートを、１、５および１０回目の凍結／解凍サイクルにて、ＳＥＣ分析のためにサンプルから取り出した。ＳＥＣ特性化のために、６μＬのインキュベートしたサンプルをＴＳＫ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ　ＳＥＣカラムに注入した。タンパク質濃度を、ＳＥＣピーク面積により測定した。タンパク質回収率を以下の式を用いて計算した。Ｆ／Ｔ前（濃度）／Ｆ／Ｔ後（濃度）ｘ１００％。

【０３４４】

結果は、１０回の凍結／解凍サイクル後、単量体ＩｇＧは、試験した４つ全てのＩｇＧ変異体について９７％以上であったことを示した。タンパク質回収率は、全てのＩｇＧで９６％以上であった。Ｐ１Ｃ４－Ｈ２－ＩＧ４は、１回目の凍結／解凍サイクル後にわずかな濁りを示したが、有意な沈殿またはタンパク質濃度の減少は観察されなかった。結果

を表２５－２８にまとめる。５回の凍結／解凍サイクル後に回収したタンパク質サンプルもまた、ｃＡＭＰアンタゴニストアッセイを用いて機能について試験し、計算されたＩＣ$_{50}$の結果は、正常範囲内の効力の有意な変化を示さなかった（表２９）。

【０３４５】

【表２５】

表２５．Ｐ１Ｃ４－Ｈ２－ＩｇＧ２の凍結／解凍安定性

| サンプル | F/Tサイクル | 元の濃度 (mg/mL) | 濃度 (mg/mL) | 回収率 % | 単量体 SEC (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| P1C4-H2-IgG2 | 0 | 4.6 | 4.60 | >99 | >99 |
| P1C4-H2-IgG2 | 1 | 4.6 | 4.66 | >99 | >99 |
| P1C4-H2-IgG2 | 5 | 4.6 | 4.57 | >99 | >99 |
| P1C4-H2-IgG2 | 10 | 4.6 | 4.58 | >99 | >99 |

【０３４６】

【表２６】

表２６．Ｐ１Ｃ４－Ｈ２－ＩｇＧ４の凍結／解凍安定性

| サンプル | F/Tサイクル | 元の濃度 (mg/mL) | 濃度 (mg/mL) | 回収率 % | 単量体 SEC (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| P1C4-H2-IgG4 | 0 | 5.2 | 5.20 | >99 | >99 |
| P1C4-H2-IgG4 | 1 | 5.2 | 5.21 | >99 | >99 |
| P1C4-H2-IgG4 | 5 | 5.2 | 5.18 | >99 | 98.49 |
| P1C4-H2-IgG4 | 10 | 5.2 | 5.01 | 96.41 | 97.88 |

【０３４７】

【表２７】

表２７．Ｐ１Ｃ４－Ｈ４－ＩｇＧ２の凍結／解凍安定性

| サンプル | F/Tサイクル | 元の濃度 (mg/mL) | 濃度 (mg/mL) | 回収率 % | 単量体 SEC (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| P1C4-H4-IgG2 | 0 | 4.6 | 4.60 | >99 | >99 |
| P1C4-H4-IgG2 | 1 | 4.6 | 4.60 | >99 | >99 |
| P1C4-H4-IgG2 | 5 | 4.6 | 4.58 | >99 | >99 |
| P1C4-H4-IgG2 | 10 | 4.6 | 4.52 | 98.35 | >99 |

【０３４８】

【表２８】

表２８．Ｐ１Ｃ４－Ｈ４－ＩｇＧ４の凍結／解凍安定性

| サンプル | F/Tサイクル | 元の濃度 (mg/mL) | 濃度 (mg/mL) | 回収率 % | 単量体 SEC (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| P1C4-H4-IgG4 | 0 | 5.5 | 5.50 | >99 | >99 |
| P1C4-H4-IgG4 | 1 | 5.5 | 5.46 | >99 | >99 |
| P1C4-H4-IgG4 | 5 | 5.5 | 5.53 | >99 | 98.60 |
| P1C4-H4-IgG4 | 10 | 5.5 | 5.37 | 97.64 | 98.05 |

【０３４９】

【表２９】

表２９．ヒト化変異体の凍結／解凍安定性：５サイクル後のｃＡＭＰ活性

| ＩＣ５０（ｎＭ） | h2－IgG2 | h2－IgG4 | h4－IgG2 | h4－IgG4 |
|---|---|---|---|---|
| 平均±ＳＤ（Ｅｖｉｔｒａ） | 69±16 | 58±5 | 50±17 | 61±23 |
| 許容される範囲（５０－１５０％） | 34.5－103.5 | 29－87 | 25－75 | 30.5－91.5 |
| ５サイクルのＦ／Ｔ | 38 | 28 | 43 | 32 |

【０３５０】

ｐＨシフト下で４つのＰ１Ｃ４　Ｆｃ変異体の安定性を試験するために、０．２ｍＬの

ＭａｂＳｅｌｅｃｔ樹脂を１０ｍＬのカラムに充填し、１０ｍＬのＤＰＢＳ　ｐＨ７．４で平衡化した。１５０μＬのＩｇＧサンプル（～５ｍｇ／ｍＬ）をカラムに入れた。カラムを１．６ｍＬのＤＰＢＳで洗浄した。その後、ＩｇＧを、１．６ｍＬのクエン酸ナトリウム（ｐＨ～３．５）で溶出した。タンパク質の濃度を測定した。次いで、タンパク質を、機能アッセイのために～３ｍｇ／ｍＬまで濃縮した。可視沈殿は観察されなかった。これらのサンプルを、１４０００ｘｇで４℃にて１０分間スピンダウンした。上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、タンパク質濃度を測定した。このサンプルを、ＳＥＣにより凝集もまた調べ、ｃＡＭＰアンタゴニストアッセイにより機能も試験した。ＳＥＣプロファイルは、単量体ＩｇＧの割合が、ｐＨを３．５にした後に９５％以上であったことを示した。ｃＡＭＰアンタゴニスト結果を表３０に示し、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４、Ｐ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ２およびＰ１Ｃ４－ｈ４－ＩｇＧ４がｐＨ３．５で安定であって、測定されたＩＣ$_{50}$が許容される範囲内であることが示された。Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ２は、ｐＨ３．５で異なる挙動を示し、許容される範囲と比較して、低いＩＣ$_{50}$値であった。この結果は、ｐＨ安定性試験の結果と同様であった。

【０３５１】

【表３０】

表３０．ｐＨシフト下でのＰ１Ｃ４ヒト化変異体の安定性

| IC50(nM) | P1C4—h2—IgG2 | P1C4—h2—IgG4 | P1C4—h4—IgG2 | P1C4—h4—IgG4 |
|---|---|---|---|---|
| 平均±ＳＤ（Ｅｖｉｔｒａ） | 69±16 | 58±5 | 50±17 | 61±23 |
| 許容される範囲 | 34.5—103.5 | 29—87 | 25—75 | 30.5—91.5 |
| ｐＨ３．５ | 34 | 59 | 55 | 43.4 |

【０３５２】

実施例２７．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４のＣＤＲ突然変異誘発

各ＣＤＲ上の各アミノ酸位置の役割を調べるために、部位特異的飽和突然変異誘発を、キメラＰ１Ｃ４Ｆａｂの各ＣＤＲ位置に行った。ＮＮＳまたは特定の子ドンを含む変異原性プライマーを合成し、Ｔｒｉｓ－ＥＤＴＡ緩衝液中に溶解し、１０μＭワーキングストックまで希釈した。２５μＬのＰＣＲ反応液を、正確性と増幅性が高い（high fidelity）ＤＮＡポリメラーゼを用いて９６ウェルプレートにセットした。得られたＰＣＲ産物を、３７℃にて５時間、各ウェル中で０．８μＬのＤｐｎＩ（２０Ｕ／μＬ）を用いて処理した。ＤｐｎＩ処理したＰＣＲ産物（２μＬ）を、３０μｌの大腸菌Ｄｈ５αコンピテント細胞にトランスフェクトした。ＤＮＡを、ミニプレップして形質転換体から単離し、配列決定して、所望の変異を同定した。所望のクローンからのプラスミドＤＮＡを用いて、大腸菌ＢＬ２１（ＣｏｄｏｎＰｌｕｓ）コンピテント細胞を形質転換した。単一コロニーを、Ｆａｂタンパク質発現のために使用した。

【０３５３】

Ｆａｂ発現のために、コロニーを、１００μｌのＳＢ培地を含む９６ウェルプレートに採取し、一晩培養した。次の日、各ウェルからの１０μＬを、深い９６ウェルプレート中に、５０μｇ／ｍＬのカナマイシンを含む５００μＬのＺＹＭ培地に接種した。該プレートを通気性のプレートシーラーで密封し、２５℃にて３６時間、シェーカー中、４５０ｒｐｍにて振盪した。

【０３５４】

ＥＬＩＳＡのためにサンプルを調製するため、深い９６ウェルプレートを、Ｂｅｃｋｍａｎテーブルトップで、２０分間３０００ｒｐｍにて（～２０５０ｒｃｆ）、４℃にて、遠心した。１００μＬの上清を、発現プレートから、２００μＬのＰＢＳを含む希釈プレート（ｐＨ７．４）に移し、十分に混合した。

【０３５５】

Ｆａｂ発現をＥＬＩＳＡにより測定した。９６ウェルハーフウェルＥＬＩＳＡプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ、３６９０）を、２μｇ／ｍＬの抗ヒス抗体（Sigma H1029　２ｍｇ／ｍｌ）を５０μｌ／ウェル用いて、４℃にて一晩、直接コーティングした。その後、プレートを１５０μＬのＰＢＳＴで６回洗浄した。次いで、各ウェルを１７５μＬ／ウェルの３％ミルク／ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で１時間、２２℃にてブロッキングした。その後、プレートをＰＢＳＴで６回洗浄し、次いで、ＰＢＳで３倍希釈した２５μＬ／ウェルのＦａｂ（ｐＨ７．４）を含む培養培地を、各ウェルに添加し、２２℃にて１時間インキュベートした。該プレートを再度、ＰＢＳＴで６回洗浄し、その後、５０μｌ／ウェルのＨＲＰ標識した抗ヒトＦａｂ抗体（0293 Sigma）を、３％ミルクで１：１００００希釈して添加し、２２℃にて１時間インキュベートした。ＥＬＩＳＡを行うために、プレートをＰＢＳＴで６回洗浄し、５０μＬ／ウェルのＴＭＢ基質を添加した。反応を５０μＬ／ウェルの１Ｎ　ＨＣｌを添加することにより停止させ、$OD_{450}$をＢｉｏＴｅｋリーダーで読み取った。

【０３５６】

ｉＣＡＰＳ結合を測定するＥＬＩＳＡのために、９６ウェルハーフウェルＥＬＩＳＡプレートをを２μｇ／ｍＬ、２５μＬ／ウェルのストレプトアビジンＰＢＳ液（ｐＨ７．４）で、４℃にて一晩、コーティングした。その後、プレートを回転させながら１５０μＬのＰＢＳＴで６回洗浄した。その後、２５μＬ／ウェルの５ｕｇ／ｍＬ　ＣＢ１　ｉＣＡＰＳをプレートに添加し、１時間インキュベーションした。ＰＢＳＴで６回洗浄後、各ウェルを、１７５μＬ／ウェルの３％ミルク／ＰＢＳ（ｐＨ７．４）で１時間、２２℃にてブロッキングした。次いで、プレートをＰＢＳＴで６回洗浄し、その後、ＰＢＳで３倍希釈した２５μＬ／ウェルのＦａｂを含む培養培地（ｐＨ７．４）を各ウェルに添加し、２２℃にて１時間インキュベートした。プレートを、再度、ＰＢＳＴで６回洗浄し、その後、５０μｌ／ウェルの抗ヒトＦａｂ抗体（0293 Sigma）を、３％ミルクで１：１００００希釈して添加し、２２℃にて１時間インキュベートした。プレートを現像するために、該プレートをＰＢＳＴで６回洗浄し、５０μＬ／ウェルのＴＭＢ基質を添加した。反応を、５０μＬ／ウェルの１Ｎ　ＨＣｌを添加することにより停止させ、$OD_{450}$をＢｉｏＴｅｋリーダーで読み取った。

【０３５７】

各クローンを三連でアッセイした。Ｆａｂ発現により正規化したｉＣＡＰＳへの相対的結合を計算するために、ｉＣＡＰＳ結合のＥＬＩＳＡシグナルをＦａｂ発現ＥＬＩＳＡデータで割り、親クローンのデータを比較した。許容可能な変化は、親クローンと比較して、少なくとも５０％の特異的ｉＣＡＰＳ結合活性を保持するクローンとして定義された。これらの許容可能な変化を、表３１および表３２にまとめる。示された変異のＣＤＲ配列は表３４に見いだされ得る。

【０３５８】

【表３１】

表３１．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４重鎖ＣＤＲの許容される変異

| ＣＤＲ | 位置 | 許容される変異（複数可） |
|---|---|---|
| ＨＣＤＲ１ | Ｙ１ | Ｈ、Ｗ |
| | Ｙ２ | Ｆ、Ｉ、Ｋ、Ｎ |
| | Ｗ３ | Ａ、Ｆ |
| | Ｍ４ | Ａ、Ｅ、Ｆ、Ｌ、Ｎ、Ｑ、Ｔ、Ｖ |
| | Ｎ５ | Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｓ、Ｗ |
| ＨＣＤＲ２ | Ｑ１ | Ｄ、Ｅ |
| | Ｉ２ | Ａ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｋ，Ｌ，Ｎ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｙ３ | Ｆ |
| | Ｐ４ | Ａ，Ｆ，Ｈ，Ｋ |
| | Ｇ５ | Ａ，Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｄ６ | Ｉ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｇ７ | Ａ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｙ |
| | Ｅ８ | Ａ，Ｄ，Ｍ，Ｑ，Ｖ，Ｙ |
| | Ｔ９ | Ａ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｋ１０ | Ｄ，Ｅ，Ｈ，Ｉ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｙ１１ | Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｌ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｒ，Ｔ，Ｗ |
| ＨＣＤＲ３ | Ｓ１ | Ｎ，Ｔ，Ｙ |
| | Ｙ５ | Ａ，Ｃ，Ｆ，Ｈ，Ｎ，Ｓ |
| | Ｌ６ | Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｓ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｐ７ | Ａ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，ＫＬ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｙ８ | Ａ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｒ，Ｓ，Ｖ |

【０３５９】

【表３２】

表３２．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４軽鎖ＣＤＲの許容される変異

| ＣＤＲ | 位置 | 許容される変異（複数可） |
|---|---|---|
| ＬＣＤＲ１ | Ｓ１ | Ａ，Ｄ，Ｆ，Ｌ，Ｍ，Ｒ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｓ２ | Ａ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｋ，Ｍ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｖ，Ｗ |
| | Ｙ３ | Ｆ |
| | Ｌ４ | Ｆ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｗ，Ｙ |
| ＬＣＤＲ２ | Ｓ１ | Ａ，Ｈ，Ｎ，Ｒ |
| | Ｔ２ | Ａ，Ｄ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｌ，Ｍ，Ｓ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｓ３ | Ｄ，Ｆ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，ＬＮ，Ｑ，Ｙ |
| | Ｎ４ | Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｖ |
| | Ｌ５ | Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｍ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ａ６ | Ｄ，Ｆ，Ｇ，Ｉ，Ｋ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｖ，Ｗ |
| | Ｓ７ | Ａ，Ｄ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｋ，Ｌ，Ｒ，Ｔ，Ｖ，Ｗ |
| | Ｇ８ | Ａ，Ｆ，Ｉ，Ｎ，Ｐ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｙ |
| ＬＣＤＲ３ | Ｈ１ | Ａ，Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｎ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｑ２ | Ａ，Ｃ，Ｅ，Ｇ，Ｎ，Ｓ，Ｔ，Ｖ |
| | Ｙ３ | Ａ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｑ，Ｗ |
| | Ｈ４ | Ａ，Ｅ，Ｇ，Ｋ，Ｌ，Ｎ，Ｑ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ |
| | Ｒ５ | Ａ，Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｉ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｓ６ | Ａ，Ｃ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｉ，Ｍ，Ｐ，Ｒ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｐ７ | Ｋ，Ｗ，Ｙ |
| | Ｐ８ | Ｄ，Ｈ |
| | Ｔ９ | Ｄ，Ｆ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｖ，Ｙ |

【０３６０】

実施例２８．肝臓組織サンプルにおけるＣＢ１の、ＨＲＰをコンジュゲートしたＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４抗体による免疫染色

Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４抗体を、製造者の指示書に従ってＬｉｇｈｔｎｉｎｇ－Ｌｉｎｋ　ＨＲＰコンジュゲーションキット（Innova Bioscience、７０１－００１０）を用いて標識した。パラフィルム処理したヒト肝臓サンプルのスライドを、Clearene溶媒（Leica Biosystems）で５分間処理した後、最終的に５０％濃度までエタノールで濃縮した。その後、スライドを、ＰＢＳで簡易に洗浄後に、メタノール／過酸化水素中に１５分間浸した。その後、スライドを、抗原賦活化（Antigen retrieval）のために温めながらクエン酸生理食塩水（ベクター、Ｈ－３３００）で処理し、次いで、予め温めたＰＢＳ（３５０ｍｌ）およびトリプシン（２．４５ｍｌ）中、３７℃にて水浴中に２０分間、置いた。ＰＢＳで洗浄後、スライドをカゼイン（ベクター、ＳＰ－５０２０）で、室温にて１時間、ブロッキングした。ブロッキング後、１：１００希釈したＨＲＰをコンジュゲートしたＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４またはアイソタイプ対照抗体を添加し、４℃にて一晩インキュベートした。次いで、スライドをＰＢＳで洗浄し、３滴のベクターＡＢＣ　Ｔｅｒｔｉａｒｙ　（ベクター、ＰＫ－７１００）で、２２℃にて４５分間、処理した。ＰＢＳを用いてスライドを３回洗浄し、ＤＡＢミックス（ベクター、ＳＫ－４１００）を該スライドに添加して５－１０分後に、それらを再びＰＢＳで簡易に洗浄した。その後、スライドを、マイヤーズヘマトキシリン（TCS Biosciences、ＨＳ３１５）で１分間、カウンター染色し、次いで、水で処理し、増加濃度のエタノール（５０％から１００％）で処理し、Clea

rene溶媒で２回処理し、その後、それらをＰｅｒｔｅｘ（Leica Biosystems）にマウントした。

【０３６１】

結果は、早期ＮＡＳＨ（図２５、左パネル）、ＮＡＳＨ線維症（図２５、中パネル）および後期線維症（図２５、右パネル）サンプルにおける、マクロファージ、肝細胞および肝臓筋線維芽細胞における正のＣＢ１特異的染色を示した。アイソタイプ対照の無関係の抗体（図２６）または正常組織サンプル（図２７）では染色は観察されなかった。

【０３６２】

実施例２９．初代ヒト肝臓星細胞における線維症の遺伝子マーカーに対する抗ＣＢ１抗体の作用の測定

初代肝臓星細胞（ＨＳＣ）を、３名の健常ドナーから得た肝臓組織から単離した。ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳで２－３回継代後、細胞をプラスチック上で活性化させ、０．５％血清含有培地に一晩入れた。次いで、細胞を、種々の濃度のリモナバン（ＣＢ１アンタゴニスト）、Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４および非機能的対照抗体で６または２４時間処理した。α－ＳＭＡ、プロコラーゲンＡ１（Ｉ）、ＴＩＭＰ１およびＴＧＦβを含む線維化を促進させる遺伝子の発現阻害を、ＲＴ－ＰＣＲにより測定し、データをプロットした。

【０３６３】

結果は、ＨＳＣをＰ１Ｃ４－ｈ２抗体で処理したとき、プロコラーゲンＡ１（Ｉ）発現の顕著な減少が見られたが、非機能的対照抗体およびＰＢＳでの処理では見られなかったことを示す（図２８）。ＰＢＳ対照および非機能的対照抗体と比較して、ＴＧＦβ（図２９）およびＴＩＭＰ１（図３０）発現も顕著に減少した。加えて、α－ＳＭＡ発現の減少はまた、ＰＢＳまたは非機能的抗体で処理した細胞と比較して、Ｐ１Ｃ４－ＩｇＧ１またはＩｇＧ４で処理した細胞で顕著であった（図３１）。

【０３６４】

実施例３０：カニクイザルの脳脊髄液（ＣＳＦ）中の抗ＣＢ１抗体の定量

カニクイザル（２匹のオスおよび２匹のメス／群）を、表３３の処理スキームによりＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４で処理し、ＣＳＦを示した時点で収集した。Ｐ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４を、１ｕｇ／ｍＬの抗ＩＤ抗体でコーティングした９６ウェルプレートにＣＳＦを添加し、ＨＲＰをコンジュゲートした抗ＩｇＧ抗体（Ａｂｃａｍ）および発色試薬を用いて検出するＥＬＩＳＡにより定量した。

【０３６５】

表３３に示す通り、抗体は、検出可能な場合、非常に低いレベルで検出された。最高用量群では、注入された用量の０．１％未満がＣＳＦで検出され、ＣＮＳの抗体暴露が非常に低いことが示された。

【０３６６】

【表３３】

表３３．カニクイザルＣＳＦ中の抗ＣＢ１抗体の定量

| 群 | 時間点 | 濃度（ｎｇ／ｍｌ） | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.3mg/kg IV | 投与前 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | １回目（ｄ１）の投与後２時間 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | ２回目（ｄ８）の投与後２時間 | BLQ | BLQ | 35 | BLQ |
| | ３回目（ｄ１５）の投与後２時間 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| 3mg/kg SC | 投与前 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | １回目（ｄ１）、２回目（ｄ８）および３回目（ｄ１５）の投与後２時間 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| 3 mg/kg IV | 投与前 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | １回目（ｄ１）の投与後２時間 | BLQ | BLQ | 37 | BLQ |
| | ２回目（ｄ８）の投与後２時間 | 15 | BLQ | BLQ | BLQ |
| | ３回目（ｄ１５）の投与後２時間 | 21 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 40 mg/kg IV | 投与前 | BLQ | BLQ | NA | NA |
| | 投与の９時間後 | 86 | 136* | NA | NA |

ＢＬＱ＝定量下限以下

【０３６７】

実施例３１．カニクイザルにおける代謝および心血管要因に対する抗ＣＢ１抗体の効果の測定

ＲＩＯプログラムは、いくつかの要因を用いて、リモナバン処理の心血管代謝効果について実証した。例えば、Pi－Sunyeret al., 2006, J Am Coll Cardio, l47:362Aを参照のこと。このように、本明細書に記載の抗ＣＢ１抗体の効果もまた、同様の心血管代謝因子に対する効果について評価された。

【０３６８】

肥満のカニクイザルおよびアカゲザルを、３ｍｇ／ｋｇまたは０．３ｍｇ／ｋｇの抗ＣＢ１抗体であるＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４を毎週皮下投与処理した。陰性対照について、霊長動物セットには、（１）医薬担体のみ；または、（２）ＣＢ１に結合することが知られていない対照抗体の何れかを注射した。霊長動物の食物摂取、体重、インスリン感受性、トリグリセリドレベルおよび他の心血管危険因子の影響を観察した。

【０３６９】

３ｍｇ／ｋｇまたは０．３ｍｇ／ｋｇの抗ＣＢ１抗体であるＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４で処理した霊長動物は、低下したトリグリセリドレベルおよび他の心血管危険因子を示すことが示される。３ｍｇ／ｋｇまたは０．３ｍｇ／ｋｇの抗ＣＢ１抗体であるＰ１Ｃ４－ｈ２－ＩｇＧ４で処理した霊長動物はまた、改善したインスリン感受性を示すことが示された。対照抗体または担体のみを注射した霊長動物は、これらの因子の改善は観察されなかった。

【０３７０】

以上の例示的な実施例に記載されるように本発明における多数の改変および変形が当業者により行われることが予期される。従って、添付の特許請求の範囲により明らかであるような限定のみが、本発明の範囲内とされるべきである。本明細書中に引用される全ての文献は、あらゆる目的のためにその内容全体が引用により本明細書中に包含される。

【０３７１】
【表３４－１】
表３４．ＰＡ１３Ｒ３－Ｐ１Ｃ４ ＣＤＲ内の許容される変異の配列

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| 重鎖ＣＤＲ１配列 | ＹＹＷＭＮ | | ３５２ |
| | ＨＹＷＭＮ | Ｙ１→Ｈ | ４４３ |
| | ＩＹＷＭＮ | Ｙ１→Ｉ | ４４４ |
| | ＷＹＷＭＮ | Ｙ１→Ｗ | ４４５ |
| | ＹＦＷＭＮ | Ｙ２→Ｆ | ４４６ |
| | ＹＫＷＭＮ | Ｙ２→Ｋ | ４４７ |
| | ＹＮＷＭＮ | Ｙ２→Ｎ | ４４８ |
| | ＹＹＡＭＮ | Ｗ３→Ａ | ４４９ |
| | ＹＹＦＭＮ | Ｗ３→Ｆ | ４５０ |
| | ＹＹＷＡＮ | Ｍ４→Ａ | ４５１ |
| | ＹＹＷＥＮ | Ｍ４→Ｅ | ４５２ |
| | ＹＹＷＦＮ | Ｍ４→Ｆ | ４５３ |
| | ＹＹＷＬＮ | Ｍ４→Ｌ | ４５４ |
| | ＹＹＷＮＮ | Ｍ４→Ｎ | ４５５ |
| | ＹＹＷＱＮ | Ｍ４→Ｑ | ４５６ |
| | ＹＹＷＴＮ | Ｍ４→Ｔ | ４５７ |
| | ＹＹＷＶＮ | Ｍ４→Ｖ | ４５８ |
| | ＹＹＷＭＩ | Ｎ５→Ｉ | ４５９ |
| | ＹＹＷＭＫ | Ｎ５→Ｋ | ４６０ |
| | ＹＹＷＭＬ | Ｎ５→Ｌ | ４６１ |
| | ＹＹＷＭＳ | Ｎ５→Ｓ | ４６２ |
| | ＹＹＷＭＷ | Ｎ５→Ｗ | ４６３ |
| 重鎖ＣＤＲ２配列 | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | | ３５３ |
| | ＤＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｑ１→Ｄ | ４６４ |
| | ＥＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｑ１→Ｅ | ４６５ |
| | ＱＡＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ａ | ４６６ |
| | ＱＤＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ｄ | ４６７ |
| | ＱＥＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ｅ | ４６８ |
| | ＱＦＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ｆ | ４６９ |
| | ＱＧＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ｇ | ４７０ |
| | ＱＨＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ｈ | ４７１ |
| | ＱＫＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ｋ | ４７２ |
| | ＱＬＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ｌ | ４７３ |
| | ＱＮＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｉ２→Ｎ | ４７４ |

【表３４－２】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | QQYPGDGETKY | I2→Q | 475 |
| | QRYPGDGETKY | I2→R | 476 |
| | QSYPGDGETKY | I2→S | 477 |
| | QTYPGDGETKY | I2→T | 478 |
| | QWYPGDGETKY | I2→W | 479 |
| | QYYPGDGETKY | I2→Y | 480 |
| | QIFPGDGETKY | Y3→F | 481 |
| | QIYAGDGETKY | P4→A | 482 |
| | QIYFGDGETKY | P4→F | 483 |
| | QIYHGDGETKY | P4→H | 484 |
| | QIYKGDGETKY | P4→K | 485 |
| | QIYPADGETKY | G5→A | 486 |
| | QIYPCDGETKY | G5→C | 487 |
| | QIYPDDGETKY | G5→D | 488 |
| | QIYPEDGETKY | G5→E | 489 |
| | QIYPFDGETKY | G5→F | 490 |
| | QIYPHDGETKY | G5→H | 491 |
| | QIYPIDGETKY | G5→I | 492 |
| | QIYPKDGETKY | G5→K | 493 |
| | QIYPLDGETKY | G5→L | 494 |
| | QIYPMDGETKY | G5→M | 495 |
| | QIYPQDGETKY | G5→Q | 496 |
| | QIYPRDGETKY | G5→R | 497 |
| | QIYPSDGETKY | G5→S | 498 |
| | QIYPTDGETKY | G5→T | 499 |
| | QIYPVDGETKY | G5→V | 500 |
| | QIYPWDGETKY | G5→W | 501 |
| | QIYPYDGETKY | G5→Y | 502 |
| | QIYPGIGETKY | D6→I | 503 |
| | QIYPGLGETKY | D6→L | 504 |
| | QIYPGMGETKY | D6→M | 505 |
| | QIYPGNGETKY | D6→N | 506 |
| | QIYPGPGETKY | D6→P | 507 |
| | QIYPGQGETKY | D6→Q | 508 |
| | QIYPGVGETKY | D6→V | 509 |
| | QIYPGWGETKY | D6→W | 510 |
| | QIYPGYGETKY | D6→Y | 511 |
| | QIYPGDAETKY | G7→A | 512 |
| | QIYPGDDETKY | G7→D | 513 |

【表３４－４】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | ＱＩＹＰＧＤＥＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｅ | ５１４ |
| | ＱＩＹＰＧＤＦＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｆ | ５１５ |
| | ＱＩＹＰＧＤＨＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｈ | ５１６ |
| | ＱＩＹＰＧＤＩＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｉ | ５１７ |
| | ＱＩＹＰＧＤＫＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｋ | ５１８ |
| | ＱＩＹＰＧＤＬＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｌ | ５１９ |
| | ＱＩＹＰＧＤＭＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｍ | ５２０ |
| | ＱＩＹＰＧＤＮＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｎ | ５２１ |
| | ＱＩＹＰＧＤＰＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｐ | ５２２ |
| | ＱＩＹＰＧＤＱＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｑ | ５２３ |
| | ＱＩＹＰＧＤＲＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｒ | ５２４ |
| | ＱＩＹＰＧＤＳＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｓ | ５２５ |
| | ＱＩＹＰＧＤＴＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｔ | ５２６ |
| | ＱＩＹＰＧＤＶＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｖ | ５２７ |
| | ＱＩＹＰＧＤＹＥＴＫＹ | Ｇ７→Ｙ | ５２８ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＡＴＫＹ | Ｅ８→Ａ | ５２９ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＤＴＫＹ | Ｅ８→Ｄ | ５３０ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＭＴＫＹ | Ｅ８→Ｍ | ５３１ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＱＴＫＹ | Ｅ８→Ｑ | ５３２ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＶＴＫＹ | Ｅ８→Ｖ | ５３３ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＹＴＫＹ | Ｅ８→Ｙ | ５３４ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＡＫＹ | Ｔ９→Ａ | ５３５ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＤＫＹ | Ｔ９→Ｄ | ５３６ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＥＫＹ | Ｔ９→Ｅ | ５３７ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＦＫＹ | Ｔ９→Ｆ | ５３８ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＧＫＹ | Ｔ９→Ｇ | ５３９ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＨＫＹ | Ｔ９→Ｈ | ５４０ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＩＫＹ | Ｔ９→Ｉ | ５４１ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＫＫＹ | Ｔ９→Ｋ | ５４２ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＱＫＹ | Ｔ９→Ｑ | ５４３ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＲＫＹ | Ｔ９→Ｒ | ５４４ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＳＫＹ | Ｔ９→Ｓ | ５４５ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＹ | Ｔ９→Ｔ | ５４６ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＶＫＹ | Ｔ９→Ｗ | ５４７ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＹＫＹ | Ｔ９→Ｙ | ５４８ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＤＹ | Ｋ１０→Ｄ | ５４９ |

【表３４－４】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＥＹ | Ｋ１０→Ｅ | ５５０ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＨＹ | Ｋ１０→Ｈ | ５５１ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＩＹ | Ｋ１０→Ｉ | ５５２ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＬＹ | Ｋ１０→Ｌ | ５５３ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＭＹ | Ｋ１０→Ｍ | ５５４ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＮＹ | Ｋ１０→Ｎ | ５５５ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＰＹ | Ｋ１０→Ｐ | ５５６ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＱＹ | Ｋ１０→Ｑ | ５５７ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＲＹ | Ｋ１０→Ｒ | ５５８ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＳＹ | Ｋ１０→Ｓ | ５５９ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＴＹ | Ｋ１０→Ｔ | ５６０ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＶＹ | Ｋ１０→Ｖ | ５６１ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＷＹ | Ｋ１０→Ｗ | ５６２ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＹＹ | Ｋ１０→Ｙ | ５６３ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＣ | Ｙ１１→Ｃ | ５６４ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＤ | Ｙ１１→Ｄ | ５６５ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＥ | Ｙ１１→Ｅ | ５６６ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＦ | Ｙ１１→Ｆ | ５６７ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＧ | Ｙ１１→Ｇ | ５６８ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＨ | Ｙ１１→Ｈ | ５６９ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＩ | Ｙ１１→Ｉ | ５７０ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＬ | Ｙ１１→Ｌ | ５７１ |

【表３４－５】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＮ | Ｙ１１→Ｎ | ５７２ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＰ | Ｙ１１→Ｐ | ５７３ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＱ | Ｙ１１→Ｑ | ５７４ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＲ | Ｙ１１→Ｒ | ５７５ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＴ | Ｙ１１→Ｔ | ５７６ |
| | ＱＩＹＰＧＤＧＥＴＫＷ | Ｙ１１→Ｗ | ５７７ |
| 重鎖ＣＤＲ３配列 | ＳＨＧＮＹＬＰＹ | | ３５４ |
| | ＮＨＧＮＹＬＰＹ | Ｓ１→Ｎ | ５７８ |
| | ＴＨＧＮＹＬＰＹ | Ｓ１→Ｔ | ５７９ |
| | ＹＨＧＮＹＬＰＹ | Ｓ１→Ｙ | ５８０ |
| | ＳＨＧＮＡＬＰＹ | Ｙ５→Ａ | ５８１ |
| | ＳＨＧＮＣＬＰＹ | Ｙ５→Ｃ | ５８２ |
| | ＳＨＧＮＦＬＰＹ | Ｙ５→Ｆ | ５８３ |
| | ＳＨＧＮＨＬＰＹ | Ｙ５→Ｈ | ５８４ |
| | ＳＨＧＮＮＬＰＹ | Ｙ５→Ｎ | ５８５ |
| | ＳＨＧＮＳＬＰＹ | Ｙ５→Ｓ | ５８６ |
| | ＳＨＧＮＹＤＰＹ | Ｌ６→Ｄ | ５８７ |
| | ＳＨＧＮＹＥＰＹ | Ｌ６→Ｅ | ５８８ |
| | ＳＨＧＮＹＦＰＹ | Ｌ６→Ｆ | ５８９ |
| | ＳＨＧＮＹＧＰＹ | Ｌ６→Ｇ | ５９０ |
| | ＳＨＧＮＹＨＰＹ | Ｌ６→Ｈ | ５９１ |
| | ＳＨＧＮＹＩＰＹ | Ｌ６→Ｉ | ５９２ |
| | ＳＨＧＮＹＫＰＹ | Ｌ６→Ｋ | ５９３ |
| | ＳＨＧＮＹＭＰＹ | Ｌ６→Ｍ | ５９４ |
| | ＳＨＧＮＹＮＰＹ | Ｌ６→Ｎ | ５９５ |
| | ＳＨＧＮＹＱＰＹ | Ｌ６→Ｑ | ５９６ |
| | ＳＨＧＮＹＳＰＹ | Ｌ６→Ｓ | ５９７ |
| | ＳＨＧＮＹＷＰＹ | Ｌ６→Ｗ | ５９８ |
| | ＳＨＧＮＹＹＰＹ | Ｌ６→Ｙ | ５９９ |
| | ＳＨＧＮＹＬＡＹ | Ｐ７→Ａ | ６００ |
| | ＳＨＧＮＹＬＥＹ | Ｐ７→Ｅ | ６０１ |
| | ＳＨＧＮＹＬＦＹ | Ｐ７→Ｆ | ６０２ |
| | ＳＨＧＮＹＬＧＹ | Ｐ７→Ｇ | ６０３ |
| | ＳＨＧＮＹＬＨＹ | Ｐ７→Ｈ | ６０４ |

【表３４－６】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | ＳＨＧＮＹＬＫＹ | Ｐ７→Ｋ | ６０５ |
| | ＳＨＧＮＹＬＬＹ | Ｐ７→Ｌ | ６０６ |
| | ＳＨＧＮＹＬＱＹ | Ｐ７→Ｑ | ６０７ |
| | ＳＨＧＮＹＬＲＹ | Ｐ７→Ｒ | ６０８ |
| | ＳＨＧＮＹＬＳＹ | Ｐ７→Ｓ | ６０９ |
| | ＳＨＧＮＹＬＶＹ | Ｐ７→Ｖ | ６１０ |
| | ＳＨＧＮＹＬＷＹ | Ｐ７→Ｗ | ６１１ |
| | ＳＨＧＮＹＬＹＹ | Ｐ７→Ｙ | ６１２ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＡ | Ｙ８→Ａ | ６１３ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＤ | Ｙ８→Ｄ | ６１４ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＥ | Ｙ８→Ｅ | ６１５ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＦ | Ｙ８→Ｆ | ６１６ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＧ | Ｙ８→Ｇ | ６１７ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＨ | Ｙ８→Ｈ | ６１８ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＩ | Ｙ８→Ｉ | ６１９ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＫ | Ｙ８→Ｋ | ６２０ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＬ | Ｙ８→Ｌ | ６２１ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＭ | Ｙ８→Ｍ | ６２２ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＲ | Ｙ８→Ｒ | ６２３ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＳ | Ｙ８→Ｓ | ６２４ |
| | ＳＨＧＮＹＬＰＶ | Ｙ８→Ｖ | ６２５ |
| 軽鎖ＣＤＲ１配列 | ＳＳＹＬＨ | | ３５５ |
| | ＡＳＹＬＨ | Ｓ１→Ａ | ６２６ |
| | ＤＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｄ | ６２７ |
| | ＦＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｆ | ６２８ |
| | ＬＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｌ | ６２９ |
| | ＭＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｍ | ６３０ |
| | ＲＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｒ | ６３１ |
| | ＴＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｔ | ６３２ |
| | ＶＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｖ | ６３３ |
| | ＷＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｗ | ６３４ |
| | ＹＳＹＬＨ | Ｓ１→Ｙ | ６３５ |
| | ＳＡＹＬＨ | Ｓ２→Ａ | ６３６ |
| | ＳＤＹＬＨ | Ｓ２→Ｄ | ６３７ |
| | ＳＥＹＬＨ | Ｓ２→Ｅ | ６３８ |
| | ＳＦＹＬＨ | Ｓ２→Ｆ | ６３９ |
| | ＳＧＹＬＨ | Ｓ２→Ｇ | ６４０ |
| | ＳＨＹＬＨ | Ｓ２→Ｈ | ６４１ |

【表３４－７】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | ＳＫＹＬＨ | Ｓ２→Ｋ | ６４２ |
| | ＳＭＹＬＨ | Ｓ２→Ｍ | ６４３ |
| | ＳＮＹＬＨ | Ｓ２→Ｎ | ６４４ |
| | ＳＰＹＬＨ | Ｓ２→Ｐ | ６４５ |
| | ＳＱＹＬＨ | Ｓ２→Ｑ | ６４６ |
| | ＳＶＹＬＨ | Ｓ２→Ｖ | ６４７ |
| | ＳＷＹＬＨ | Ｓ２→Ｗ | ６４８ |
| | ＳＳＦＬＨ | Ｙ３→Ｆ | ６４９ |
| | ＳＳＹＦＨ | Ｌ４→Ｆ | ６５０ |
| | ＳＳＹＨＨ | Ｌ４→Ｈ | ６５１ |
| | ＳＳＹＩＨ | Ｌ４→Ｉ | ６５２ |
| | ＳＳＹＫＨ | Ｌ４→Ｋ | ６５３ |
| | ＳＳＹＮＨ | Ｌ４→Ｎ | ６５４ |
| | ＳＳＹＰＨ | Ｌ４→Ｐ | ６５５ |
| | ＳＳＹＱＨ | Ｌ４→Ｑ | ６５６ |
| | ＳＳＹＲＨ | Ｌ４→Ｒ | ６５７ |
| | ＳＳＹＳＨ | Ｌ４→Ｓ | ６５８ |
| | ＳＳＹＴＨ | Ｌ４→Ｔ | ６５９ |
| | ＳＳＹＷＨ | Ｌ４→Ｗ | ６６０ |
| | ＳＳＹＹＨ | Ｌ４→Ｙ | ６６１ |
| 軽鎖ＣＤＲ２配列 | ＳＴＳＮＬＡＳ | | ３５６ |
| | ＡＴＳＮＬＡＳ | Ｓ１→Ａ | ６６２ |
| | ＨＴＳＮＬＡＳ | Ｓ１→Ｈ | ６６３ |
| | ＮＴＳＮＬＡＳ | Ｓ１→Ｎ | ６６４ |
| | ＲＴＳＮＬＡＳ | Ｓ１→Ｒ | ６６５ |
| | ＳＡＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ａ | ６６６ |
| | ＳＤＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ｄ | ６６７ |
| | ＳＦＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ｆ | ６６８ |
| | ＳＧＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ｇ | ６６９ |
| | ＳＨＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ｈ | ６７０ |
| | ＳＬＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ｌ | ６７１ |
| | ＳＭＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ｍ | ６７２ |
| | ＳＳＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ｓ | ６７３ |
| | ＳＶＳＮＬＡＳ | Ｔ２→Ｖ | ６７４ |

【表３４－８】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | SWSNLAS | T2→W | ６７５ |
| | SYSNLAS | T2→Y | ６７６ |
| | STDNLAS | S3→D | ６７７ |
| | STFNLAS | S3→F | ６７８ |
| | STHNLAS | S3→H | ６７９ |
| | STINLAS | S3→I | ６８０ |
| | STKNLAS | S3→K | ６８１ |
| | STLNLAS | S3→L | ６８２ |
| | STNNLAS | S3→N | ６８３ |
| | STQNLAS | S3→Q | ６８４ |
| | STYNLAS | S3→Y | ６８５ |
| | STSDLAS | N4→D | ６８６ |
| | STSELAS | N4→E | ６８７ |
| | STSFLAS | N4→F | ６８８ |
| | STSGLAS | N4→G | ６８９ |
| | STSHLAS | N4→H | ６９０ |
| | STSILAS | N4→I | ６９１ |
| | STSKLAS | N4→K | ６９２ |
| | STSQLAS | N4→Q | ６９３ |
| | STSRLAS | N4→R | ６９４ |
| | STSSLAS | N4→S | ６９５ |
| | STSVLAS | N4→V | ６９６ |
| | STSNDAS | L5→D | ６９７ |
| | STSNEAS | L5→E | ６９８ |
| | STSNFAS | L5→F | ６９９ |
| | STSNGAS | L5→G | ７００ |
| | STSNHAS | L5→H | ７０１ |
| | STSNIAS | L5→I | ７０２ |
| | STSNKAS | L5→K | ７０３ |
| | STSNMAS | L5→M | ７０４ |
| | STSNNAS | L5→N | ７０５ |
| | STSNPAS | L5→P | ７０６ |
| | STSNQAS | L5→Q | ７０７ |
| | STSNVAS | L5→V | ７０８ |
| | STSNWAS | L5→W | ７０９ |
| | STSNYAS | L5→Y | ７１０ |
| | STSNLDS | A6→D | ７１１ |

【表３４－９】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | ＳＴＳＮＬＦＳ | Ａ６→Ｆ | ７１２ |
| | ＳＴＳＮＬＧＳ | Ａ６→Ｇ | ７１３ |
| | ＳＴＳＮＬＩＳ | Ａ６→Ｉ | ７１４ |
| | ＳＴＳＮＬＫＳ | Ａ６→Ｋ | ７１５ |
| | ＳＴＳＮＬＱＳ | Ａ６→Ｑ | ７１６ |
| | ＳＴＳＮＬＲＳ | Ａ６→Ｒ | ７１７ |
| | ＳＴＳＮＬＳＳ | Ａ６→Ｓ | ７１８ |
| | ＳＴＳＮＬＶＳ | Ａ６→Ｖ | ７１９ |
| | ＳＴＳＮＬＷＳ | Ａ６→Ｗ | ７２０ |
| | ＳＴＳＮＬＡＡ | Ｓ７→Ａ | ７２１ |
| | ＳＴＳＮＬＡＤ | Ｓ７→Ｄ | ７２２ |
| | ＳＴＳＮＬＡＦ | Ｓ７→Ｆ | ７２３ |
| | ＳＴＳＮＬＡＧ | Ｓ７→Ｇ | ７２４ |
| | ＳＴＳＮＬＡＨ | Ｓ７→Ｈ | ７２５ |
| | ＳＴＳＮＬＡＫ | Ｓ７→Ｋ | ７２６ |
| | ＳＴＳＮＬＡＬ | Ｓ７→Ｌ | ７２７ |
| | ＳＴＳＮＬＡＲ | Ｓ７→Ｒ | ７２８ |
| | ＳＴＳＮＬＡＴ | Ｓ７→Ｔ | ７２９ |
| | ＳＴＳＮＬＡＶ | Ｓ７→Ｖ | ７３０ |
| | ＳＴＳＮＬＡＷ | Ｓ７→Ｗ | ７３１ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＧ | | ７３２ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＡ | Ｇ８→Ａ | ７３３ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＦ | Ｇ８→Ｆ | ７３４ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＩ | Ｇ８→Ｉ | ７３５ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＮ | Ｇ８→Ｎ | ７３６ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＰ | Ｇ８→Ｐ | ７３７ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＲ | Ｇ８→Ｒ | ７３８ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＳ | Ｇ８→Ｓ | ７３９ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＴ | Ｇ８→Ｔ | ７４０ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＶ | Ｇ８→Ｖ | ７４１ |
| | ＳＴＳＮＬＡＳＹ | Ｇ８→Ｙ | ７４２ |
| 軽鎖ＣＤＲ３配列 | ＨＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | | ３５７ |
| | ＡＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ａ | ７４３ |
| | ＣＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｃ | ７４４ |
| | ＤＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｄ | ７４５ |
| | ＥＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｅ | ７４６ |
| | ＦＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｆ | ７４７ |
| | ＩＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｉ | ７４８ |
| | ＫＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｋ | ７４９ |

【表３４－１０】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | ＬＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｌ | ７５０ |
| | ＮＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｎ | ７５１ |
| | ＲＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｒ | ７５２ |
| | ＳＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｓ | ７５３ |
| | ＴＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｔ | ７５４ |
| | ＶＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｖ | ７５５ |
| | ＷＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｗ | ７５６ |
| | ＹＱＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｈ１→Ｙ | ７５７ |
| | ＨＡＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｑ２→Ａ | ７５８ |
| | ＨＣＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｑ２→Ｃ | ７５９ |
| | ＨＥＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｑ２→Ｅ | ７６０ |
| | ＨＧＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｑ２→Ｇ | ７６１ |
| | ＨＮＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｑ２→Ｎ | ７６２ |
| | ＨＳＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｑ２→Ｓ | ７６３ |
| | ＨＴＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｑ２→Ｔ | ７６４ |
| | ＨＶＹＨＲＳＰＰＴＦ | Ｑ２→Ｖ | ７６５ |
| | ＨＱＡＨＲＳＰＰＴＦ | Ｙ３→Ａ | ７６６ |
| | ＨＱＦＨＲＳＰＰＴＦ | Ｙ３→Ｆ | ７６７ |
| | ＨＱＧＨＲＳＰＰＴＦ | Ｙ３→Ｇ | ７６８ |
| | ＨＱＨＨＲＳＰＰＴＦ | Ｙ３→Ｈ | ７６９ |
| | ＨＱＱＨＲＳＰＰＴＦ | Ｙ３→Ｑ | ７７０ |
| | ＨＱＷＨＲＳＰＰＴＦ | Ｙ３→Ｗ | ７７１ |
| | ＨＱＹＡＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ａ | ７７２ |
| | ＨＱＹＥＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｅ | ７７３ |
| | ＨＱＹＧＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｇ | ７７４ |
| | ＨＱＹＫＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｋ | ７７５ |
| | ＨＱＹＬＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｌ | ７７６ |
| | ＨＱＹＮＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｎ | ７７７ |
| | ＨＱＹＱＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｑ | ７７８ |
| | ＨＱＹＳＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｓ | ７７９ |
| | ＨＱＹＴＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｔ | ７８０ |
| | ＨＱＹＶＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｖ | ７８１ |
| | ＨＱＹＷＲＳＰＰＴＦ | Ｈ４→Ｗ | ７８２ |
| | ＨＱＹＨＡＳＰＰＴＦ | Ｒ５→Ａ | ７８３ |
| | ＨＱＹＨＣＳＰＰＴＦ | Ｒ５→Ｃ | ７８４ |
| | ＨＱＹＨＤＳＰＰＴＦ | Ｒ５→Ｄ | ７８５ |
| | ＨＱＹＨＥＳＰＰＴＦ | Ｒ５→Ｅ | ７８６ |
| | ＨＱＹＨＦＳＰＰＴＦ | Ｒ５→Ｆ | ７８７ |

【表３４－１１】

表３４．つづき

| 配列起源の説明 | 配列 | 変異 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| | HQYHISPPTF | R5→I | 788 |
| | HQYHLSPPTF | R5→L | 789 |
| | HQYHMSPPTF | R5→M | 790 |
| | HQYHNSPPTF | R5→N | 791 |
| | HQYHQSPPTF | R5→Q | 792 |
| | HQYHVSPPTF | R5→V | 793 |
| | HQYHWSPPTF | R5→W | 794 |
| | HQYHYSPPTF | R5→Y | 795 |
| | HQYHRAPPTF | S6→A | 796 |
| | HQYHRCPPTF | S6→C | 797 |
| | HQYHREPPTF | S6→E | 798 |
| | HQYHRFPPTF | S6→F | 799 |
| | HQYHRGPPTF | S6→G | 800 |
| | HQYHRIPPTF | S6→I | 801 |
| | HQYHRMPPTF | S6→M | 802 |
| | HQYHRPPPTF | S6→P | 803 |
| | HQYHRRPPTF | S6→R | 804 |
| | HQYHRTPPTF | S6→T | 805 |
| | HQYHRVPPTF | S6→V | 806 |
| | HQYHRWPPTF | S6→W | 807 |
| | HQYHRYPPTF | S6→Y | 808 |
| | HQYHRSKPTF | P7→K | 809 |
| | HQYHRSWPTF | P7→W | 810 |
| | HQYHRSYPTF | P7→Y | 811 |
| | HQYHRSPDTF | P8→D | 812 |
| | HQYHRSPHTF | P8→H | 813 |
| | HQYHRSPPDF | T9→D | 814 |
| | HQYHRSPPFF | T9→F | 815 |
| | HQYHRSPPGF | T9→G | 816 |
| | HQYHRSPPIF | T9→I | 817 |
| | HQYHRSPPLF | T9→L | 818 |
| | HQYHRSPPMF | T9→M | 819 |
| | HQYHRSPPNF | T9→N | 820 |
| | HQYHRSPPQF | T9→Q | 821 |
| | HQYHRSPPRF | T9→R | 822 |
| | HQYHRSPPSF | T9→S | 823 |
| | HQYHRSPPVF | T9→V | 824 |
| | HQYHRSPPYF | T9→Y | 825 |

【図１Ａ】

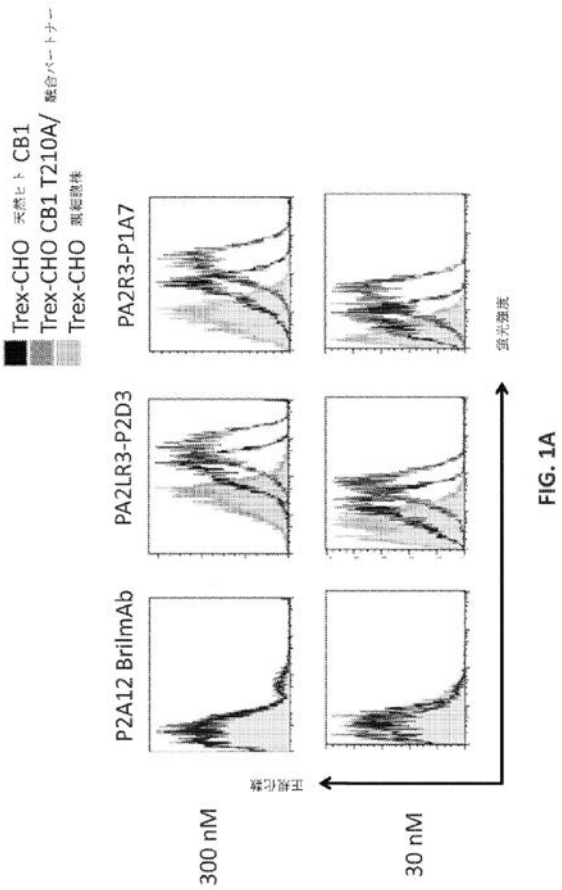



FIG. 1A

【図１Ｂ】

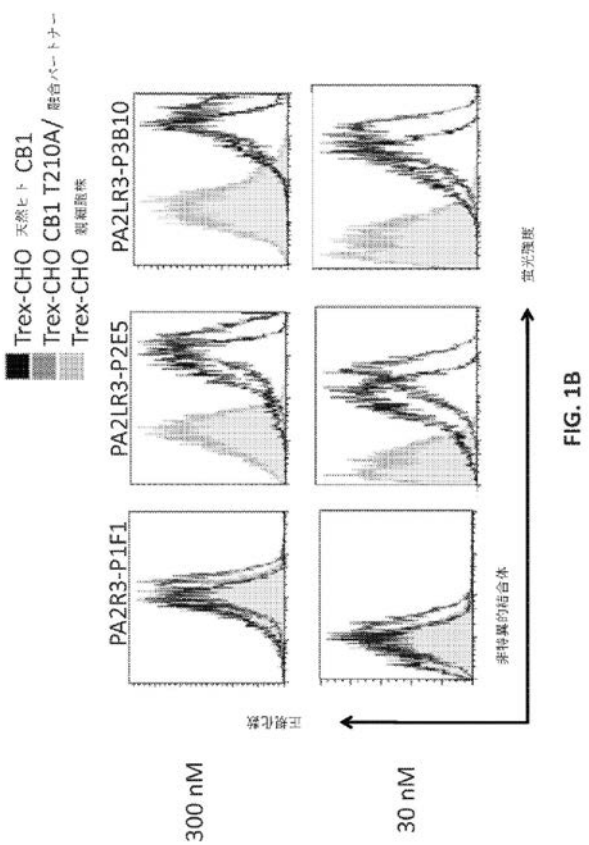



FIG. 1B

【図１Ｃ】

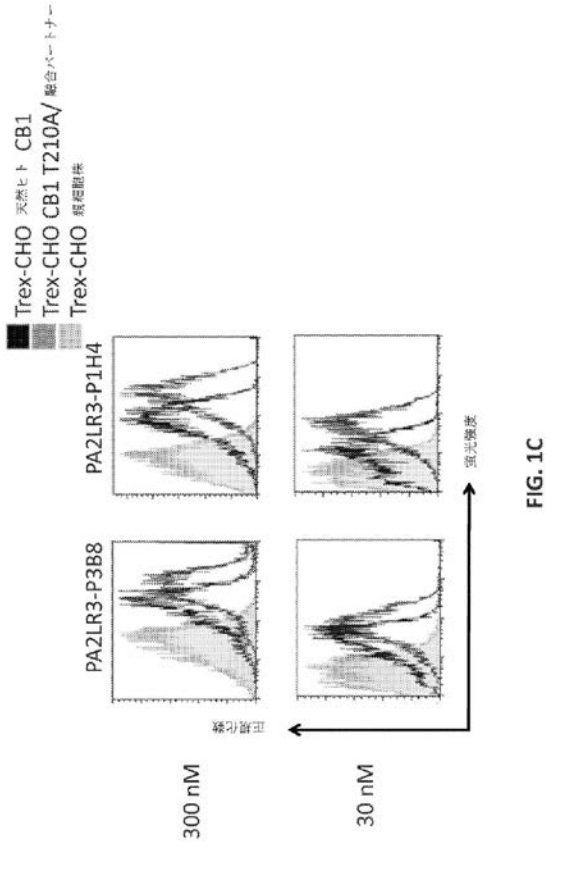



FIG. 1C

【図１Ｄ】

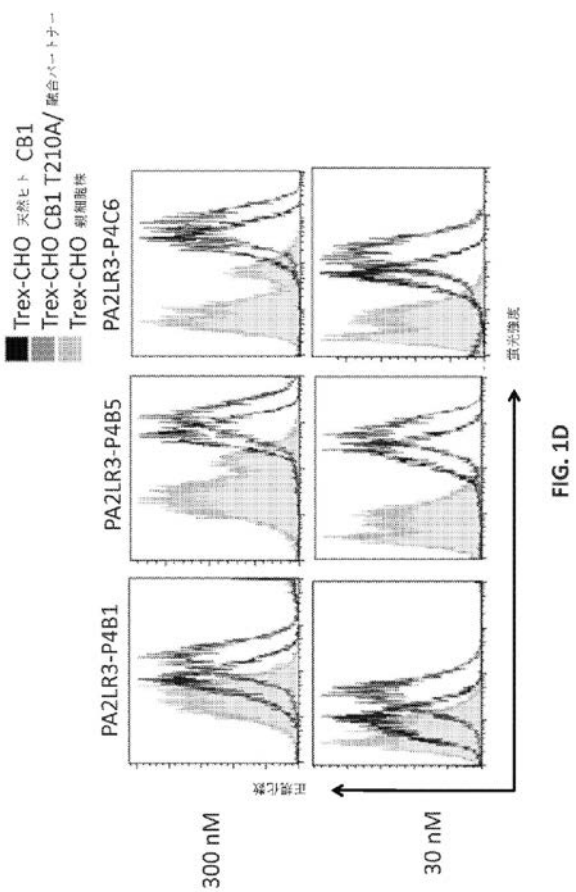



FIG. 1D

【図１Ｅ】

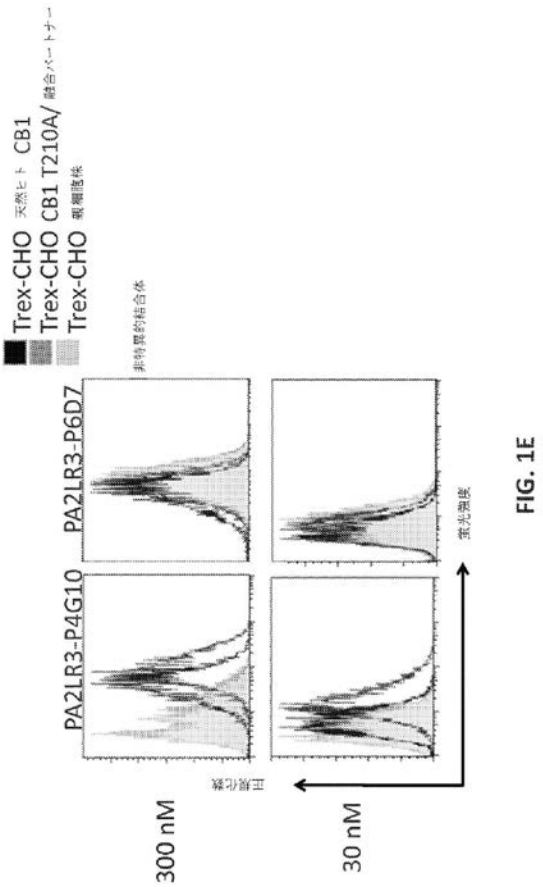



FIG. 1E

【図１Ｆ】

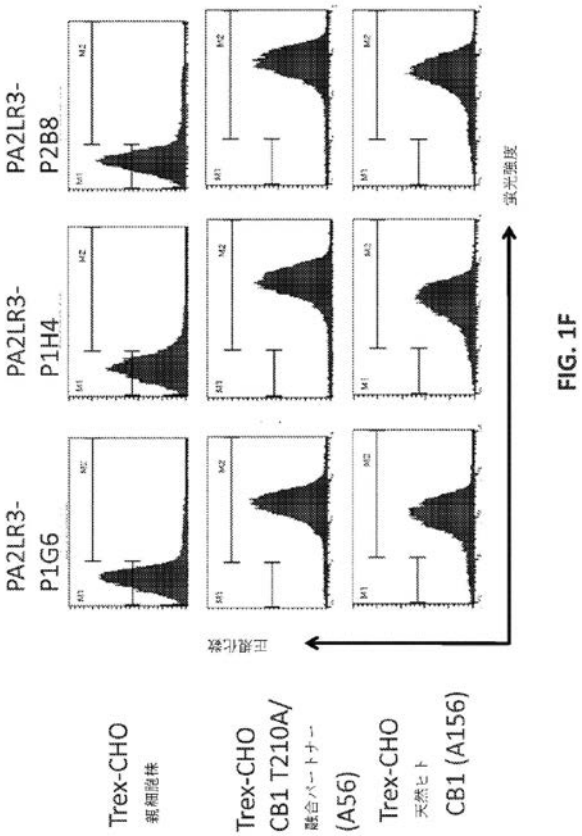
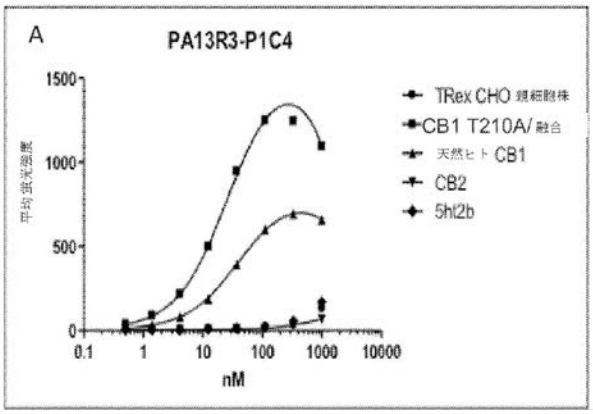



FIG. 1F

【図２Ａ】




【図２Ｂ】

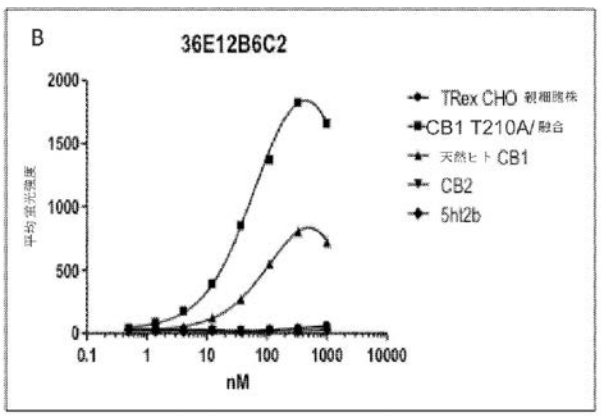



FIG. 2

【図２Ｃ】

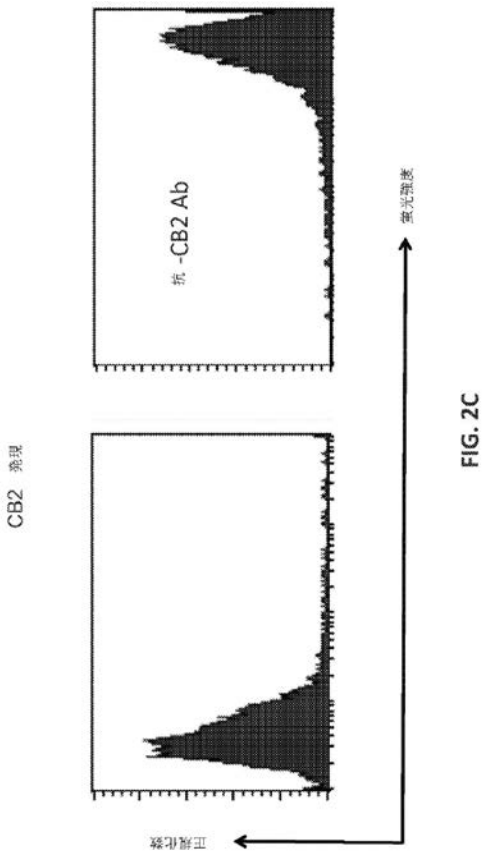



FIG. 2C

【図２Ｄ】

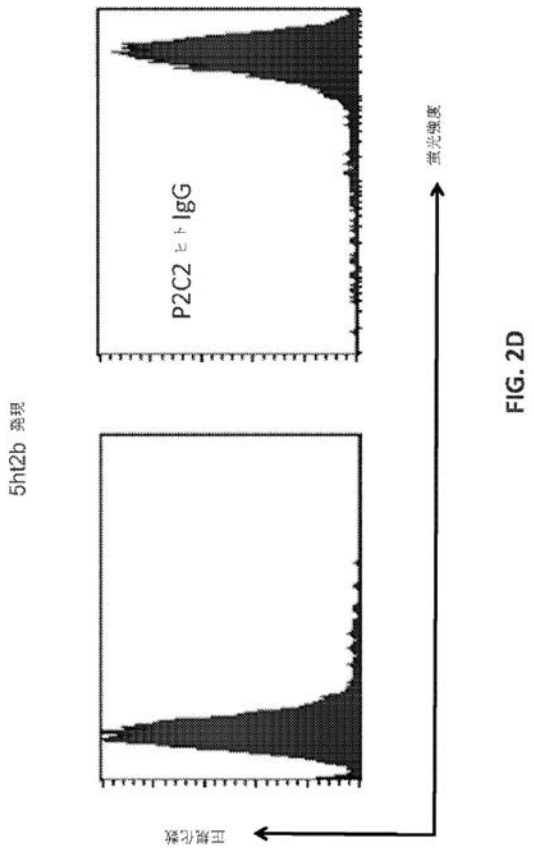



FIG. 2D

【図３Ａ】

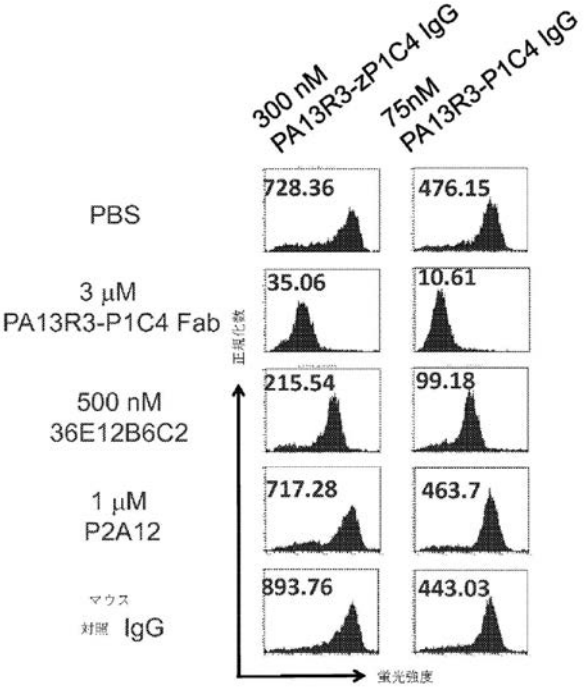



FIG. 3A

【図３Ｂ】

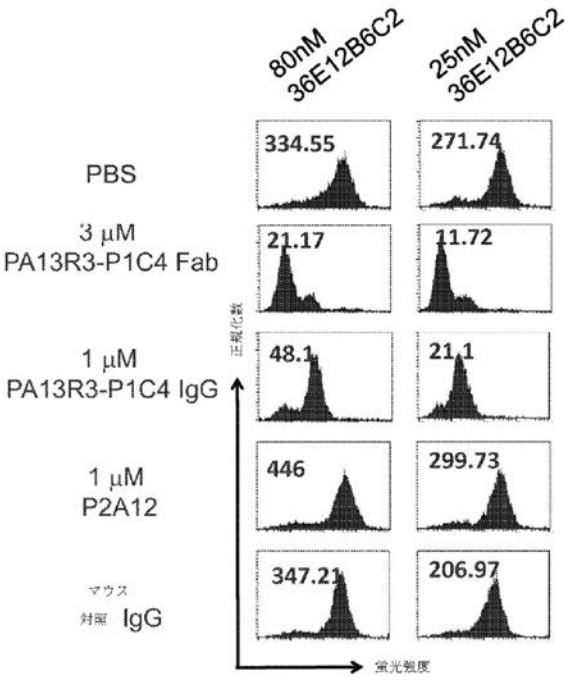
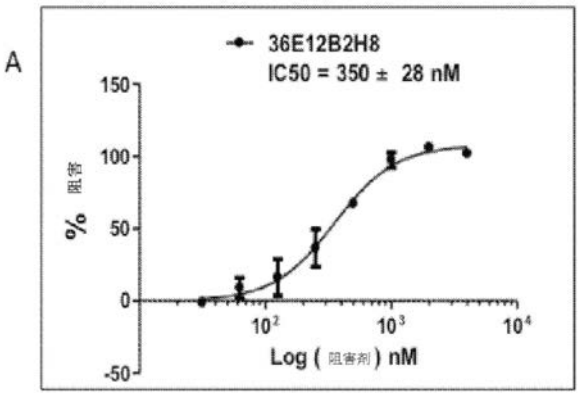



FIG. 3B

【図４Ａ】



【図４Ｂ】

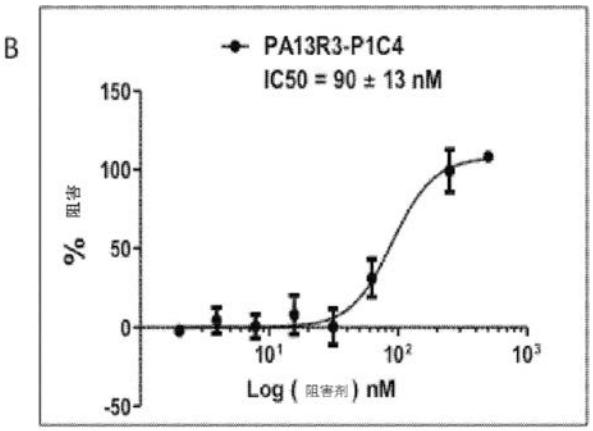
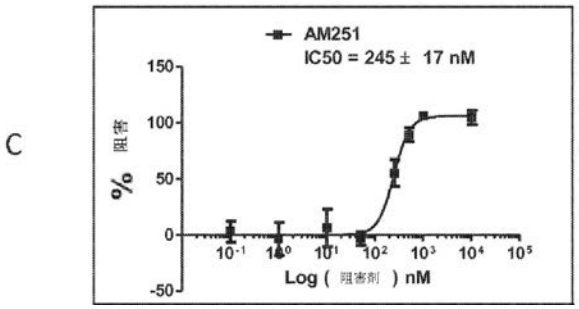
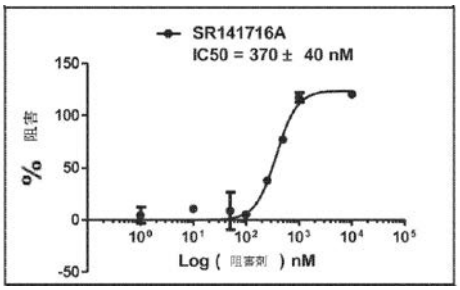



FIG. 4

【図４Ｃ】




【図４Ｄ】




【図４Ｅ】

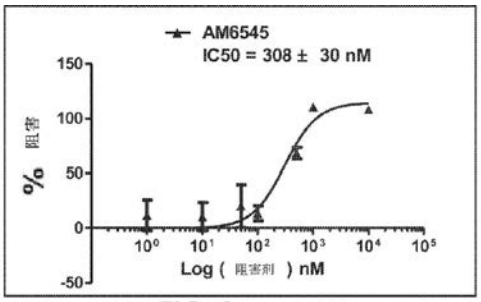
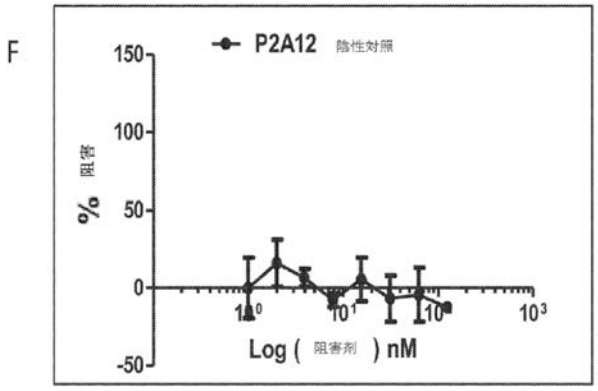



FIG. 4

【図４Ｆ】




【図４Ｇ】

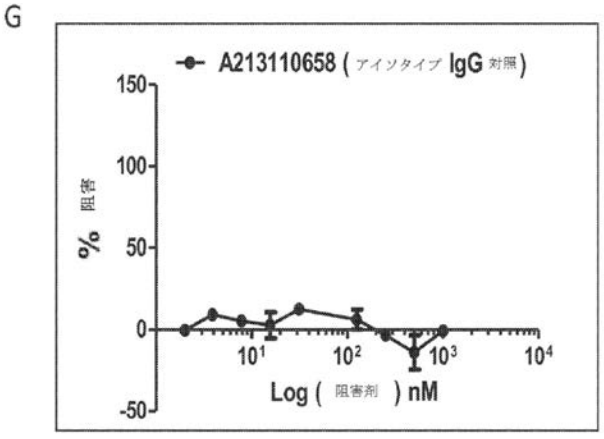



FIG. 4

【図５Ａ】

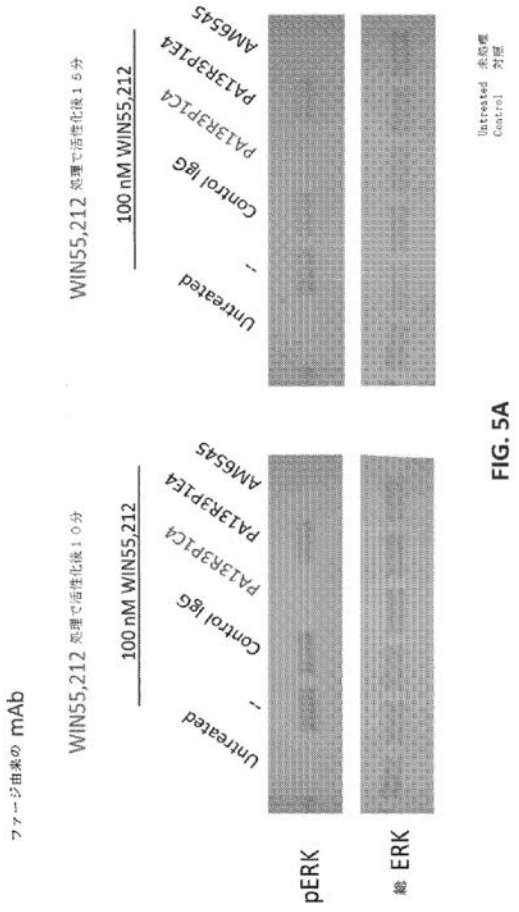



FIG. 5A

【図５Ｂ】

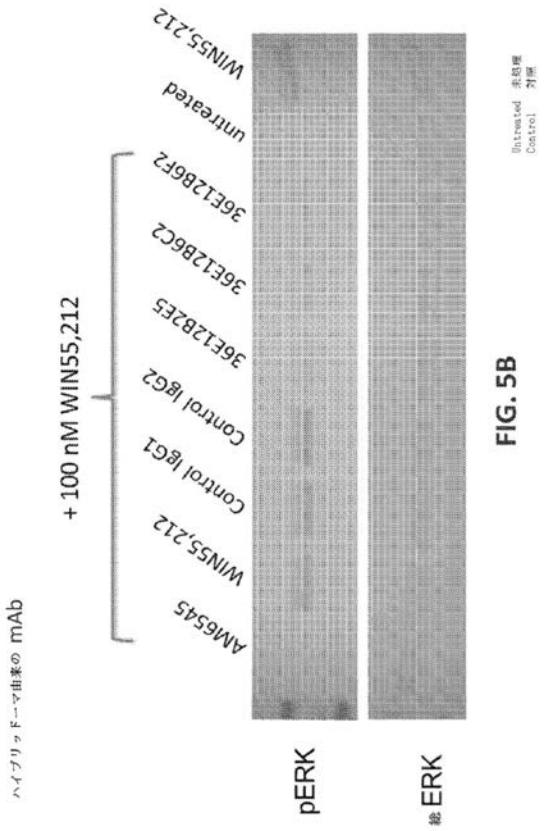



FIG. 5B

【図６Ａ】

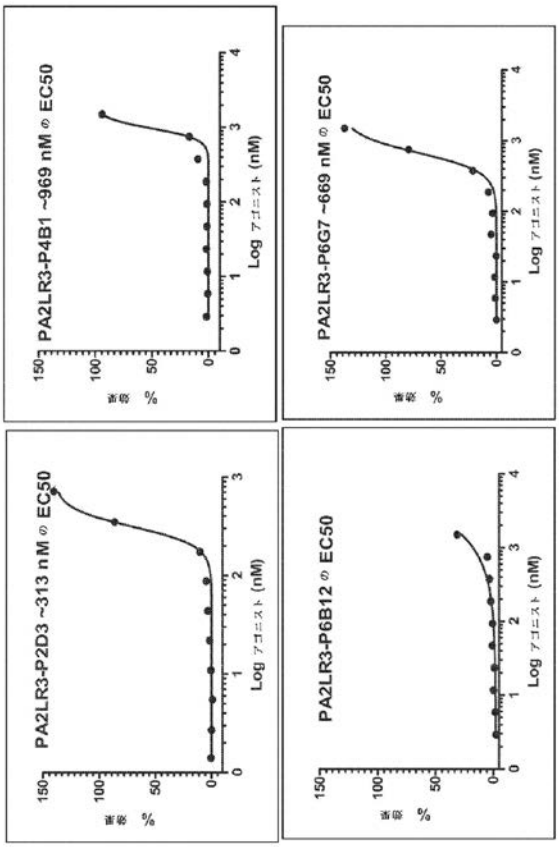



FIG. 6A

【図６Ｂ】

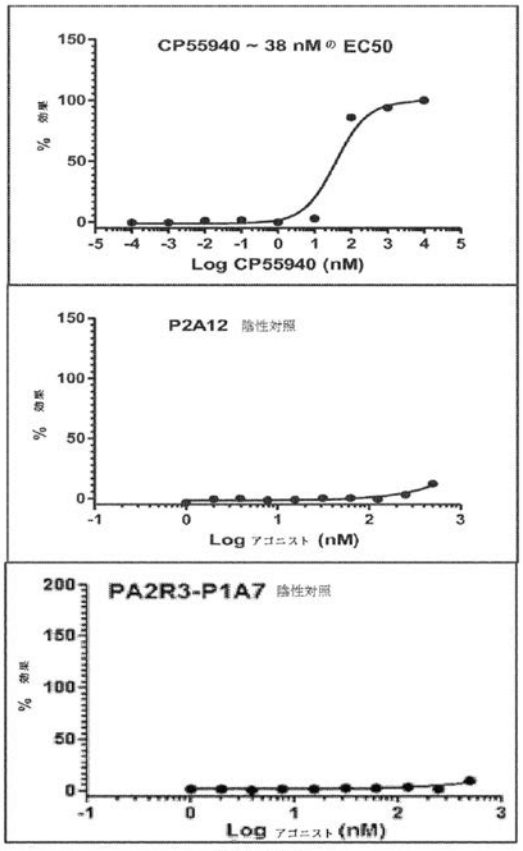



FIG. 6B

【図６Ｃ】

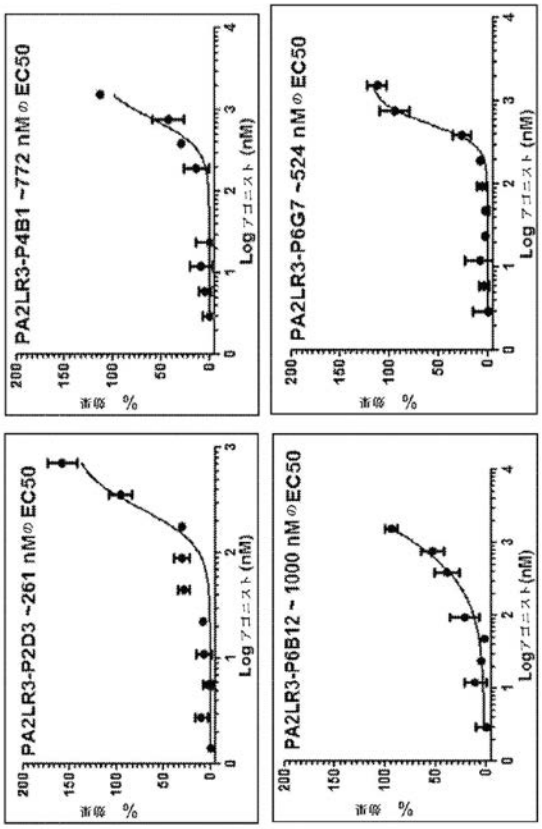



FIG. 6C

【図６Ｄ】

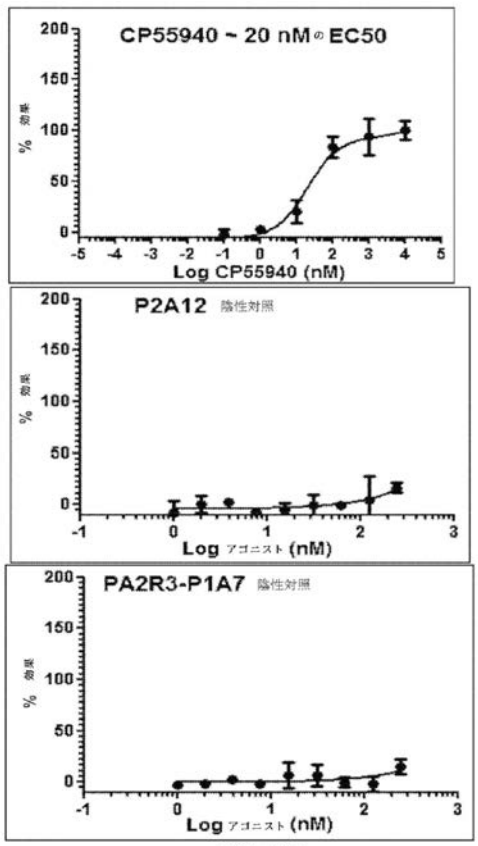



FIG. 6D

【図７】

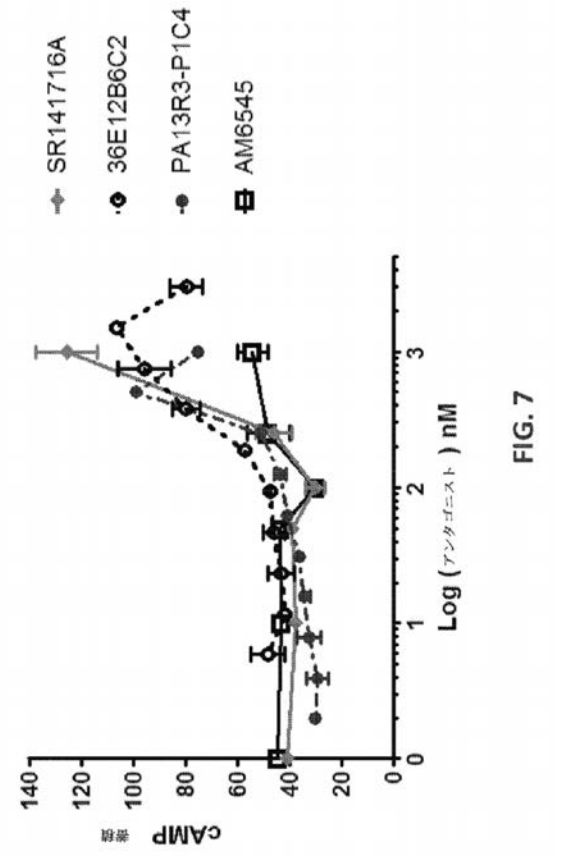



FIG. 7

【図８Ａ】

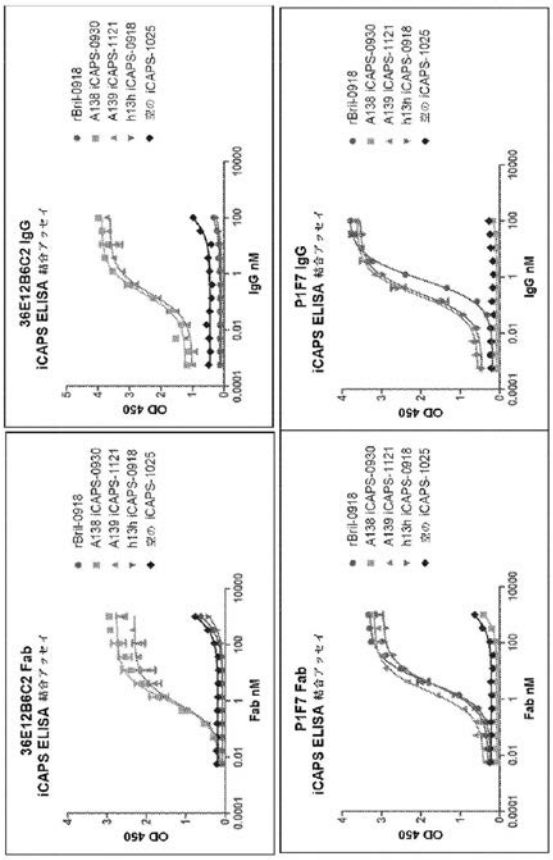



FIG. 8A

【図８Ｂ】

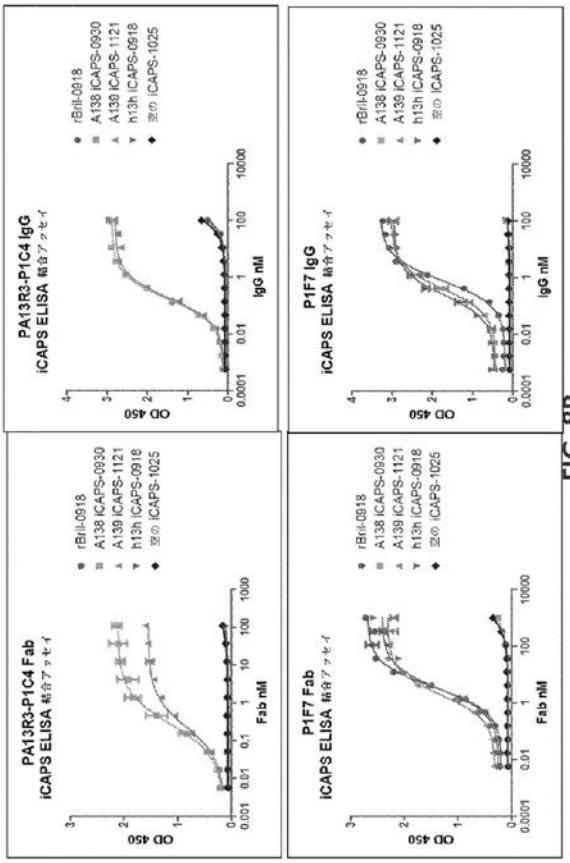



FIG. 8B

【図９Ａ】

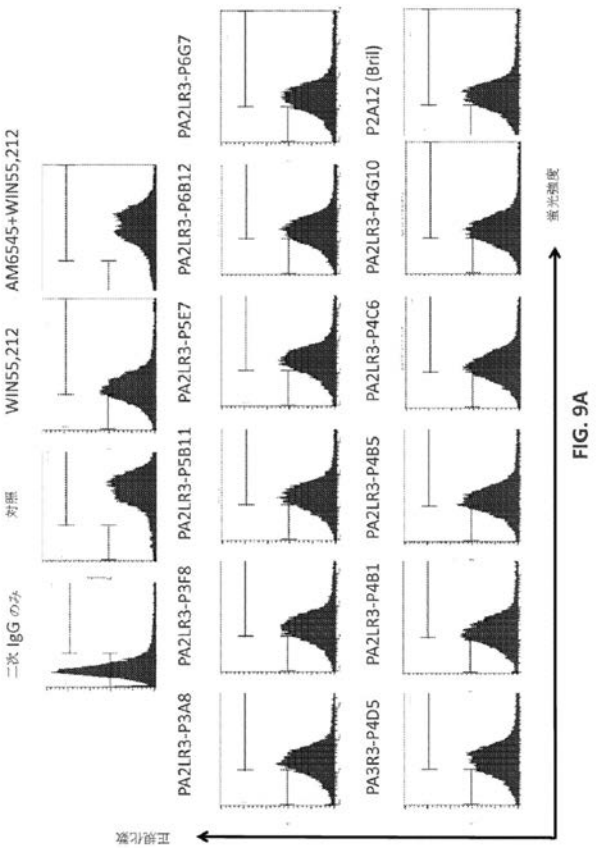



FIG. 9A

【図９Ｂ】

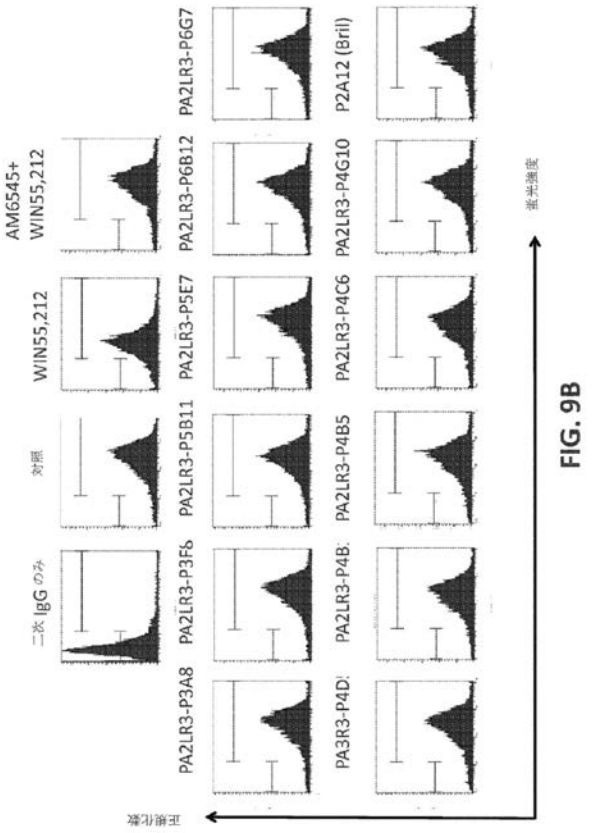



FIG. 9B

【図１０】

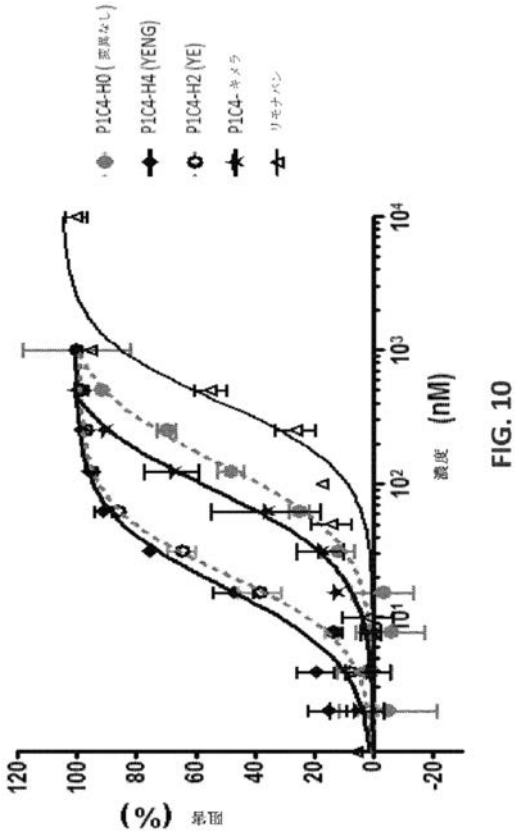



FIG. 10

【図１１Ａ】

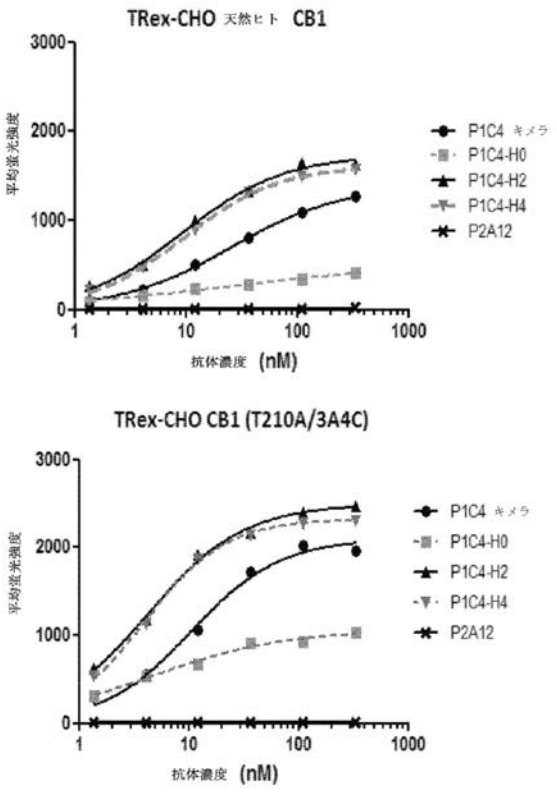



FIG. 11A

【図１１Ｂ】

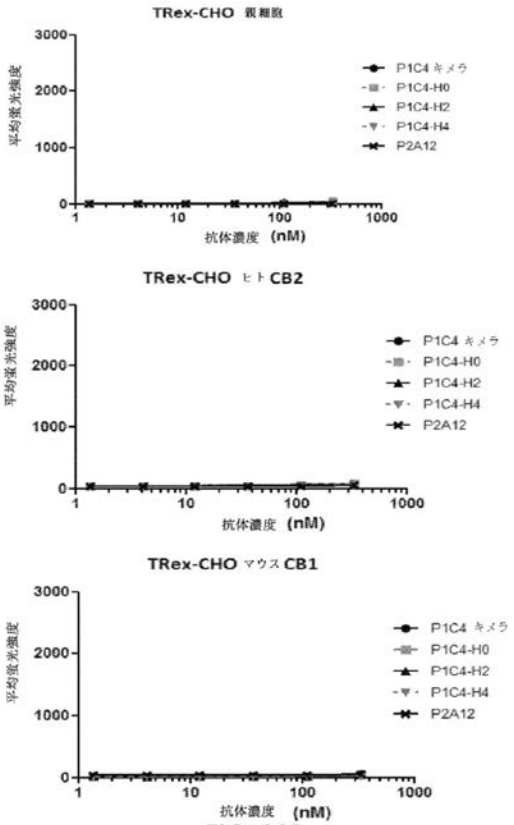



FIG. 11B

【図１２】

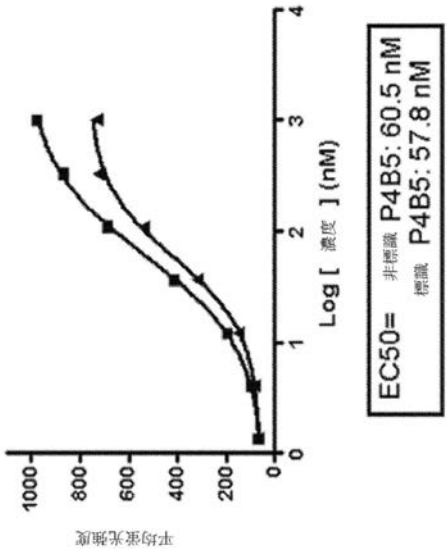



FIG. 12

【図１３Ａ－１】

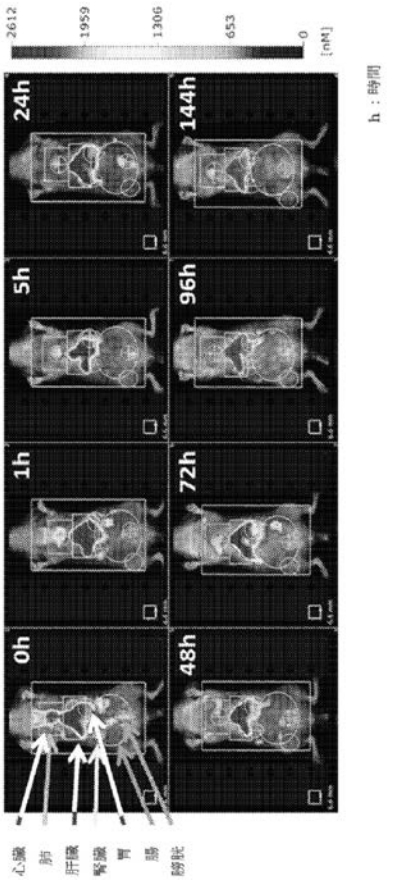



FIG. 13A.1

【図１３Ａ－２】

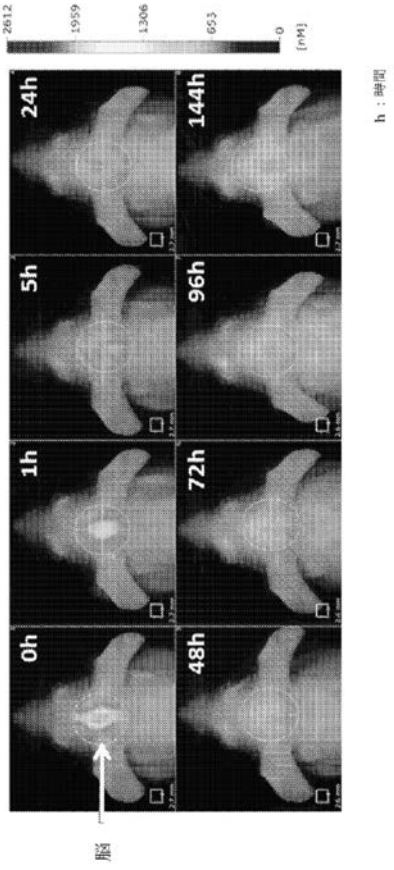



FIG. 13A.2

【図１３Ｂ】

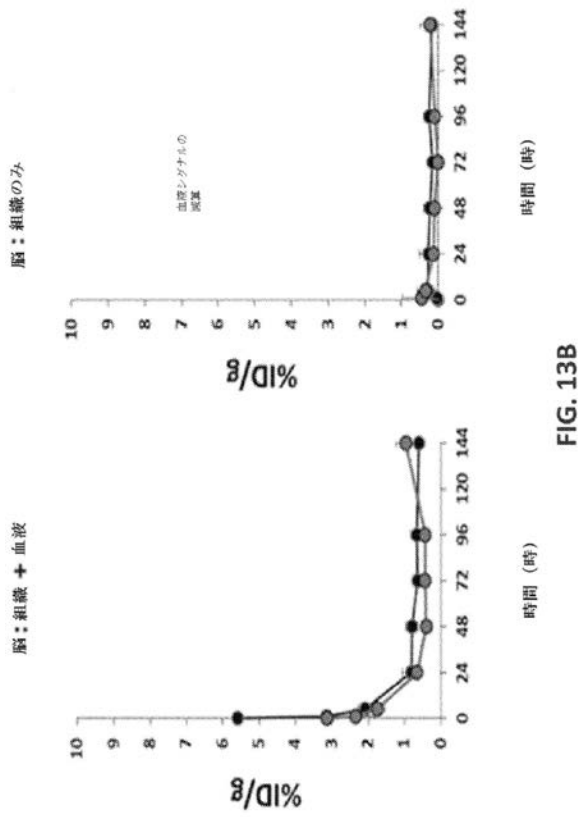



FIG. 13B

【図１４Ａ】

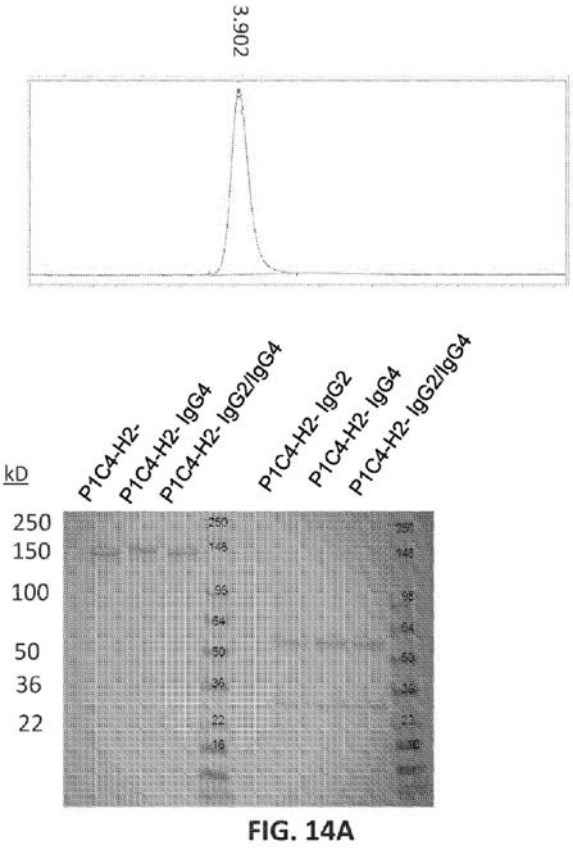



FIG. 14A

【図１４Ｂ】

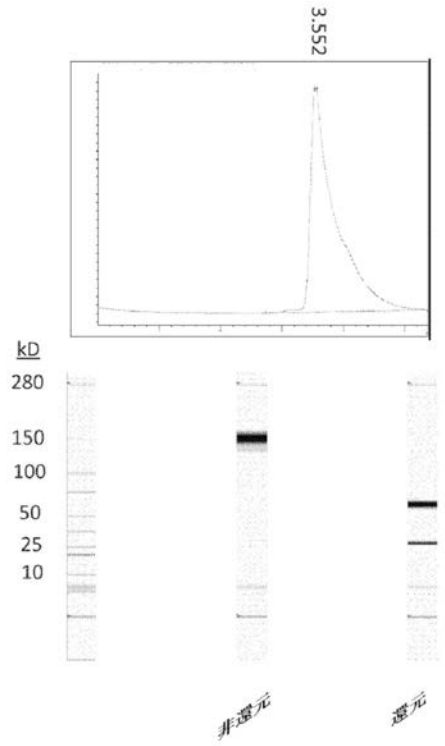
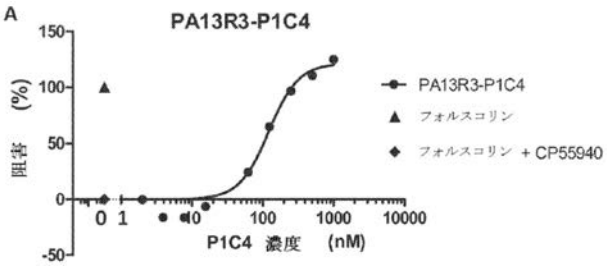
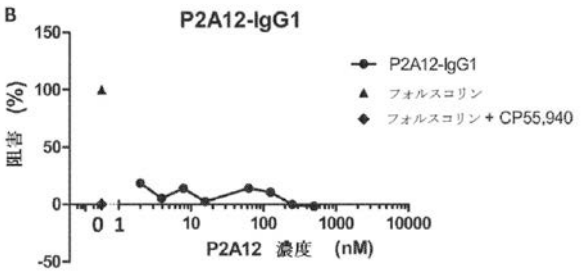



FIG. 14B

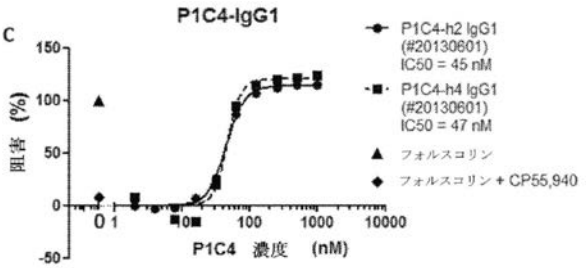
【図１５Ａ】




【図１５Ｂ】



【図１５Ｃ】




【図１５Ｅ】

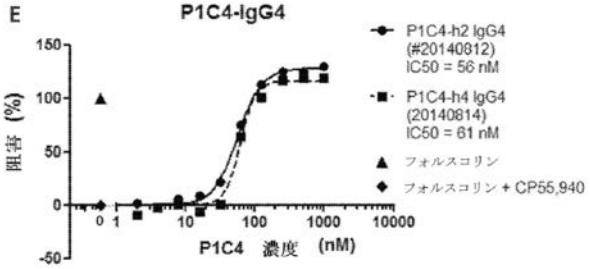
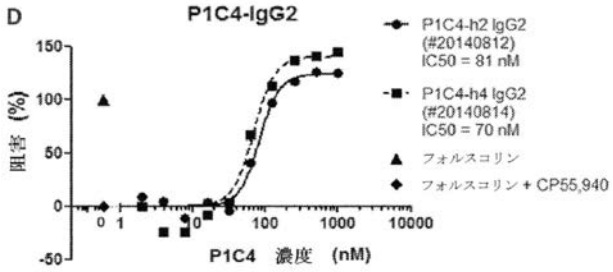



FIG. 15

【図１５Ｄ】




【図１５Ｆ】

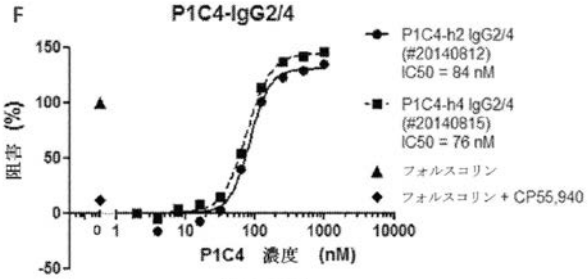



FIG. 15

【図１６Ａ】

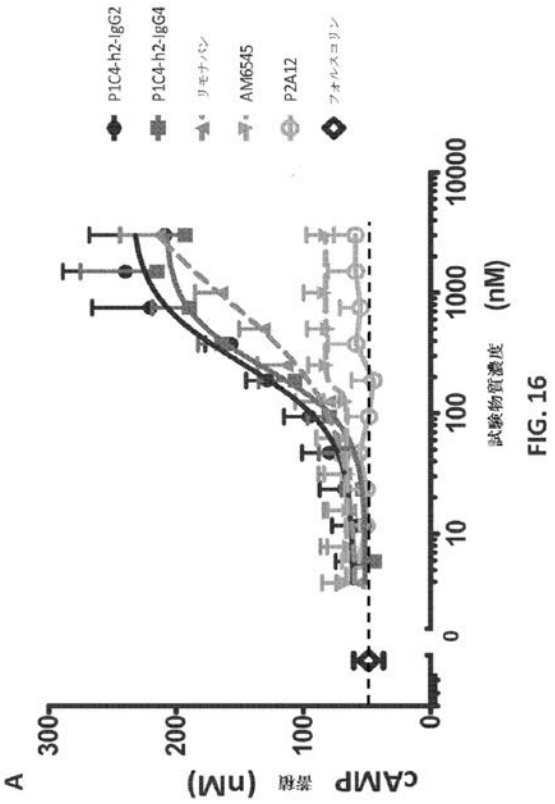



FIG. 16

【図１６Ｂ】

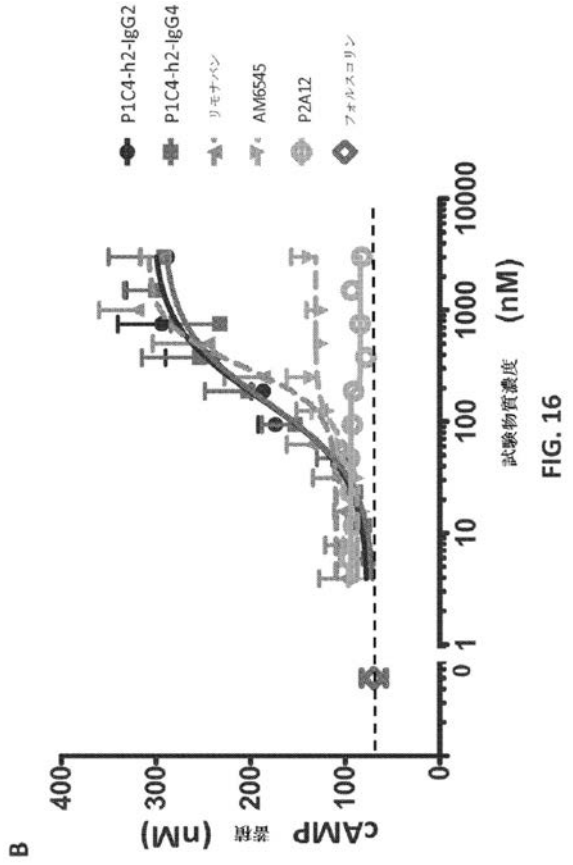



FIG. 16

【図１７Ａ】

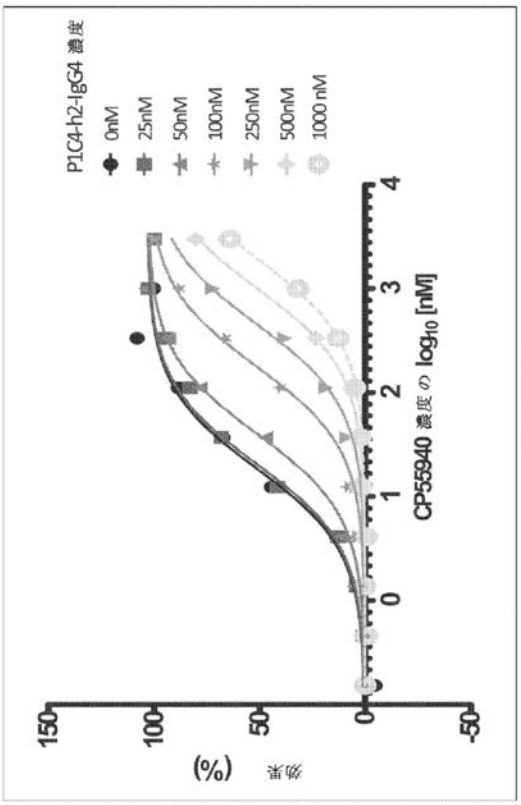



FIG. 17A

【図１７Ｂ】

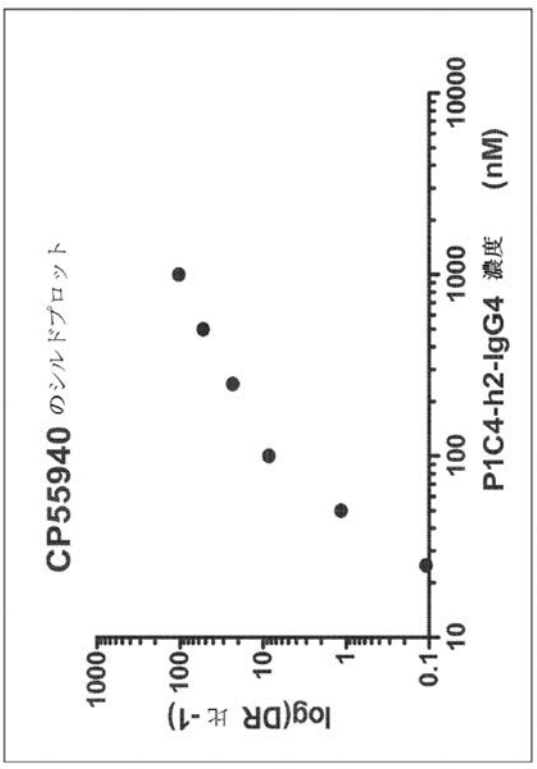



FIG. 17B

【図１７Ｃ】

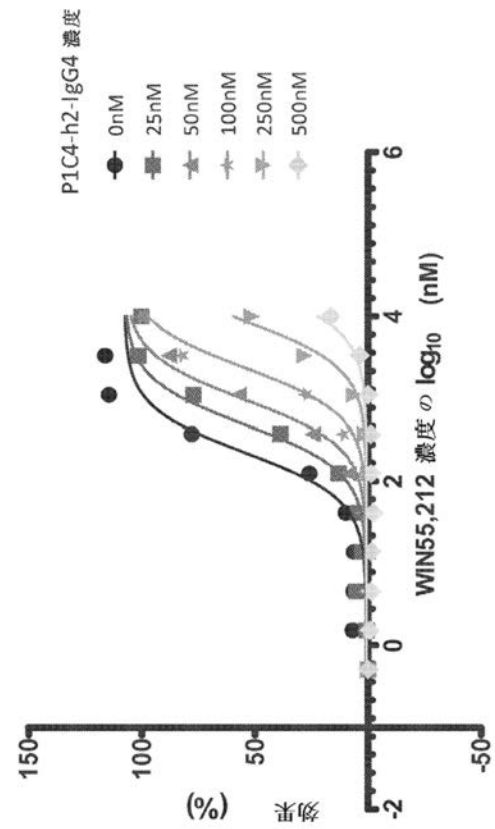



FIG. 17C

【図１７Ｄ】

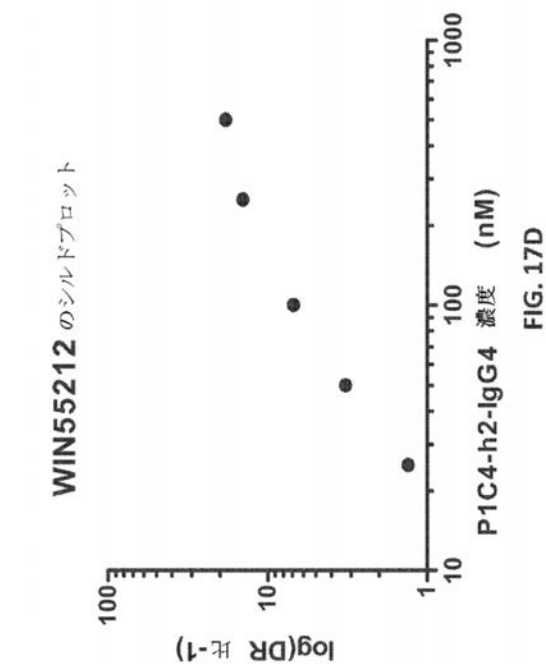



FIG. 17D

【図１８Ａ】

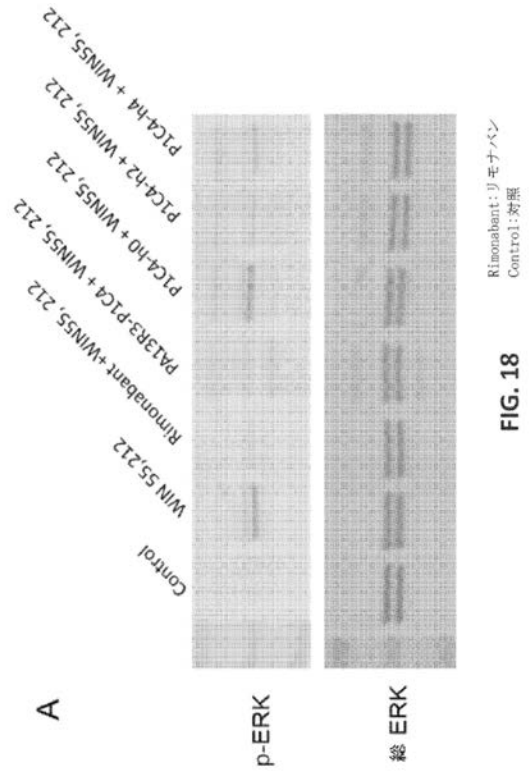



FIG. 18

【図１８Ｂ】

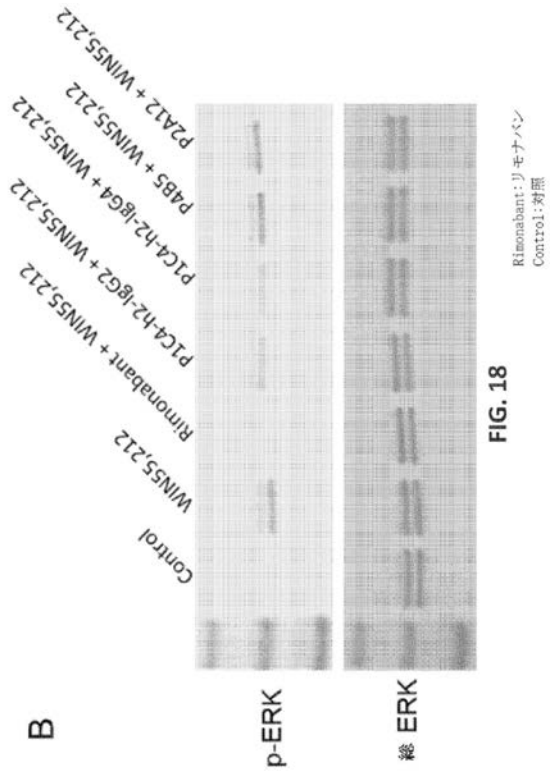



FIG. 18

【図１９Ａ】

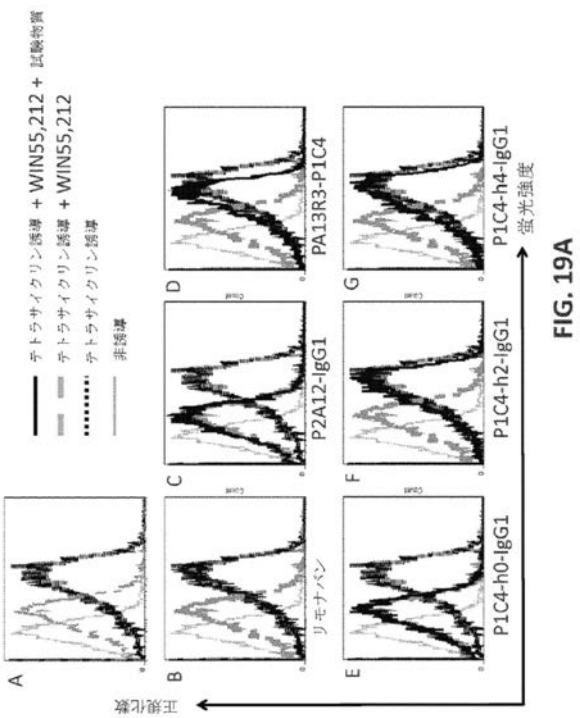



FIG. 19A

【図１９Ｂ】

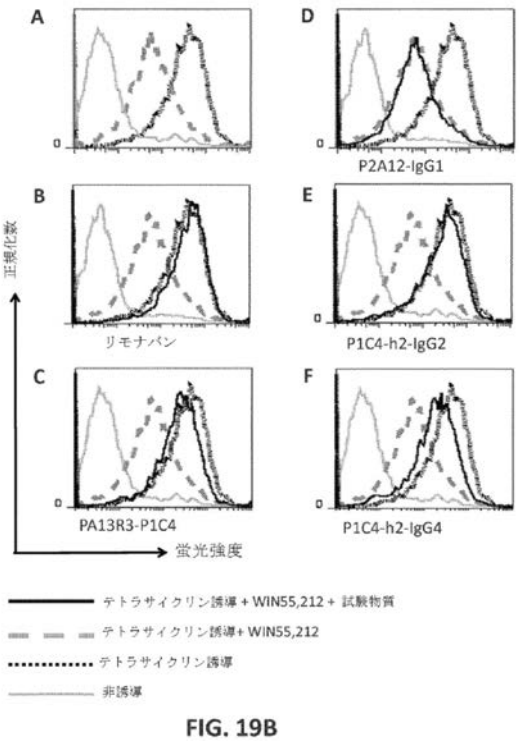
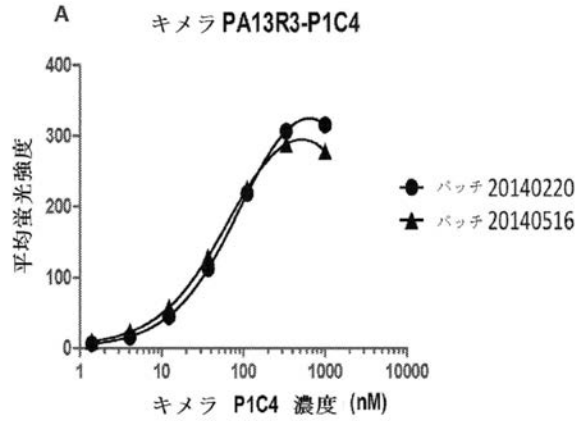



FIG. 19B

【図２０Ａ】




【図２０Ｂ】

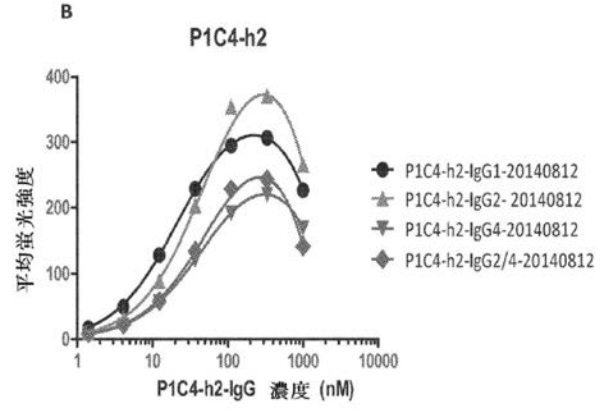
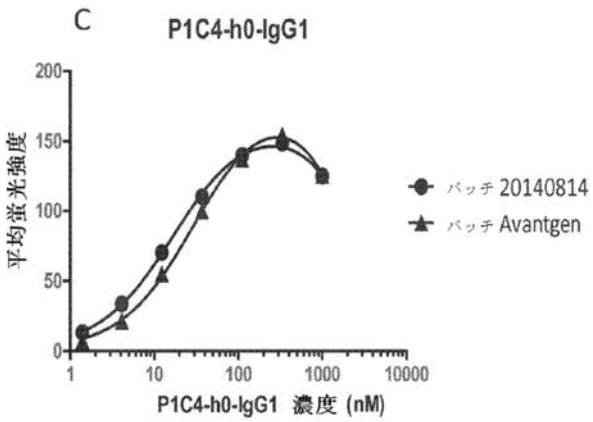



FIG. 20

【図２０Ｃ】




【図２０Ｄ】

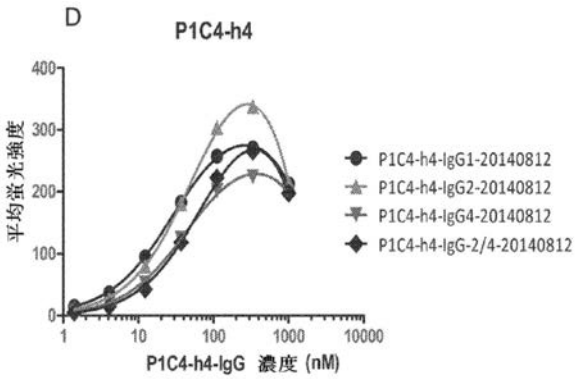
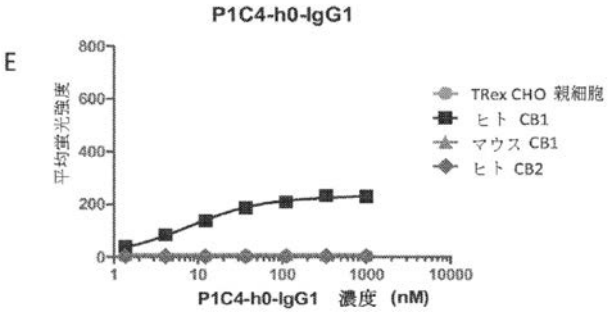



FIG. 20

【図２０Ｅ】




【図２０Ｇ】

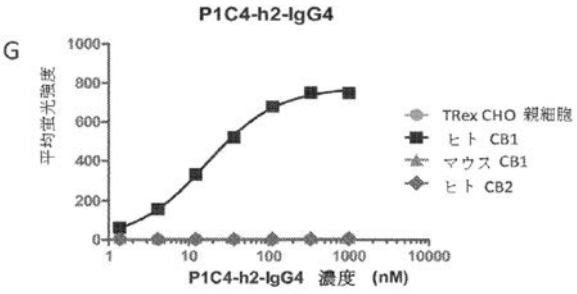
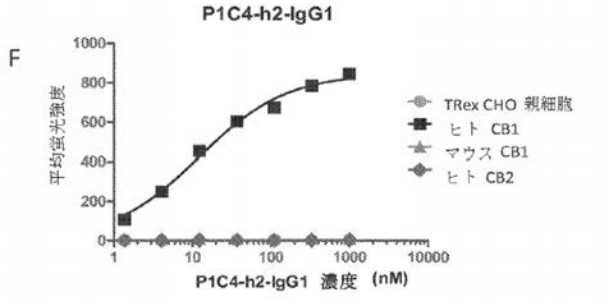
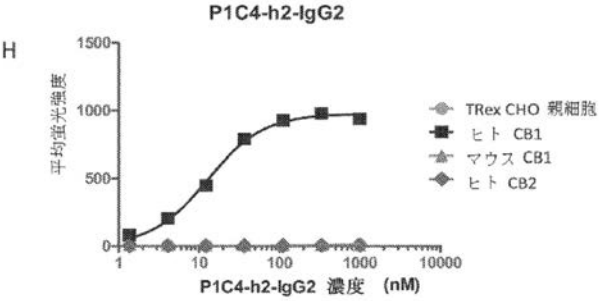



FIG. 20

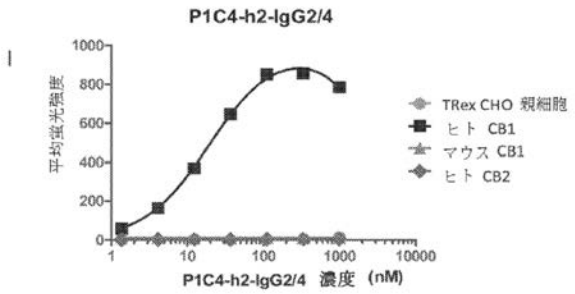
【図２０Ｆ】




【図２０Ｈ】



【図２０Ｉ】




【図２０Ｊ】

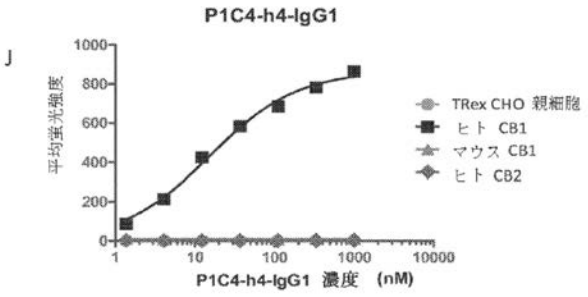
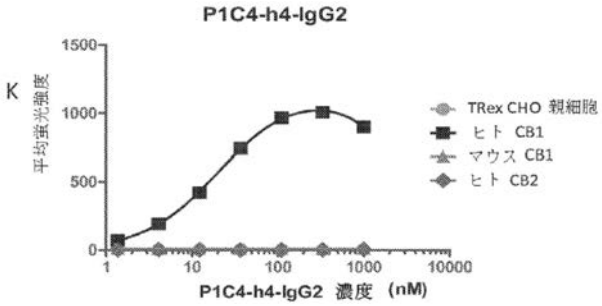
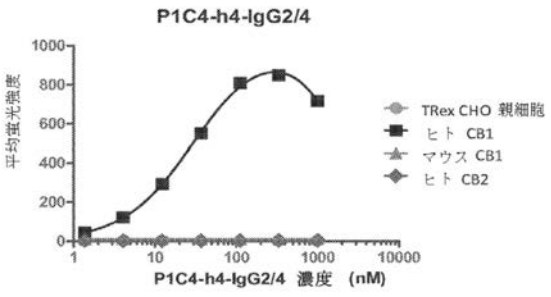



FIG. 20

【図２０Ｋ】




【図２０Ｌ】




【図２０Ｍ】

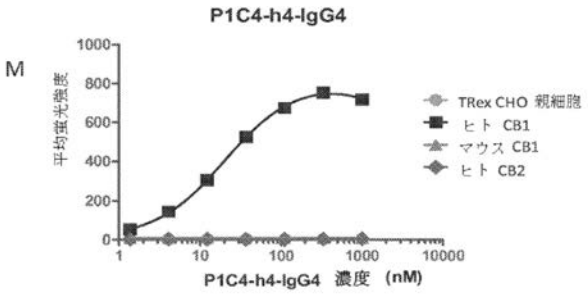



FIG. 20

【図２１】

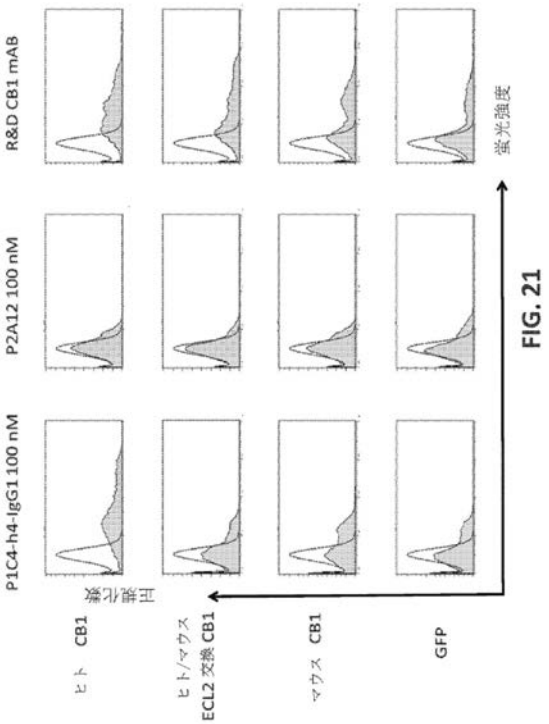



FIG. 21

【図２２Ａ】

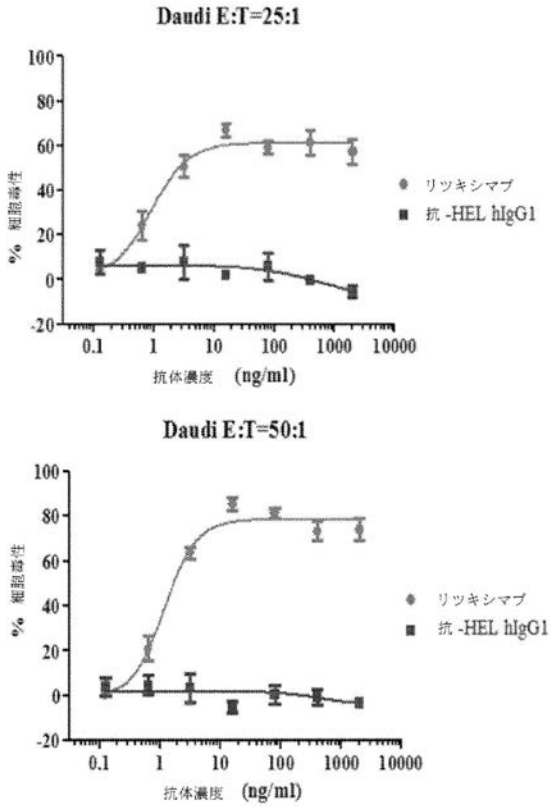



FIG. 22A

【図２２Ｂ】

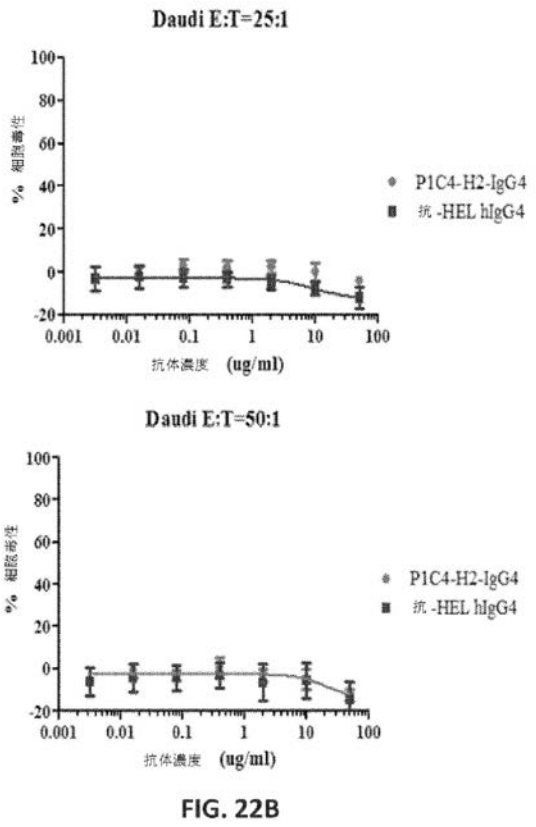



FIG. 22B

【図２２Ｃ】

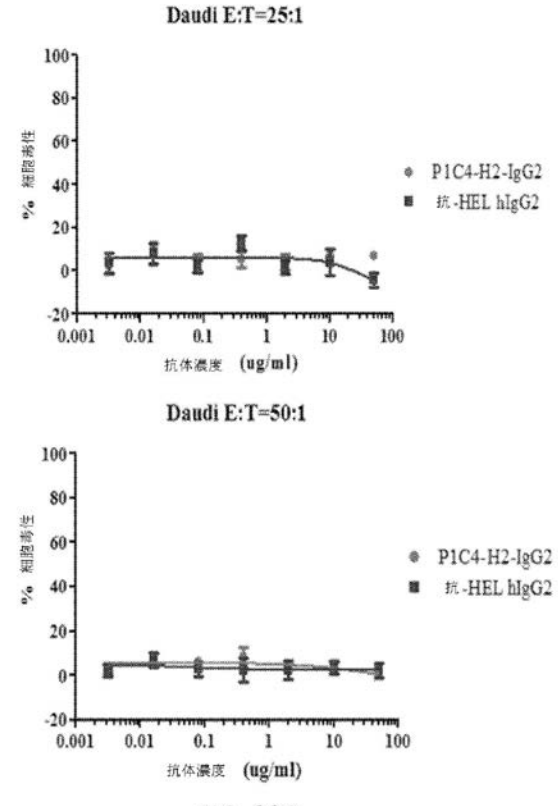



FIG. 22C

【図２２Ｄ】

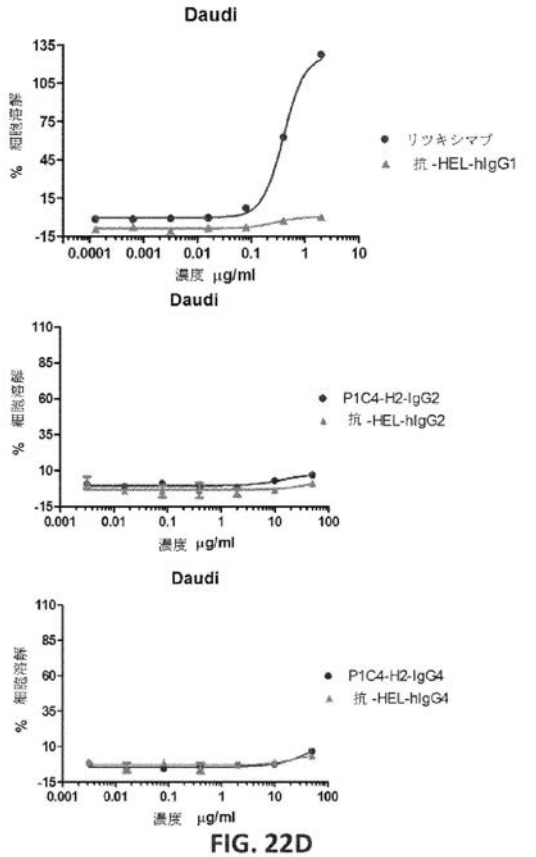



FIG. 22D

【図２３Ａ】

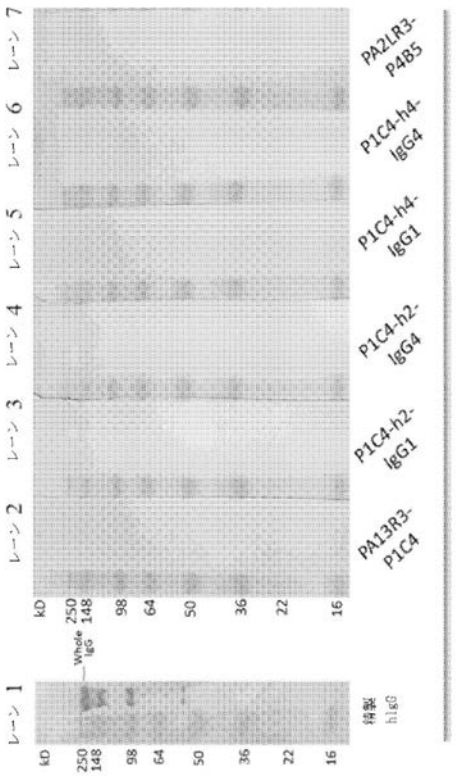



FIG. 23A

【図２３Ｂ】

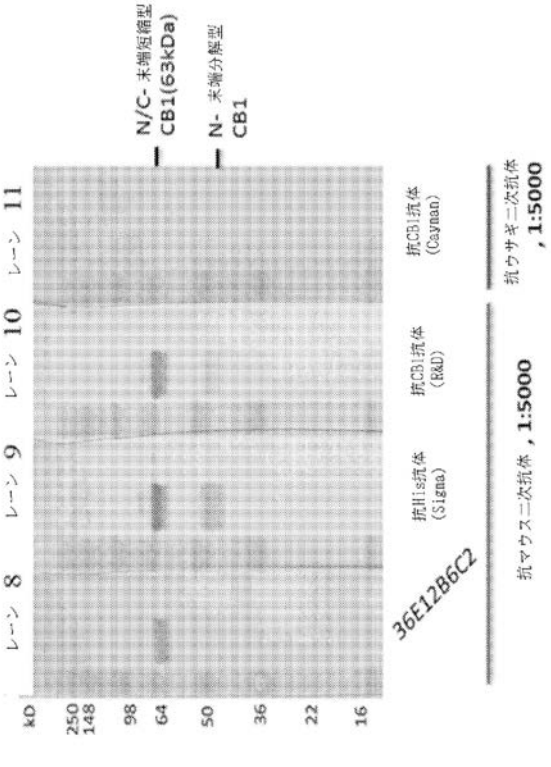



FIG. 23B

【図２４】

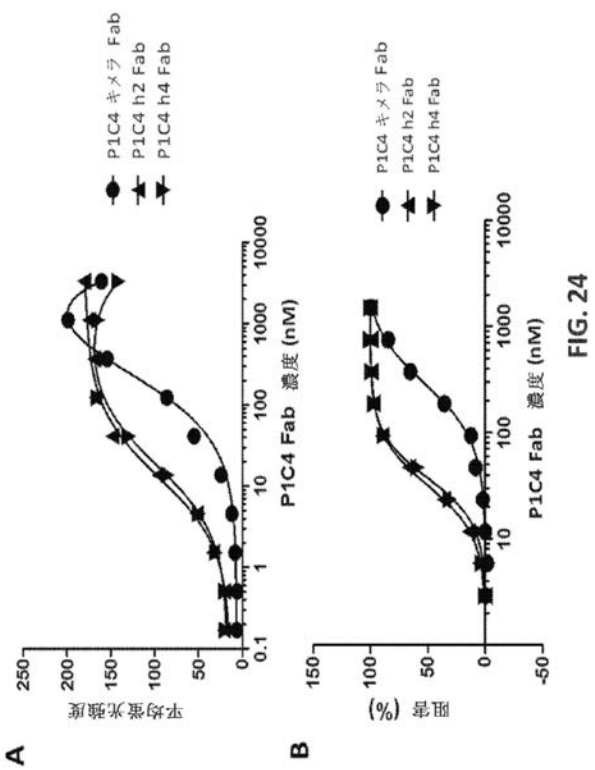



FIG. 24

【図２５】

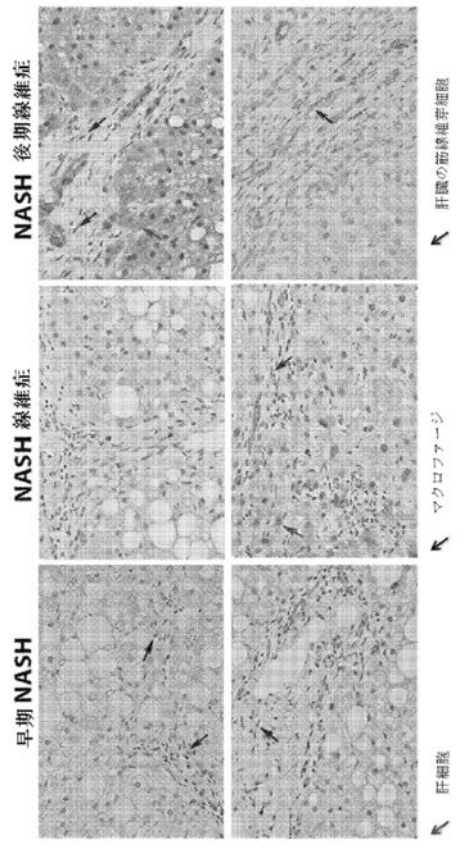



FIG. 25

【図２６】

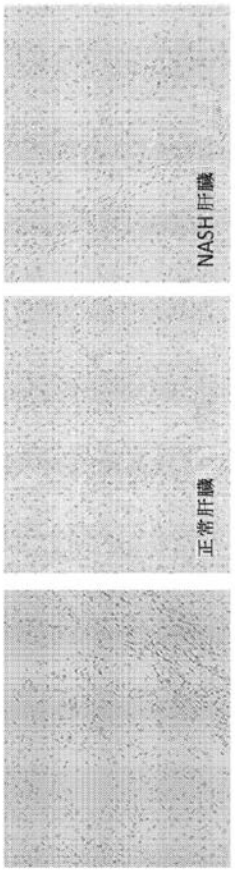



FIG. 26

【図２７】

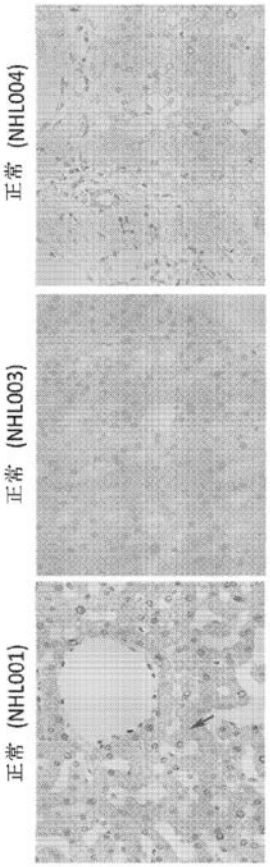



FIG. 27

【図２８】

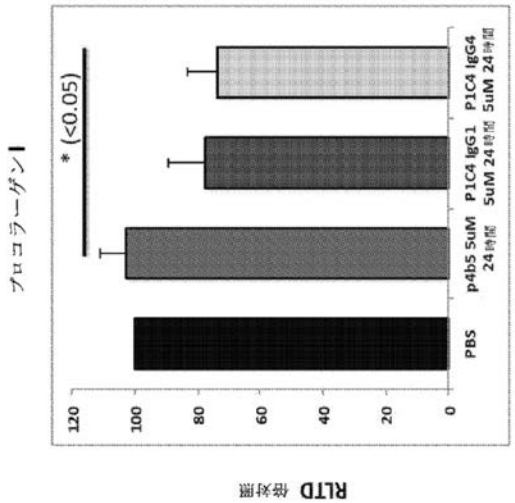



FIG. 28

【図２９】

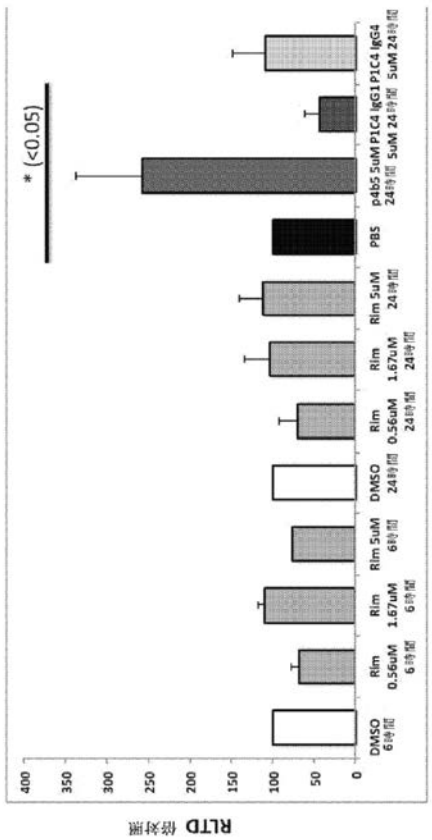



FIG. 29

【図３０】

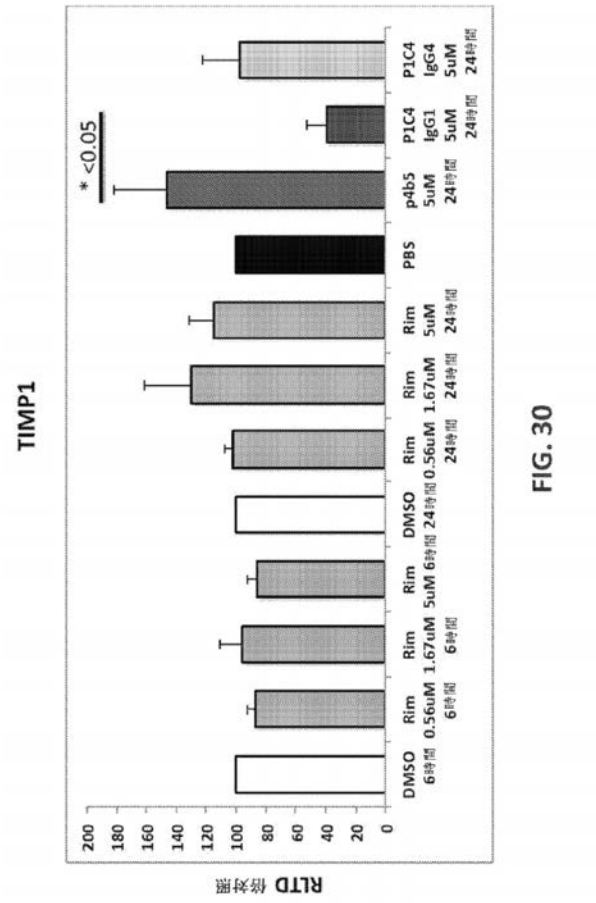



FIG. 30

【図３１】

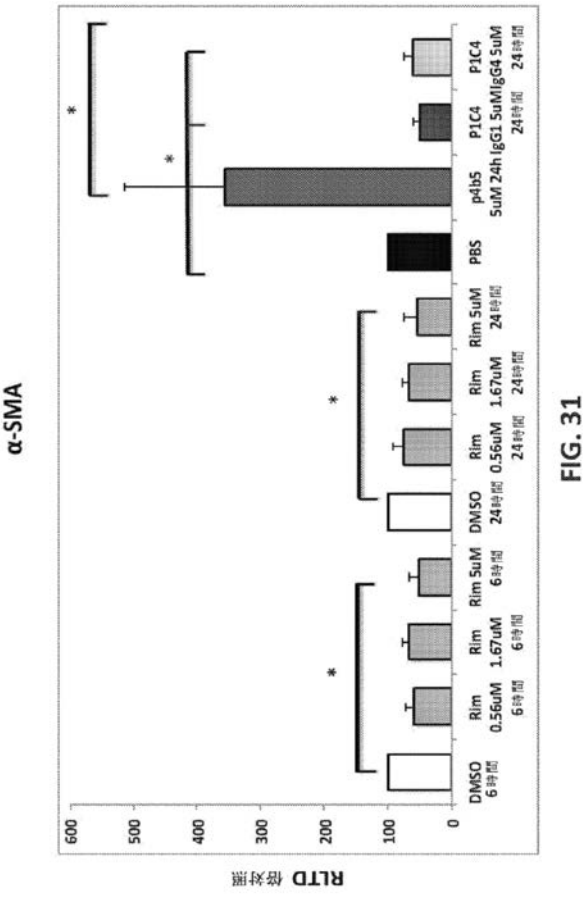



FIG. 31

【配列表】

2017512838000001.app

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/023108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P3/00 A61P9/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | XINGLIN KUANG ET AL: "A Novel Monoclonal Antibody Against Cannabinoid Receptor 1", HYBRIDOMA, vol. 31, no. 2, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 131-136, XP055138991, ISSN: 1554-0014, DOI: 10.1089/hyb.2011.0099 | 1-8,10, 12,13, 17-22, 25-30 |
| Y | abstract<br>page 132, column 1<br>page 135, column 1<br>page 135, column 2<br>page 134,, column 2 | 14-16, 36-38 |
| | ----- | |
| Y | WO 2012/007847 A2 (EPSHTEIN OLEG ILIICH [RU]; SERGEEVA SVETLANA ALEXANDROVNA [RU]; DOLGOV) 19 January 2012 (2012-01-19)<br>claims 1, 2, 12 | 14-16, 36-38 |
| | ----- | |
| | -/-- | |

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 30 June 2015 | 24/09/2015 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Saame, Tina |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/023108

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | CHORVAT ROBERT J: "Peripherally restricted CB1 receptor blockers", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 23, no. 17, 2013, pages 4751-4760, XP028690076, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2013.06.066 the whole document<br>----- | 38 |
| A | DATABASE Geneseq [Online]<br><br>9 December 2010 (2010-12-09), "Mouse anti-amyloid beta monoclonal antibody AL-208 mature VL, SEQ 560.", XP002741601, retrieved from EBI accession no. GSP:AYL01861 Database accession no. AYL01861 abstract; sequence<br>----- | 21 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/023108

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

11, 20-22, 28-30(completely); 1-10, 12-19, 25-27, 36-38(partially)

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No. PCT/US2015/023108

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 11, 20-22, 28-30(completely); 1-10, 12-19, 25-27, 36-38(partially)

Antibody (or antigen binding fragment thereof) binding to CB1 receptor with a Kd of 1 micromolar or less, wherein the antibody has a heavy chain variable region comprising SEQ ID No 2 and/or a light chain variable region comprising SEQ ID No 6 (antibody PA13R3-P1C4); methods of using this antibody including therapeutic and diagnostic methods; an antibody binding to CB1 receptor comprising the heavy chain and/or light chain CDRs represented by SEQ ID Nos 352-354 and 355-357 (antibody PA13R3-P1C4); an antibody having the same binding characteristics as the above antibodies; framework humanized variants of the above antibodies;

---

2. claims: 1-10, 12-19(all partially)

Antibody (or antigen binding fragment thereof) binding to CB1 receptor with a Kd of 1 mM or less, wherein the antibody has a heavy chain variable region comprising SEQ ID Nos 10 or 18 and/or a light chain variable region comprising SEQ ID Nos 14 or 22 (chimeric and mouse antibody 36E12B6C2); methods of using this antibody including therapeutic and diagnostic methods; an antibody having the same binding characteristics as the above antibodies; framework humanized variants of the above antibodies;

---

3. claims: 1-10, 12-19(all partially)

Antibody (or antigen binding fragment thereof) binding to CB1 receptor with a Kd of 1 mM or less, wherein the antibody has a heavy chain variable region comprising SEQ ID No 26 and/or a light chain variable region comprising SEQ ID No 30 (antibody PA2LR3-P4B5); methods of using this antibody including therapeutic and diagnostic methods; an antibody having the same binding characteristics as the above antibodies; framework humanized variants of the above antibodies;

---

4. claims: 23(completely); 25-27, 36-38(partially)

Antibody (or antigen binding fragment thereof) binding to CB1 receptor wherein the antibody comprises a heavy chain CDR1 represented by any of SEQ ID Nos 443-463, a heavy chain CDR2 represented by any of SEQ ID Nos 464-557 and a heavy chain CDR3 represented by any of 578-625; humanized versions thereof; therapeutic methods of using these antibodies;

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No. PCT/US2015/023108

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/** 210

5. claims: 24(completely); 25-27, 36-38(partially)

Antibody (or antigen binding fragment thereof) binding to CB1 receptor wherein the antibody comprises a light chain CDR1 represented by any of SEQ ID Nos 626-661, a light chain CDR2 represented by any of SEQ ID Nos 662-742 and a light chain CDR3 represented by any of 742-824; humanized versions thereof; therapeutic methods of using these antibodies;

---

6. claims: 31-35(completely); 36-38(partially)

An isolated humanized antibody (or antigen binding fragment thereof) which has a binding affinity Kd for CB1 receptor of 100nM or less; therapeutic methods of using this antibody

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/023108

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2012007847 A2 | 19-01-2012 | AR 082246 A1 | 21-11-2012 |
| | | AU 2011278040 A1 | 07-03-2013 |
| | | CA 2805091 A1 | 19-01-2012 |
| | | CL 2013000098 A1 | 16-01-2015 |
| | | CN 103124742 A | 29-05-2013 |
| | | DE 112011102349 T5 | 18-04-2013 |
| | | EA 201300133 A1 | 31-03-2014 |
| | | EE 201300005 A | 15-08-2013 |
| | | EP 2593477 A2 | 22-05-2013 |
| | | ES 2542042 A2 | 29-07-2015 |
| | | FI 20135146 A | 15-02-2013 |
| | | FR 2962653 A1 | 20-01-2012 |
| | | GB 2496076 A | 01-05-2013 |
| | | JP 2013535436 A | 12-09-2013 |
| | | KR 20140012009 A | 29-01-2014 |
| | | LT 5987 B | 27-01-2014 |
| | | NZ 606768 A | 28-08-2015 |
| | | PE 13382013 A1 | 18-11-2013 |
| | | SE 1350179 A1 | 12-04-2013 |
| | | SG 187037 A1 | 28-02-2013 |
| | | US 2013017202 A1 | 17-01-2013 |
| | | WO 2012007847 A2 | 19-01-2012 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *C07K* | *16/46* | *(2006.01)* | C07K | 16/46 | |
| *A61P* | *3/04* | *(2006.01)* | A61P | 3/04 | |
| *A61P* | *3/10* | *(2006.01)* | A61P | 3/10 | |
| *A61P* | *3/06* | *(2006.01)* | A61P | 3/06 | |
| *A61P* | *3/00* | *(2006.01)* | A61P | 3/00 | |
| *A61P* | *1/16* | *(2006.01)* | A61P | 1/16 | |
| *A61P* | *13/12* | *(2006.01)* | A61P | 13/12 | |
| *A61P* | *19/10* | *(2006.01)* | A61P | 19/10 | |
| *A61P* | *9/10* | *(2006.01)* | A61P | 9/10 | 101 |
| *A61P* | *9/00* | *(2006.01)* | A61P | 9/00 | |
| *A61P* | *35/00* | *(2006.01)* | A61P | 35/00 | |
| *A61P* | *29/00* | *(2006.01)* | A61P | 29/00 | |
| *A61P* | *27/06* | *(2006.01)* | A61P | 27/06 | |
| *A61P* | *27/02* | *(2006.01)* | A61P | 27/02 | |
| *A61P* | *25/04* | *(2006.01)* | A61P | 25/04 | |
| *A61K* | *45/00* | *(2006.01)* | A61K | 45/00 | |
| *A61P* | *43/00* | *(2006.01)* | A61P | 43/00 | 111 |
| *C12N* | *15/02* | *(2006.01)* | C12N | 15/00 | C |
| *A61K* | *39/395* | *(2006.01)* | A61K | 39/395 | N |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 アンケ・クレッツーロンメル
アメリカ合衆国９２１１６カリフォルニア州サンディエゴ、ケンジントン・ドライブ４５３５番
(72)発明者 シー・レイ
中華人民共和国２０１２０６シャンハイ、ビーユン・ロード７７７番、４－６０２
(72)発明者 ロジャー・フェリーニ
アメリカ合衆国９２０７５カリフォルニア州ソラーナ・ビーチ、サウス・シエラ・アベニュー３２５番、ナンバー２３
(72)発明者 ヤン・テディ
中華人民共和国２００００００シャンハイ、サウス・シャンシー・ロード８８８番、ビルディング７、ルーム２９０４
(72)発明者 フェイ・シュイ
アメリカ合衆国３３４１０フロリダ州パーム・ビーチ・ガーデンズ、ビントナー・ブールバード１０６１番
(72)発明者 ブライアン・キャンピオン
アメリカ合衆国９２０３７カリフォルニア州ラ・ホヤ、ファーン・グレン６３０番

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01
CA24 CA25 CA44
4C084 AA19 NA06 ZA081 ZA331 ZA361 ZA701 ZA751 ZA811 ZB111 ZB261
ZC211 ZC331 ZC351 ZC421 ZC752

4C085 AA14 AA16 BB41 BB43 CC23 EE01
4H045 AA11 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20 FA74