

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7695228号  
(P7695228)

(45)発行日 令和7年6月18日(2025.6.18)

(24)登録日 令和7年6月10日(2025.6.10)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
		Z N A	
		Z	
請求項の数 15 (全54頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号 特願2022-502245(P2022-502245)		(73)特許権者 510000976	
(86)(22)出願日 令和2年7月15日(2020.7.15)		インターベット インターナショナル ベー・フェー・	
(65)公表番号 特表2022-541767(P2022-541767 A)		オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベル	
(43)公表日 令和4年9月27日(2022.9.27)		ストラート・3 5	
(86)国際出願番号 PCT/EP2020/069924		(74)代理人 100114188	
(87)国際公開番号 WO2021/009188		弁理士 小野 誠	
(87)国際公開日 令和3年1月21日(2021.1.21)		(74)代理人 100119253	
審査請求日 令和5年6月29日(2023.6.29)		弁理士 金山 賢教	
(31)優先権主張番号 62/874,287		(74)代理人 100124855	
(32)優先日 令和1年7月15日(2019.7.15)		弁理士 坪倉 道明	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		(74)代理人 100129713	
前置審査		(74)代理人 弁理士 重森 一輝	
		(74)代理人 100137213	
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヒト及びイヌCTLA - 4に対するイヌ化抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イヌ細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）に特異的に結合する、イヌＩｇＧ重鎖及びイヌカッパ軽鎖を含んでいる単離されたイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメントであって；ここで、該イヌカッパ軽鎖は、３つの軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）〔ＣＤＲ軽１（ＣＤＲＬ１）、ＣＤＲ軽２（ＣＤＲＬ２）及びＣＤＲ軽３（ＣＤＲＬ３）〕を含んでおり；及び、該イヌＩｇＧ重鎖は、３つの重鎖ＣＤＲ〔ＣＤＲ重１（ＣＤＲＨ１）、ＣＤＲ重２（ＣＤＲＨ２）及びＣＤＲ重３（ＣＤＲＨ３）〕を含んでおり；

（ａ）ここで、ＣＤＲＬ１は、配列番号５４のアミノ酸配列を含んでおり；

（ｂ）ここで、ＣＤＲＬ２は、配列番号５６のアミノ酸配列を含んでおり；

（ｃ）ここで、ＣＤＲＬ３は、配列番号５８のアミノ酸配列を含んでおり；

（ｄ）ここで、ＣＤＲＨ１は、配列番号４８のアミノ酸配列を含んでおり；

（ｅ）ここで、ＣＤＲＨ２は、配列番号５０のアミノ酸配列を含んでおり；及び、

（ｆ）ここで、ＣＤＲＨ３は、配列番号５２のアミノ酸配列を含んでおり；

ここで、前記単離されたイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメントは、イヌＣＤ８０とのイヌＣＴＬＡ－４の結合を阻害するか、イヌＣＤ８６とのイヌＣＴＬＡ－４の結合を阻害するか、イヌＣＤ８０とイヌＣＤ８６の両方とのイヌＣＴＬＡ－４の結合を阻害する前記単離されたイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

前記イヌＩｇＧ重鎖が、配列番号３４、配列番号３６、配列番号３８、配列番号４０、

配列番号 6 0、配列番号 6 2、配列番号 6 4 及び配列番号 6 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでいる、請求項 1 に記載の単離されたイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

前記カップ軽鎖が、配列番号 4 2、配列番号 4 4 及び配列番号 4 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでいる、請求項 1 又は 2 に記載の単離されたイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

前記イヌ I g G 重鎖が配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含んでおり、及び、前記イヌカップ軽鎖が配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでいる、請求項 1 に記載の単離されたイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 5】

前記イヌ I g G 重鎖が配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含んでおり、及び、前記イヌカップ軽鎖が配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含んでいる、請求項 1 に記載の単離されたイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

請求項 1、2、3、4 又は 5 に記載のイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメントのイヌカップ軽鎖をコードする、単離された核酸。

【請求項 7】

請求項 1、2、3、4 又は 5 に記載のイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメントのイヌ I g G 重鎖をコードする、単離された核酸。

20

【請求項 8】

請求項 6 又は 7 に記載の単離された核酸を含んでいる、発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の 1 以上の発現ベクターを含んでいる、宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1、2、3、4 又は 5 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含んでいる、医薬組成物。

【請求項 11】

免疫細胞の活性を増大させる方法であって、それを必要とする非ヒト対象に、治療有効量の請求項 10 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

30

【請求項 12】

前記方法が、

- ( i ) 癌を処置するために；
- ( i i ) 感染症又は感染性疾患を処置するために；又は、
- ( i i i ) ワクチンアジュバントとして；

使用される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

免疫細胞の活性を増大させることを必要とする非ヒト対象において免疫細胞の活性を増大させるための医薬の製造における、請求項 10 に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 14】

請求項 13 に記載の医薬の製造における医薬組成物の使用であって、前記医薬が、

- ( i ) 癌を処置するために；
- ( i i ) 感染症又は感染性疾患を処置するために；又は、
- ( i i i ) ワクチンアジュバントとして；

使用される、使用。

【請求項 15】

C T L A - 4 に特異的に結合するイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメントを生成する方法であって、

- a . 核酸が発現される条件下、請求項 9 に記載の宿主細胞を培地中で培養し、それに

50

より、軽鎖及び重鎖可変領域を含んでいるポリペプチドを生成させること；及び、

b. 前記宿主細胞又は培地から前記ポリペプチドを回収すること；

を含んでいる、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、35 U.S.C. § 119(e)に基づいて、2019年7月15日に  
出願された米国仮特許出願第62/874,287号の優先権を主張するものであり、こ  
の出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

本発明は、共刺激又は共阻害シグナル伝達経路に関与するタンパク質（これは、CTLA-4を包含する）に対する抗体に関する。より特定のには、本発明は、さらに、特定の  
配列を有し且つイヌCTLA-4に対する高い結合親和性を有している、ヒトCTLA-  
4に対するイヌ化抗体に関する。本発明は、さらに、イヌの癌の治療における本発明の抗  
体の使用にも関する。

【背景技術】

【0003】

免疫応答の開始又は終了は、多くの種類の免疫細胞（特に、Tリンパ球及び抗原提示細胞（APC））の表面で発現する一連のタンパク質の間の複雑な相互作用によって活性化  
されるシグナル伝達経路を介して媒介される。共刺激シグナル伝達経路は、免疫応答の発  
生をもたらす、そして、最も重要にはT細胞の表面のCD28とAPCの表面のB7.1  
（CD80としても知られている）及びB7.2（CD86としても知られている）ファ  
ミリーメンバーとの相互作用を介して媒介されることが、示されている。B7.1及びB  
7.2は、同様の機能を果たすと考えられている。

20

【0004】

対照的に、共阻害経路は、免疫応答の阻害又は終結をもたらす、そして、T細胞上のC  
TLA-4とAPC上のB7.1/B7.2タンパク質の間の相互作用を介して媒介され  
ることが示されている。さらなる共阻害シグナル伝達経路は、T細胞上のプログラム細胞  
死受容体1（PD-1）とAPC上のプログラム細胞死受容体リガンド1又は2（PD-  
L1/PD-L2）タンパク質の間の相互作用を介して媒介されることが示されている。  
さらに、PD-L1とB7.1の間の相互作用も、T細胞内に阻害シグナルをもたらす可  
能性があることも示されている。

30

【0005】

B7.1及びB7.2は、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーのメンバーであ  
る[Sharpe and Freeman, Nature Reviews, 2:1  
16-126 (2002)]。B7.1は、活性化B細胞、活性化T細胞、並びに、マ  
クロファージ及び樹状細胞で発現する[Swanson and Hall, Eur J  
. Immunol., 23:295-298 (1993); Razi-Wolfe  
et al., PNAS, 89:4210-4214 (1992)]。B7.2は、  
樹状細胞、ランゲルハンス細胞及びB細胞で構成的に発現する。さらに、B7.2は、単  
球で発現し、そして、IFN-刺激後にアップレギュレーションされる[Larsen  
et al., Immunol., 152:5208-5219 (1994); In  
aba, J. Exp. Med. 180:1849-1860 (1994)]。

40

【0006】

B7.1及びB7.2は、CD28とCTLA-4に結合して、異なる機能的結果をも  
たらす[Linsley et al., PNAS, 87:5031-5035 (1  
990); Linsley et al., J. Exp. Med., 173:72  
1-730 (1991); Azuma et al., Nature 366:76-  
79 (1993); Freeman et al., Science 262:909

50

- 912 (1993)]。B7.1及びB7.2のCTLA-4への結合は、B7.1及びB7.2のCD28への結合よりも極めて高い親和性を示す[van der Merwe, J. Exp. Med. 185:393-402 (1997)]。

#### 【0007】

CD28は、Igスーパーファミリーのメンバーであるホモ二量体糖タンパク質である[Aruffo and Seed, PNAS, 84:8573-8577 (1987)]。成熟タンパク質は、カウンター受容体結合に不可欠なヘキサペプチドモチーフMYPPPYを含んでいる134アミノ酸残基からなる単一の細胞外可変ドメインを有している[Riley and June, Blood, 105:13-21 (2005)]。CD28の41アミノ酸の細胞質ドメインは、活性化時にリン酸化され得る4つのチロシン残基を含んでいる[Sharpe and Freeman, Nat. Rev. Immunol., 2:116-126 (2002)]。CD28は、CD4<sup>+</sup>T細胞の大部分とCD8<sup>+</sup>T細胞の約50%で発現する[Gross et al., J. Immunol., 149:380-388 (1992); Riley and June, Blood, 105:13-21 (2005)]。T細胞受容体(TCR)ライゲーション後、CD28に結合しているB7.1/B7.2は、重要な共刺激シグナルをT細胞に提供して、T細胞の活性化とそれに続く免疫応答の発生を可能にする[Reiser et al., PNAS, 89:271-275 (1992); Jenkins et al., J. Immunol., 147:2461-2466 (1991)]。CD28シグナルの非存在下では、T細胞はアポトーシスを起こすか又は無反応状態になることが示されている[Jenkins et al., J. Exp. Med. 165:302-319 (1987); Jenkins et al., PNAS, 84:5409-5413 (1987); Schwartz, Science, 248:1349-1356 (1990)]。CD28-B7.1/B7.2結合は、活性化に必要なTCRライゲーションの閾値レベル(例えば、抗原-MHC複合体の量)を変化させ、ナイーブ細胞を刺激するのに必要な時間を短縮し、T細胞応答の大きさを高めることができる[Soskic et al., Advances in Immunology, 124:96-123 (2014)]。

#### 【0008】

CTLA-4(CD152)も、Igスーパーファミリーのメンバーであり、そして、単一の細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び短い細胞質尾部で構成されている[Swanson, Immunology; 1010:169-177 (2000)]。さらに、CTLA-4は、CD28と約30%のアミノ酸同一性を共有している。CTLA-4は、ナイーブT細胞では構成的に発現しないが、CD28ライゲーションとT細胞活性化の直後に急速にアップレギュレーションされ、最初のT細胞活性化後約48~96時間でCTLA-4の発現レベルがピークになる[Alegre et al., J. Immunol., 157:4762-4770 (1996); Freeman et al., J. Immunol., 149:3795-3801 (1992)]。CTLA-4は、CD28よりも極めて高い親和性でB7.1及びB7.2の両方に結合する[van der Merwe et al., J. Exp. Med., 185:393-402 (1997)]。しかしながら、CD28結合B7.1又はB7.2の刺激効果とは対照的に、CTLA-4は、免疫応答のダウンモジュレーションに不可欠な抑制性受容体として機能する[Walnut et al., Immunity, 1:405-413 (1994); Walnut, J. Exp. Med., 183:2541-2550 (1996); Krummel and Allison, J. Exp. Med., 183:2533-2540 (1996)]。CTLA-4がその免疫抑制機能を媒介する機序は、CD28とB7.1/B7.2の間の相互作用の競合的阻害剤として作用する能力に関連している[「Swanson, Immunology, 1010:169-177 (2000)」において概説されている]。免疫ダウンレギュレーションにおけるCTLA-4の重要な役割は、CTLA-4欠損マウスで実証され

10

20

30

40

50

ている。そのCTLA-4欠損マウスは、複数の臓器へのT細胞浸潤を特徴とするリンパ増殖性疾患の発症により3～5週齢で死亡する[Tivol et al., *Immunity*, 3:541-5417 (1995); Waterhouse et al., *Science*, 270:985-988 (1995)]。CTLA-4ノックアウトの結果は、CTLA-4/B7.1/B7.2トリプルノックアウトマウスでは疾患がないことによって示されるように、CD28とそのリガンドであるB7.1及びB7.2との相互作用に依存することも実証された[Mandelbrot et al., *J. Exp. Med.*, 189:435-440 (1999)]。このことは、CTLA-4IgをCTLA-4ノックアウトマウスに繰り返し投与することによってもたらされるリンパ増殖に対する保護によっても確認されている[Tivol et al., *J. Immunol.*, 158:5091-5094 (1997)]。

10

#### 【0009】

さらに、CTLA-4の効果を抗体でブロックすると、インビトロ及びインビボでのT細胞応答が増強され、抗腫瘍免疫応答が増大することが示されている[Leach et al., *Science*, 271:1734-1736 (1996)]。これらの知見に基づいて、癌を治療するための治療モダリティを提供するために、モノクローナル抗体などのCTLA-4ブロッカーの開発が行われた[Hodi et al., *PNAS*, 100(8):4712-4717 (2003); Phan GQ et al., *PNAS*, 100(14):8372-8377 (2003); Attia, *Journal of Clinical Oncology*, 23(25):6043-6053 (2005); Comin-Anduix et al., *Journal of Translational Medicine*, 6:22-22 (2008); WO2000037504A2; U.S. 8,017,114B2; WO2010097597A1; WO2012120125A1; 及び, Boutros et al., *Nat Rev Clin Oncol.*, 13(8):473-486 (2016)]。

20

#### 【0010】

PD-1は、免疫調節受容体のCD28/CTLA-4ファミリーのメンバーである。PD-1は、さらに、Igスーパーファミリーのメンバーでもあり、そして、そのリガンドに結合する細胞外可変ドメイン及びシグナル伝達分子に結合する細胞質尾部を含んでいる[「Zak et al., *Cell Structure*, 25:1163-1174 (2017)」において概説されている]。PD-1の細胞質尾部は、2つのチロシンベースのシグナル伝達モチーフを含んでいる[Zhang et al., *Immunity* 20:337-347 (2004)]。PD-1の発現は、刺激されていないT細胞、B細胞又は骨髄細胞では見られない。しかしながら、PD-1の発現は、活性化後にこれらの細胞でアップレギュレーションされる[Chemnitz et al., *J. Immunol.*, 173:945-954 (2004); Petrvas et al., *J. Exp. Med.*, 203:2281-2292 (2006)]。PD-1は、CTLA-4と最も密接に関連しており、約24%のアミノ酸同一性を共有している[Jin et al., *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 350:17-37 (2010)]。PD-1は、APCの表面において発現するPD-L1及びPD-L2に結合すると、T細胞の活性化を低減させる。これらのリガンドのいずれかがPD-1に結合すると、T細胞受容体(TCR)を介した抗原シグナル伝達が負に調節される。今日まで、PD-L1とPD-L2のみがPD-1に対するリガンドとして機能することがわかっている。CTLA-4の場合と同様に、PD-1ライゲーションは負の免疫調節シグナルを伝達するように見える。PD-L1又はPD-L2によるPD-1のライゲーションは、TCRを介した増殖及びサイトカイン産生の阻害をもたらす[Jin et al., *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 350:17-37 (2010)]。CTLA-4欠損動物とは対照的に、PD-1欠損マウスは、生涯のかなり後のほうで死亡し、そして、自己免疫の兆候を示すが、観察さ

30

40

50

れた影響の重症度は、CTLA-4欠損動物が示すほど深刻ではない[Nishimura et al., Immunity, 11(2):141-151 (1999); Nishimura et al., Science, 291(5502):319-322 (2001)]。PD-1シグナル伝達経路は現在集中的に研究されているが、これまでの研究は、PD-L1/PD-L2/PD-1相互作用が、TCR刺激の下流のシグナルを減少させ、そのことが、サイトカイン分泌の低減及びT細胞増殖の機能障害及びT細胞による細胞毒性分子の産生の低減をもたらすので、一部の免疫応答の負の調節に關与していることを示唆している[Freeman et al., J. Exp. Med., 192(7):1027-1034 (2000)]。

#### 【0011】

PD-L1(CD274)は、1型膜タンパク質であり、そして、IgV様細胞外ドメイン及びIgC様細胞外ドメイン、疎水性膜貫通ドメイン並びにシグナル伝達特性が不明な30アミノ酸からなる短い細胞質尾部で構成されている。PD-L1は、B7ファミリーのメンバーとして認識されており、B7ファミリーのメンバーと約20%のアミノ酸同一性を共有している。PD-L1は、活性化T細胞、B細胞及び骨髓細胞で見られる受容体PD-1に結合する。PD-L1は、共刺激分子B7.1にも結合するが、CD86には結合しない[Butte et al., Immunology, 45(13):3567-3572 (2008)]。B7.1のPD-L1に対する親和性は、CD28及びCTLA-4に対する親和性の中間である。関連分子PD-L2は、CD80又はCD86のいずれにも親和性を有さないが、受容体としてPD-1を共有している。PD-L1がT細胞上のその受容体PD-1に結合すると、TCRが介在するIL-2産生とT細胞増殖を阻害するシグナルが送達される。PD-1に結合するPD-L1は、ナイーブT細胞への抗原提示中にリガンド誘導性のTCRダウンモジュレーションにも寄与する。さらに、PD-L1がT細胞上のB7.1に結合すると、T細胞のアポトーシスが起る。T細胞活性化の阻害剤としてのPD-1及びPD-L1の役割は、多くの研究で実証されている。これらの知見に基づいて、癌及び感染症を治療するための治療モダリティを提供するために、モノクローナル抗体などのPD-1及びPD-L1ブロッカーの開発が行われた。

#### 【0012】

イヌPD-1、PD-L1及びCTLA-4の結合と活性をブロックするヒト化モノクローナル抗体が開発され、現在、いくつかの異なるタイプの癌のうちの1つと診断されたヒト対象者の治療において使用することが可能である。同様に、イヌPD-1及びPD-L1の結合と活性をブロックするイヌ化モノクローナル抗体も報告されている[U.S. 9,944,704 B2, U.S. 10,106,607 B2及びU.S. 2018/0237535 A1;これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる]。しかしながら、これまで、イヌCTLA-4の結合と活性をブロックするイヌ化モノクローナル抗体は報告されていない。

#### 【0013】

本明細書中における参考文献の引用は、いずれも、そのような参考文献が本出願に対する「先行技術」として利用可能であることを承認するものと解釈されるべきではない。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0014】

【文献】WO2000037504 A2

【文献】U.S. 8,017,114 B2

【文献】WO2010097597 A1

【文献】WO2012120125 A1

【文献】U.S. 9,944,704 B2

【文献】U.S. 10,106,607 B2

【文献】U.S. 2018/0237535 A1

10

20

30

40

50

## 【非特許文献】

【0015】

【文献】Sharpe and Freeman, Nature Reviews, 2 : 116 - 126 (2002)

【文献】Swanson and Hall, Eur J. Immunol., 23 : 295 - 298 (1993)

【文献】Razi-Wolfe et al., PNAS, 89 : 4210 - 4214 (1992)

【文献】Larsen et al., Immunol., 152 : 5208 - 5219 (1994)

10

【文献】Inaba, J. Exp. Med. 180 : 1849 - 1860 (1994)

【文献】Linsley et al., PNAS, 87 : 5031 - 5035 (1990)

【文献】Linsley et al., J. Exp. Med., 173 : 721 - 730 (1991)

【文献】Azuma et al., Nature 366 : 76 - 79 (1993)

【文献】Freeman et al., Science 262 : 909 - 912 (1993)

【文献】van der Merwe, J. Exp. Med. 185 : 393 - 402 (1997)

20

【文献】Aruffo and Seed, PNAS, 84 : 8573 - 8577 (1987)

【文献】Riley and June, Blood, 105 : 13 - 21 (2005)

【文献】Sharpe and Freeman, Nat. Rev. Immunol., 2 : 116 - 126 (2002)

【文献】Gross et al., J. Immunol., 149 : 380 - 388 (1992)

【文献】Riley and June, Blood, 105 : 13 - 21 (2005)

【文献】Reiser et al., PNAS, 89 : 271 - 275 (1992)

【文献】Jenkins et al., J. Immunol., 147 : 2461 - 2466 (1991)

30

【文献】Jenkins et al., J. Exp. Med. 165 : 302 - 319 (1987)

【文献】Jenkins et al., PNAS, 84 : 5409 - 5413 (1987)

【文献】Schwartz, Science, 248 : 1349 - 1356 (1990)

【文献】Soskic et al., Advances in Immunology, 124 : 96 - 123 (2014)

【文献】Swanson, Immunology; 1010 : 169 - 177 (2000)

40

【文献】Alegre et al., J. Immunol., 157 : 4762 - 4770 (1996)

【文献】Freeman et al., J. Immunol., 149 : 3795 - 3801 (1992)

【文献】van der Merwe et al., J. Exp. Med., 185 : 393 - 402 (1997)

【文献】Walnut et al., Immunity, 1 : 405 - 413 (1994)

【文献】Walnut, J. Exp. Med., 183 : 2541 - 2550 (

50

1996)

【文献】Krummel and Allison, J. Exp. Med., 183: 2533 - 2540 (1996)

【文献】Swanson, Immunology, 1010: 169 - 177 (2000)

【文献】Tivol et al., Immunity, 3: 541 - 5417 (1995)

【文献】Waterhouse et al., Science, 270: 985 - 988 (1995)

【文献】Mandelbrot et al., J. Exp. Med., 189: 35 - 440 (1999)

【文献】Tivol et al., J Immunol., 158: 5091 - 5094 (1997)

【文献】Leach et al., Science, 271: 1734 - 1736 (1996)

【文献】Hodi et al., PNAS, 100(8): 4712 - 4717 (2003)

【文献】Phan GQ et al., PNAS, 100(14): 8372 - 8377 (2003)

【文献】Attia, Journal of Clinical Oncology, 23(25): 6043 - 6053 (2005)

【文献】Comin-Anduix et al., Journal of Translational Medicine, 6: 22 - 22 (2008)

【文献】Boutros et al., Nat Rev Clin Oncol., 13(8): 473 - 486 (2016)

【文献】Zak et al., Cell Structure, 25: 1163 - 1174 (2017)

【文献】Zhang et al., Immunity 20: 337 - 347 (2004)

【文献】Chemnitz et al., J. Immunol., 173: 945 - 954 (2004)

【文献】Petrvas et al., J. Exp. Med., 203: 2281 - 2292 (2006)

【文献】Jin et al., Current Topics in Microbiology and Immunology, 350: 17 - 37 (2010)

【文献】Jin et al., Current Topics in Microbiology and Immunology, 350: 17 - 37 (2010)

【文献】Nishimura et al., Immunity, 11(2): 141 - 151 (1999)

【文献】Nishimura et al., Science, 291(5502): 319 - 322 (2001)

【文献】Freeman et al., J. Exp. Med., 192(7): 1027 - 1034 (2000)

【文献】Butte et al., Immunology, 45(13): 3567 - 3572 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、イヌCTLA-4に対して特異的な結合親和性を有し、並びに、イヌCTLA-4のイヌCD80及び/又はCD86への結合をブロックする能力を有している、イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体に関する。本発明は、さらに、癌などの疾患及び/又は感染

10

20

30

40

50



症に起因する疾患の処置におけるそのような抗体の使用にも関する。

【 0 0 1 7 】

従って、本発明は、C T L A - 4 に特異的に結合する、イヌ I g G 重鎖及びイヌカッパ又はラムダ軽鎖を含んでいる単離されたイヌ化抗体又は該イヌ化抗体の抗原結合フラグメントを提供する。このタイプの特定の実施形態では、該イヌカッパ又はラムダ軽鎖は、3つの軽鎖相補性決定領域 ( C D R ) [ 即ち、C D R 軽 1 ( C D R L 1 )、C D R 軽 2 ( C D R L 2 ) 及び C D R 軽 3 ( C D R L 3 ) ] を含んでおり、及び、該イヌ I g G 重鎖は、3つの重鎖 C D R [ 即ち、C D R 重 1 ( C D R H 1 )、C D R 重 2 ( C D R H 2 ) 及び C D R 重 3 ( C D R H 3 ) ] を含んでおり、ここで、該 6 つ全ての C D R は哺乳動物 C T L A - 4 抗体から得られた。本発明のイヌ化抗体及びそのフラグメントの特定の実施形態は、イヌ C T L A - 4 に結合し、並びに / 又は、イヌ C T L A - 4 のイヌ C D 8 0 及び / 若しくは C D 8 6 への結合をブロックする。

10

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態において、該イヌ化抗体の C D R L 1 は、配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含んでおり、C D R L 2 は、配列番号 5 6 を含むアミノ酸配列を含んでおり、及び、C D R L 3 は、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含んでいる。関連する実施形態では、該イヌ化抗体の C D R H 1 は、配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含んでおり、C D R H 2 は、配列番号 5 0 を含むアミノ酸配列を含んでおり、及び、C D R H 3 は、配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含んでいる。

20

【 0 0 1 9 】

特定の実施形態では、該イヌ化抗体の C D R L 1 は、配列番号 5 3 のヌクレオチド配列によってコード化され、C D R L 2 は、配列番号 5 5 のヌクレオチド配列によってコード化され、及び、C D R L 3 は、配列番号 5 7 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該イヌ化抗体の C D R H 1 は、配列番号 4 7 のヌクレオチド配列によってコード化され、C D R H 2 は、配列番号 4 9 のヌクレオチド配列によってコード化され、及び、C D R H 3 は、配列番号 5 1 のヌクレオチド配列によってコード化される。

【 0 0 2 0 】

より特定の実施形態では、該イヌ化抗体の C D R L 1 は、配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含んでおり、C D R L 2 は、配列番号 5 6 を含むアミノ酸配列を含んでおり、及び、C D R L 3 は、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含んでおり、加えて、該イヌ化抗体の C D R H 1 は、配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含んでおり、C D R H 2 は、配列番号 5 0 を含むアミノ酸配列を含んでおり、及び、C D R H 3 は、配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含んでいる。

30

【 0 0 2 1 】

本発明の特定の実施形態では、該イヌ化抗体の重鎖は、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該重鎖は、配列番号 3 3 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該重鎖は、配列番号 3 4 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 4 8、配列番号 5 0 及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該重鎖は、配列番号 3 4 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 4 8、配列番号 5 0 及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含んでいる。

40

【 0 0 2 2 】

さらに他の実施形態では、該イヌ化抗体の重鎖は、配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該重鎖は、配列番号 3 5 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該重鎖は、配列番号 3 6 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 4 8、配列番号 5 0 及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該重鎖は、配列番号 3 6 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 4 8、配列番号 5 0 及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含んでいる。

【 0 0 2 3 】

50

さらに他の実施形態では、該イヌ化抗体の重鎖は、配列番号 38 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該重鎖は、配列番号 37 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該重鎖は、配列番号 38 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該重鎖は、配列番号 38 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0024】

さらに他の実施形態では、該イヌ化抗体の重鎖は、配列番号 40 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該重鎖は、配列番号 39 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該重鎖は、配列番号 40 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該重鎖は、配列番号 40 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0025】

本発明の特定の実施形態では、該イヌ化抗体の重鎖は、配列番号 60 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該重鎖は、配列番号 59 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該重鎖は、配列番号 60 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該重鎖は、配列番号 60 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0026】

さらに他の実施形態では、該イヌ化抗体の重鎖は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該重鎖は、配列番号 61 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該重鎖は、配列番号 62 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該重鎖は、配列番号 62 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0027】

さらに他の実施形態では、該イヌ化抗体の重鎖は、配列番号 64 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該重鎖は、配列番号 63 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該重鎖は、配列番号 64 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該重鎖は、配列番号 64 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0028】

さらに他の実施形態では、該イヌ化抗体の重鎖は、配列番号 66 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該重鎖は、配列番号 65 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該重鎖は、配列番号 66 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該重鎖は、配列番号 66 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0029】

特定の実施形態では、該イヌ化抗体のイヌ軽鎖は、カッパ鎖である。代替的な実施形態では、該イヌ軽鎖は、ラムダ鎖である。特定の実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 42 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 41 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 42 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 54、配列番号 56 及び配列番号 58 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 42 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 54、配列番号 56

及び配列番号 58 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0030】

特定の実施形態では、該イヌ化抗体のカッパ軽鎖は、配列番号 44 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 43 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 44 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 54、配列番号 56 及び配列番号 58 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 44 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 54、配列番号 56 及び配列番号 58 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0031】

さらに他の実施形態では、該イヌ化抗体のカッパ軽鎖は、配列番号 46 のアミノ酸配列を含んでいる。より特定の実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 45 のヌクレオチド配列によってコード化される。関連する実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 46 のアミノ酸配列の保存的変異体内に、配列番号 54、配列番号 56 及び配列番号 58 のアミノ酸配列を含んでいる。さらに他の実施形態では、該カッパ軽鎖は、配列番号 46 のアミノ酸配列の機能保存された変異体内に、配列番号 54、配列番号 56 及び配列番号 58 のアミノ酸配列を含んでいる。

【0032】

本発明はさらに、本発明の任意の軽鎖と本発明の任意の重鎖とを含んでいるイヌ化抗体を提供する。特定の実施形態では、該単離されたイヌ化抗体は、配列番号 36、配列番号 62 のアミノ酸配列又は配列番号 36 若しくは配列番号 62 のアミノ酸配列の保存的変異体内の配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含む重鎖、並びに、配列番号 46 のアミノ酸配列又は配列番号 46 のアミノ酸配列の保存的変異体内の配列番号 54、配列番号 56 及び配列番号 58 のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を含むカッパ軽鎖、を含んでいる。より特定の実施形態では、単離されたイヌ化抗体は、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 46 のアミノ酸配列を含むカッパ軽鎖を含んでいる。他の特定の実施形態では、単離されたイヌ化抗体は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 46 の配列のアミノ酸配列を含むカッパ軽鎖を含んでいる。

【0033】

他の特定の実施形態では、該単離されたイヌ化抗体は、配列番号 40、配列番号 66 のアミノ酸配列又は配列番号 40 若しくは配列番号 66 のアミノ酸配列の保存的変異体内の配列番号 48、配列番号 50 及び配列番号 52 のアミノ酸配列を含む重鎖、並びに、配列番号 42 のアミノ酸配列又は配列番号 42 のアミノ酸配列の保存的変異体内の配列番号 54、配列番号 56 及び配列番号 58 のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を含むカッパ軽鎖、を含んでいる。より特定の実施形態では、単離されたイヌ化抗体は、配列番号 40 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 42 のアミノ酸配列を含むカッパ軽鎖を含んでいる。他の特定の実施形態では、単離されたイヌ化抗体は、配列番号 66 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 42 の配列のアミノ酸配列を含むカッパ軽鎖を含んでいる。

【0034】

本発明は、さらに、本発明のイヌ化抗体の軽鎖のうちのいずれか 1 つをコード化する単離された核酸を提供する。同様に、本発明は、さらに、本発明のイヌ化抗体の重鎖のうちのいずれか 1 つをコード化する単離された核酸を提供する。本発明は、さらに、本発明の単離された核酸のうちの 1 以上を含んでいる発現ベクターを提供する。本発明は、さらに、本発明の 1 以上の発現ベクターを含んでいる宿主細胞を提供する。

【0035】

特定の実施形態では、該抗体は、組換え抗体又はその抗原結合フラグメントである。関連する実施形態では、該可変重鎖ドメイン及び可変軽鎖ドメインは、可動性リンカーで連結されていて、単鎖抗体を形成している。

【0036】

特定の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、F a b フラグメントである

10

20

30

40

50

。別の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントはF a b ' フラグメントである。別の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、( F a b ' )<sub>2</sub>フラグメントである。さらに別の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、ダイアボディである。特定の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、ドメイン抗体である。より特定の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、イヌ化単ドメイン抗体である。

【 0 0 3 7 】

特定の実施形態では、該イヌ化抗ヒトC T L A - 4 抗体又は抗原結合フラグメントは、処置されているイヌ対象者の免疫応答を増大させる。

【 0 0 3 8 】

従って、本発明は、さらに、本明細書中に開示されているイヌ化抗ヒトC T L A - 4 抗体又は抗原結合フラグメントをコード化する単離された核酸を提供する。関連する実施形態では、そのような抗体又は抗原結合フラグメントは、イヌ対象者の癌を処置するための薬剤の調製に使用することができる。代替的に又は組み合わせて、本発明は、診断的使用のための本発明の抗体又は抗体フラグメントのいずれかの使用を提供する。さらに追加の実施形態では、本明細書中に開示されているイヌ化抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかを含んでいるキットが提供される。

【 0 0 3 9 】

さらに追加の実施形態では、本発明のイヌ化抗ヒトC T L A - 4 抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかをコード化する単離された核酸を含んでいる発現ベクターが提供される。本発明は、さらに、本明細書中に記載されている発現ベクターのいずれかを含んでいる宿主細胞に関する。特定の実施形態では、本発明のこれらの核酸、発現ベクター又はポリペプチドは、抗体を作製する方法において有用である。

【 0 0 4 0 】

本発明は、さらに、本発明のイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメントを薬学的に許容される担体又は希釈剤と一緒に含んでいる医薬組成物を包含する。さらに、本発明は、免疫細胞の活性を増大させる方法を提供し、ここで、該方法は、それを必要とする対象者に、治療有効量の本発明の該医薬組成物を投与することを含んでいる。特定の実施形態では、該対象者は、イヌである。代替的な実施形態では、該対象者は、ネコである。さらに他の実施形態では、該対象者は、馬である。特定の実施形態では、該方法は、癌の処置に使用される。別の実施形態では、該方法は、感染症又は感染性疾患の処置において使用される。さらに別の実施形態では、本発明のイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメントは、ワクチンアジュバントとして使用される。

【 0 0 4 1 】

本発明のこれらの態様及び別の態様は、以下の「図面の簡単な説明」及び「詳細な説明」を参照することによって、よりよく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 2 】

【図 1】図 1 は、示されている一連の選択されたキメラ抗体に関するイヌC T L A - 4 を使用したE L I S Aの結果を示しており、それらの結合活性を実証している： 3 B 1 0、 8 H 5、 6 1 1、 1 0 D 1、 3 B 3、 4 1 8、 4 1 1、 1 E 2、及び、I s o - 対照。個々のキメラ抗体は、下記表 1 に記載されている。I s o - 対照は、C T L A - 4 とは無関係の抗原に対するイヌ化マウス抗体である。

【図 2】図 2 は、示されている一連のイヌ化3 B - 1 0 抗体のE L I S Aの結果を示しており、イヌ化3 B - 1 0 抗体がイヌC T L A - 4 に強く結合することを実証している：

3 B 1 0 M C、 c 3 B 1 0 L 2 - H 3、 c 3 B 1 0 L 3 - H 3、 c 3 B 1 0 L 2 - H 2、 c 3 B 1 0 L 3 - H 2、 c 3 B 1 0 L 3 - H 4、及び、 c 3 B 1 0 L 1 - H 1。L 1、L 2 及びL 3 は、それぞれ、下記表 5 におけるV L 1、V L 2 及びV L 3 に対応しており、並びに、H 1、H 2、H 3 及びH 4 は、それぞれ、下記表 4 におけるV H 1、V H 2、V H 3 及びV H 4 に対応している。3 B 1 0 M C は、図 1 に示されているものと同じキメラ抗体である。

10

20

30

40

50

【図 3】図 3 は、キメラ又はイヌ化 3 B 1 0 抗体の存在下における、イヌ C D 8 6 及びイヌ C T L A - 4 を用いた E L I S A の結果を示している： 3 B 1 0 M C、 c 3 B 1 0 L 1 - H 1、 c 3 B 1 0 L 3 - H 2、 c 3 B 1 0 L 3 - H 4、及び、I s o - 対照。該結果は、キメラ及びイヌ化 3 B 1 0 抗体の両方のイヌ C T L A - 4 とイヌ C D 8 6 の結合相互作用に対する抗体のプロック活性を示している。I s o - 対照は、C T L A - 4 とは無関係の抗原に対するイヌ化マウス抗体である。

【図 4】図 4 は、[ 1 E 2、3 B 1 0、1 0 D 1、8 H 5、6 1 1、4 1 1 及び 4 1 8 ] で示され、及び、上記図 1 で説明されている、選択された C T L A - 4 キメラ抗体による活性化後にイヌ P B M C によってもたらされる I F N 産生を示している。

【図 5】図 5 は、イヌ化 3 B 1 0 L 3 H 2 ( 3 B 1 0 V L 3 V H 2 ) 抗体と相互作用する、従来技術 ( 配列番号 6 8 ) のアミノ酸配列を含んでいるイヌ C T L A - 4 のエピトープを特定している。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 3 】

略語

本発明の詳細な説明及び実施例を通して、以下の略語が使用される。

20

30

40

50

## 【表 1】

ADCC	抗体依存性細胞障害	
CDC	補体依存性細胞障害	
CDR	Kabat ナンバリングシステムを使用して定義された免疫グロブリン 可変領域内の相補性決定領域	
CHO	チャイニーズハムスター卵巣	
EC50	50% の効力又は結合を生じさせる濃度	10
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ	
FR	抗体フレームワーク領域：CDR 領域を除く免疫グロブリン可変領域	
HRP	西洋ワサビペルオキシダーゼ	
IFN	インターフェロン	
IC50	50% の阻害を生じさせる濃度	
IgG	免疫グロブリン G	
Kabat	Elvin A. Kabat [ <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] によって開発された免疫グロブリンアラインメント及び ナンバリングシステム	20
mAb	モノクローナル抗体 (Mab 又は MAb とも略される)	
MES	2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸	
MOA	作用機構	
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	30
PK	薬物動態	
SEB	ブドウ球菌エンテロトキシン B	
TT	破傷風トキソイド	
V 領域	異なる抗体の間で配列が可変である IgG 鎖のセグメント 軽鎖内の Kabat 残基 109 及び重鎖内の Kabat 残基 113 にまで及ぶ	
VH	免疫グロブリン重鎖可変領域	
VK	免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域	40

## 【 0 0 4 4 】

## 定義

本発明をより容易に理解することができるように、特定の技術用語及び科学用語を以下で明確に定義する。本明細書中の別の箇所で明確に定義されていない限り、本明細書中で使用されている他の全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味を有する。

## 【 0 0 4 5 】

添付されている「特許請求の範囲」を包含する本明細書中で使用されている場合、「a」、「an」及び「the」などの単語の単数形は、文脈によって別途明瞭に示されてい

ない限り、それらの対応する複数の言及を包含する。

【 0 0 4 6 】

細胞又は受容体に適用される「活性化」は、文脈によって又は明示的に別途示されていない限り、リガンドによる細胞又は受容体の活性化又は処置を意味する。「リガンド」は、天然リガンド及び合成リガンド、例えば、サイトカイン、サイトカイン変異体、類似体、突然変異タンパク質及び抗体由来の結合性化合物を包含する。「リガンド」は、さらに、小分子、例えば、サイトカインのペプチドミメティック及び抗体のペプチドミメティックも包含する。「活性化」は、内部機構によって調節される細胞活性化及び外部要因又は環境因子によって調節される細胞活性化を意味することができる。

【 0 0 4 7 】

分子の「活性」は、以下のものについて表す又は示すことができる： リガンド若しくは受容体への当該分子の結合、触媒活性； 遺伝子発現又は細胞のシグナル伝達、分化若しくは成熟を刺激する能力； 抗原活性、他の分子の活性の調節など。分子の「活性」は、さらに、以下のものについても示すことができる： 細胞間相互作用（例えば、接着）を調節する若しくは維持することにおける活性、又は、細胞の構造（例えば、細胞膜又は細胞骨格）を維持することにおける活性。「活性」は、さらに、以下のものも意味することができる： 比活性、例えば、[ 触媒活性 ] / [ m g タンパク質 ] 又は [ 免疫学的活性 ] / [ m g タンパク質 ]、生物学的区画内の濃度など。「活性」は、先天性免疫系又は適応免疫系の成分の調節も示すことができる。

【 0 0 4 8 】

「投与」及び「処置 ( t r e a t m e n t ) 」は、動物（例えば、イヌ実験対象者）、細胞、組織、器官又は生体液に適用される場合、動物（例えば、イヌ対象者）、細胞、組織、器官又は生体液への外因性医薬、治療薬、診断薬又は組成物の接触を示している。細胞の処置は、細胞への試薬の接触及び体液への試薬の接触（ここで、該体液が細胞と接触する）を包含する。

【 0 0 4 9 】

「投与」及び「処置」は、さらに、試薬、診断薬、結合性化合物による、又は、別の細胞による、例えば細胞の、インビトロ処置及びエクスピボ処置も意味する。用語「対象者 ( s u b j e c t ) 」は、任意の生物を包含し、好ましくは、動物を包含し、より好ましくは、哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ又はウマ）包含し、最も好ましくは、イヌを包含する。

【 0 0 5 0 】

「処置する ( t r e a t ) 」又は「処置すること ( t r e a t i n g ) 」は、治療薬（例えば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントのいずれかを含んでいる組成物）を、その治療薬が治療活性を有する 1 以上の疾患症状を有している又は疾患に罹患していることが疑われる例えばイヌ対象者又は患者に、内部に又は外部から投与することを意味する。典型的には、該治療薬は、臨床的に測定可能な程度に（ 1 又は複数の ）症状の後退を誘導する又は（ 1 又は複数の ）症状の進行を阻止することによって、処置される対象者又は集団におけるそのような 1 以上の疾患症状を軽減する及び / 又は改善するのに有効な量で投与される。特定の疾患症状を軽減するのに有効な治療薬の量（「治療有効量」とも称される）は、患者（例えば、イヌ、ネコ又はウマ）の疾患の状態、年齢及び体重、並びに、対象者において所望の応答を引き出す当該医薬組成物の能力などの因子に応じて異なり得る。疾患症状が軽減又は改善されたかどうかは、その症状の重症度又は進行状態を評価するために獣医師又は別の熟達した医療提供者によって典型的に使用される任意の臨床測定によって評価することができる。本発明（例えば、処置方法又は製造品）の実施形態は、全ての対象者における（ 1 又は複数の ）標的疾患症状を軽減させることにおいて有効であるとは限らないかもしれないが、当技術分野で既知の任意の統計的検定（例えば、スチューデント t 検定、カイ二乗検定、マン - ホイットニーの U 検定、クラスカル - ウォリス検定（ H 検定）、ボンフェローニ - タブストラ検定及びウィルコクソン検定）によって決定される、統計的に有意の数の対象者における（ 1 又は複数の ）標的疾患症状を軽減するはずである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 1 】

「処置」は、ヒト対象者、獣医学対象者（例えば、イヌ）又は研究用対象者に適用される場合、治療的処置並びに研究用途及び診断用途を示している。「処置」は、ヒト対象者、獣医学対象者（例えば、イヌ）若しくは研究用対象者、又は、細胞、組織若しくは器官に適用される場合、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントを例えばイヌ若しくは他の動物対象者（例えば、ネコ）、細胞、組織、生理学的区画又は生理学的流体に接触させることを包含する。

## 【 0 0 5 2 】

用語「免疫応答」は、例えば、癌細胞、病原体に感染した細胞若しくは組織又は侵入する病原体への選択的損傷、それらの破壊又はそれらの哺乳動物身体（例えば、イヌ身体）からの除去をもたらす、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球及び前記細胞又は肝臓によって産生される可溶性高分子（例えば、抗体、サイトカイン及び補体）の作用を示している。

## 【 0 0 5 3 】

イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体

本発明は、イヌCTLA-4に結合する単離されたイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメント及びそのような抗体又はそのフラグメントの使用を提供する。

## 【 0 0 5 4 】

本明細書中で使用されている場合、イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体は、哺乳動物CTLA-4に特異的に結合するイヌ化抗体を示している。哺乳動物CTLA-4（特に、イヌCTLA-4）に特異的に結合する抗体は、他の抗原と比較して哺乳動物CTLA-4への優先的な結合を示す抗体であるが、この特異性は、絶対的な結合特異性を必要としない。イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体は、その結合がイヌから得られる生物学的サンプルの中のイヌCTLA-4の存在を決定する場合、又は、それがイヌサンプル中の他の関連しないイヌタンパク質の活性を過度に妨げることなく（例えば、診断状況における偽陽性又は治療状況での副作用などの望ましくない結果を生じさせることなく）イヌCTLA-4の活性を変化させることができる場合、イヌCTLA-4に「特異的」と見なされる。イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体に必要な特異性の程度は、その抗体の意図される用途に依存してよく、いずれにせよ、意図される目的のための使用への適切性によって定義される。意図される方法の抗体又は抗体の抗原結合部位に由来する結合性化合物は、その抗原又はその変異体若しくは突然変異タンパク質に、他の任意のイヌ抗原との親和性と比較して、少なくとも2倍大きい、好ましくは、少なくとも10倍大きい、さらに好ましくは、少なくとも20倍大きい、最も好ましくは、少なくとも100倍大きい親和性で結合する。しかしながら、イヌCTLA-4に特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原、特に、ネコCTLA-4、ウマCTLA-4及びノ又はヒトCTLA-4などの密接に関連する抗原と交差反応し得る。

## 【 0 0 5 5 】

本明細書中で使用されている場合、抗体は、イヌCTLA-4の酸配を含んでいるポリペプチドには結合するが、イヌCTLA-4のアミノ酸配列を欠いている別のイヌタンパク質が存在したとしても、そのようなタンパク質のどこにも全く結合しない場合、所与の配列（この場合、イヌCTLA-4）を含んでいるポリペプチドに特異的に結合すると言われる。例えば、イヌCTLA-4を含んでいるポリペプチドに特異的に結合する抗体は、イヌCTLA-4のFLAG（登録商標）タグ付き形態には結合し得るが、別のFLAG（登録商標）タグ付きイヌタンパク質に特異的には結合しない。

## 【 0 0 5 6 】

本明細書中で使用されている場合、別途示されていない限り、「抗体フラグメント」又は「抗原結合フラグメント」は、抗体の抗原結合フラグメント、即ち、完全長抗体によって結合される抗原（例えば、イヌCTLA-4）に特異的に結合する能力を保持する抗体フラグメント（例えば、1以上のCDR領域を保持するフラグメント）を示している。抗原結合フラグメントの例としては、限定するものではないが、以下のものを挙げることが

10

20

30

40

50



できる：F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>及びF vフラグメント；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子、例えば、s c - F v；ナノボディ、及び、抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体。

【 0 0 5 7 】

典型的には、本発明のイヌ化抗体又はその抗原結合フラグメントは、そのイヌC T L A - 4 結合活性がモルベースで表される場合、その活性の少なくとも1 0 %（その対応する親抗体と比較した場合）を保持している。好ましくは、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、親抗体としてのイヌC T L A - 4 結合親和性の少なくとも2 0 %、5 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %又は1 0 0 %又はそれ以上を保持している。

【 0 0 5 8 】

本発明は、定義されたアミノ酸配列を有する抗体の「保存的変異体 ( c o n s e r v a t i v e v a r i a n t s ) 」と称される抗体を包含する。本明細書中で使用されている場合、「保存的変異体」は、定義されたアミノ酸配列を有する本発明のイヌ化抗体と比較して、それらのアミノ酸配列中に1、2、3又はそれ以上の保存的アミノ酸置換を有している。本発明は、さらに、定義されたアミノ酸配列を有するイヌ化抗体の「機能保存された変異体 ( f u n c t i o n c o n s e r v e d v a r i a n t s ) 」と称される抗体も包含する。本明細書中で使用されている場合、「機能保存された変異体」は、そのイヌ化抗体のアミノ酸配列と比較して、1つ、2つ、3つ又はそれ以上の非保存的アミノ酸置換を有している。用語「保存的変異体」及び「機能保存された変異体」は、本発明の対応するイヌ化抗体のイヌフレーム内におけるアミノ酸残基の変化に関してのみ使用され、該イヌ化抗体の特定のC D Rに関しては使用されない。重要なことに、「保存的変異体」及び/又は「機能保存された変異体」は、定義されたアミノ酸配列を含んでいる本発明の対応するイヌ化抗体の生物学的活性を実質的に変化させない。

【 0 0 5 9 】

「単離された抗体」は、精製状態を示しており、そして、そのような文脈では、当該分子が、別の生物学的分子（例えば、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物）又は別の物質（例えば、細胞デブリ及び増殖培地）を実質的に含んでいないことを意味する。一般に、用語「単離された」は、そのような物質又は水、緩衝剤若しくは塩が本明細書中に記載されている結合性化合物の実験的使用又は治療的使用を実質的に妨げる量で存在していない限り、そのような物質が完全に存在しないこと又は水、緩衝剤若しくは塩が存在しないことを示すことは意図してしない。

【 0 0 6 0 】

各軽鎖/重鎖対の可変領域は、抗体の抗原結合部位を形成する。従って、一般に、完全な抗体は、2つの結合部位を有している。二機能性抗体又は二重特異性抗体における場合を除いて、2つの結合部位は一般に同一である。

【 0 0 6 1 】

典型的には、重鎖と軽鎖の両方の可変ドメインは、比較的保存されたフレームワーク領域 ( F R ) 内に位置している、相補性決定領域 ( C D R ) とも称される3つの超可変領域を含んでいる。該C D Rは、通常、フレームワーク領域に隣接しており、それによって、特定のエピトープへの結合が可能になる。一般に、N末端からC末端まで、軽鎖変ドメイン及び重鎖可変ドメインは、いずれも、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3及びF R 4を含んでいる。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、一般に、以下の定義に従う： S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , K a b a t , e t a l . ; N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M d . , 5<sup>th</sup> e d . , N I H P u b l . N o . 9 1 - 3 2 4 2 ( 1 9 9 1 ) ; K a b a t , A d v . P r o t . C h e m . 3 2 : 1 - 7 5 ( 1 9 7 8 ) ; K a b a t , e t a l . , J . B i o l . C h e m . 2 5 2 : 6 6 0 9 - 6 6 1 6 ( 1 9 7 7 ) ; C h o t h i a , e t a l . , J . M o l . B i o l . 1 9 6 : 9 0 1 - 9 1 7 ( 1 9 8 7 ) o r C h o t h i a , e t a l . , N a t u r e 3 4 2 : 8 7 8 - 8

83 (1989)。

【0062】

本明細書中で使用されている場合、用語「超可変領域」は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を示している。超可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」(即ち、軽鎖可変ドメイン内のCDRL1、CDRL2及びCDRL3、並びに、重鎖可変ドメイン内のCDRH1、CDRH2及びCDRH3)に由来するアミノ酸残基を含んでいる。[配列によって抗体のCDR領域を定義している「Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)」を参照されたい; さらにまた、構造によって抗体のCDR領域を定義している「Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)」も参照されたい]。

10

【0063】

本明細書中で使用されている場合、用語「フレームワーク」又は「FR」残基は、CDR残基として本明細書中で定義されている超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を示している。イヌ化抗体のフレームワークは、イヌのフレームの一部を表している。

【0064】

本明細書中で使用されている場合、用語「イヌ」は、別途示されていない限り、全ての家庭イヌ、イエイヌ(*Canis lupus familiaris*)又はイヌ科イヌ属(*Canis familiaris*)を包含する。

20

【0065】

本明細書中で使用されている場合、用語「ネコ」は、ネコ科(*Felidae*)の任意のメンバーを示している。イエネコ、純血種及び/又は雑種のコンパニオンネコ並びに野生ネコ又は野良ネコは、全て、ネコである。

【0066】

本明細書中で使用されている場合、用語「イヌフレーム」は、本明細書中でCDR残基として定義されている超可変領域残基以外のイヌ抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を示している。イヌ化抗体に関連して、実施形態の大部分において、天然イヌCDRのアミノ酸配列は、両方の鎖内において、対応する異種CDR(例えば、マウス抗体由来のCDR)で置き換えられている。場合により、イヌ抗体の重鎖及び/又は軽鎖は、例えば、以下で論じられているように、イヌ抗体内の異種CDRの立体配座を保存するため及び/又はFc機能を改変するために、いくつかの異種非CDR残基を含有することができる。

30

【0067】

イヌIgGには4種の既知のIgG重鎖サブタイプが存在し、それらは、IgG-A、IgG-B、IgG-C及びIgG-Dと称される。2種の既知の軽鎖サブタイプは、ラムダ及びカッパと称される。

【0068】

イヌ免疫細胞の結合及び活性化に加えて、CTLA-4に対するイヌ抗体又はイヌ化抗体は、2つの付加的な下記属性を有するように設計することも可能である:

40

1. 抗体依存性細胞障害作用(ADCC)及び補体依存性細胞障害作用(CDC)などのエフェクター機能の欠如; 及び、

2. プロテインAクロマトグラフィーに基づくもののような業界標準技術を用いて大規模で容易に精製される。

【0069】

天然に存在するイヌIgGイソタイプはいずれも、両方の基準は満たさない。例えば、IgG-Bは、プロテインAを使用して精製することが可能であるが、高いレベルのADCC活性を有している。他方、IgG-Aは、プロテインAに弱く結合するが、望ましくないADCC活性を示す。さらに、IgG-DはADCC活性を示さないが、IgG-CもIgG-DもプロテインAカラムで精製できない。(IgG-Cは、かなりのADCC

50

活性を示す)。本発明は、この難題を、C T L A - 4 に対して特異的な突然変異イヌ I g G - B 抗体を提供することによって克服する[U . S . 1 0 , 1 0 6 , 6 0 7 B 2 を参照されたい；これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる]。これらの抗体は、いずれも、A D C C などのエフェクター機能を欠いており且つ業界標準のプロテイン A クロマトグラフィーを使用して容易に精製することが可能である。

#### 【 0 0 7 0 】

本明細書中で使用されている場合、用語「イヌ化抗体」は、非イヌ供給源に由来する 3 つの重鎖 C D R 及び 3 つの軽鎖 C D R を含んでいる抗体（例えば、イヌフレーム又は改変されたイヌフレームと一緒の抗ヒト C T L A - 4 抗体）を示している。改変されたイヌフレームは、1 以上のアミノ酸の変化を含んでいる。特定の実施形態では、改変されたイヌフレームは、該イヌ化抗体の有効性をさらに最適化して、例えば、イヌ C T L A - 4 へのその結合を増大させ、並びに / 又は、イヌ C T L A - 4 のイヌ C D 8 0 及び / 若しくはイヌ C D 8 6 への結合をブロックするその能力を増大させる。

#### 【 0 0 7 1 】

「相同性」は、最適に整列させた場合の 2 つのポリヌクレオチド配列間又は 2 つのポリペプチド配列間の配列類似性を示している。比較される 2 つの配列の両方におけるある位置が同じ塩基又はアミノ酸モノマーサブユニットによって占有されている場合、例えば、2 つの D N A 分子の各々におけるある位置がアデニンによって占有されている場合、これらの分子はその位置において相同である。相同性のパーセントは、2 つの配列によって共有される相同な位置の数を、比較した位置の総数で除して、1 0 0 を乗じたものである。例えば、2 つの配列を最適に整列させた場合に 2 つの配列中の 1 0 の位置のうち 6 の位置が一致するか又は相同である場合、その 2 つの配列は 6 0 % 相同である。一般に、そのような比較は、2 つの配列を最大の相同性パーセントが得られるように整列させた場合に行われる。

#### 【 0 0 7 2 】

本明細書中で使用されている場合、1 つのアミノ酸配列は、2 番目のアミノ酸配列に対して、その両方の配列のアミノ酸残基が同一である場合、1 0 0 % 「同一」である、又は、1 0 0 % の「同一性」を示す。従って、あるアミノ酸配列は、2 番目のアミノ酸配列に対して、その 2 つのアミノ酸配列のアミノ酸残基のうちの 5 0 % が同一である場合、5 0 % 「同一」である。配列の比較は、所与のタンパク質（例えば、比較されるポリペプチドの一部又はタンパク質）に含まれるアミノ酸残基の連続するブロックにわたって実施される。特定の実施形態では、2 つのアミノ酸配列の間の対応性を異なるように変化させ得る選択された欠失又は挿入を考慮に入れる。

#### 【 0 0 7 3 】

「単離された核酸分子」は、単離されたポリヌクレオチドが自然界で見出されるポリヌクレオチドの全部又は一部分と結合していない、又は、自然界では連結されていないポリヌクレオチドに連結されている、ゲノム、m R N A 、c D N A 若しくは合成起源の D N A 又は R N A 又はそれらの何らかの組合せを意味する。本開示のために、特定のヌクレオチド配列「を含んでいる核酸分子」は無傷の染色体を包含しないことは、理解されるべきである。指定された核酸配列「を含んでいる」単離された核酸分子は、指定された配列に加えて、1 0 個まで又はさらには 2 0 個まで又はそれ以上の他のタンパク質又はその部分若しくはフラグメントについてのコード配列を含むことができ、又は、記載されている核酸配列のコード領域の発現を制御する作動可能に連結された調節配列を含むことができ、及び / 又は、ベクター配列を含むことができる。

#### 【 0 0 7 4 】

語句「制御配列」は、特定の宿主生物において作動可能に連結されたコード配列を発現させるのに必要な D N A 配列を示している。原核生物に適切な制御配列には、例えば、プロモーターが含まれ、場合により、オペレーター配列が含まれ、及び、リボソーム結合部位が含まれる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを使用することが知られている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 5 】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれている場合、「作動可能に連結」されている。例えば、プレ配列又は分泌リーダーに関するDNAは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドについてのDNAに作動可能に連結されている；プロモーター又はエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響を及ぼす場合、そのコード配列に作動可能に連結されている；又は、リボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように位置付けられている場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、「作動可能に連結された」は、連結されているDNA配列が隣接していること、及び、分泌リーダーの場合は、隣接しており且つ読み取り相内にあること、を意味する。しかしながら、エンハンサーは隣接している必要はない。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の慣例に従って合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを使用する。核酸配列が本明細書中において提供されている場合、それが終止コドンを含み得ることも容易に理解される。しかしながら、終止コドンは交換可能であるため、特定の終止コドンを配列に含ませることは、その配列の必要な部分と見なされるべきではない。

10

## 【 0 0 7 6 】

本明細書中で使用されている場合、「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養物」という表現は交換可能に使用され、そして、全てのそのような呼称は、子孫を包含する。従って、語句「形質転換体」及び「形質転換細胞」は、一次対象者細胞及び継代の数を考慮せずにそれに由来する培養物を包含する。さらにまた、意図的な又は偶発的な突然変異に起因して、必ずしも全ての子孫が正確に同じDNA内容物を有さないことも理解される。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされたのと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異体子孫は包含される。異なる呼称が意図される場合は、それは、その文脈から明らかになる。

20

## 【 0 0 7 7 】

本明細書中で使用されている場合、「生殖細胞系配列」は、再構成されていない免疫グロブリンDNA配列の配列を示している。再構成されていない免疫グロブリン配列の任意の適切な供給源を使用することができる。ヒト生殖細胞系配列は、例えば、アメリカ国立衛生研究所の関節炎及び筋骨格系/皮膚疾患国立研究機構(National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases of the United States National Institutes of Health)のウェブサイト上のJOINSOLVER(登録商標)生殖細胞系データベースから、入手することができる。マウス生殖細胞系配列は、例えば、Giudicelli et al. [Nucleic Acids Res. 33:D256-D261 (2005)]に記載されているようにして入手することができる。

30

## 【 0 0 7 8 】

代表的なイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体の特性

本発明は、単離されたイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体、及び、疾患の処置(例えば、イヌにおける癌の処置)における該抗体又はその抗原結合フラグメントの使用方法を提供する。イヌCTLA-4に結合するイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体の例としては、限定するものではないが、イヌIgG-A、IgG-B、IgG-C及びIgG-D重鎖並びに/又はイヌカッパ軽鎖を抗ヒトCTLA-4 CDRと一緒に含んでいる抗体などがある。従って、本発明は、イヌCTLA-4に結合し、並びに、イヌCTLA-4のイヌCD80及び/又はCD86への結合をブロックする、単離されたイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

40

## 【 0 0 7 9 】

「保存的に改変された変異体」又は「保存的置換」は、タンパク質中のアミノ酸を類似した性質(例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、骨格立体配座及び剛性など)を有する他のアミノ酸で置換することを示しており、その結果、当該変更は、多くの場合、

50

そのタンパク質の生物学的活性を変えることなくなされ得る。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域内の1つのアミノ酸置換は生物学的活性を実質的に改変しないことを認識する[例えば、「Watson et al., Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.; 1987)」を参照されたい]。加えて、構造的に又は機能的に類似しているアミノ酸の置換は、生物学的活性を破壊する可能性がより低い。本発明の抗体又は抗原結合フラグメントのさまざまな実施形態は、本明細書中に開示されている配列(例えば、配列番号34、36、38、40、42、44、60、62、64又は66)を有するポリペプチド鎖又はCDRの領域以外の領域内に最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20又はそれ以上の保存的アミノ酸置換を含むポリペプチド鎖、を含んでいる。例示的な保存的置換が、表Aに記載されている。

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表 A  
例示的な保存的アミノ酸置換

元の残基	保存的置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

## 【0080】

本発明の抗体の機能保存的変異体も、本発明によって企図される。「機能保存的変異体」は、本明細書中で使用されている場合、抗原親和性及び／又は特異性などの所望の特性を変えることなく1以上のアミノ酸残基が変更されている抗体又はフラグメントを示している。そのような変異体は、限定するものではないが、特定のアミノ酸が表Aの保存的アミノ酸置換のような類似特性を有するアミノ酸で置き換えられているものを包含する。

## 【0081】

## 核酸

本発明は、さらに、本明細書中で開示されているイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体及びそ

10

20

30

40

50

の抗原結合フラグメントの免疫グロブリン鎖をコード化する核酸を包含する。例えば、本発明は、下記表の中に記載されている新規核酸の全てを包含する。

【 0 0 8 2 】

さらにまた、B L A S Tアルゴリズムによって比較を実施した場合に本明細書中で提供されている抗体のイヌフレームのアミノ酸配列と少なくとも約70%同一、好ましくは、少なくとも約80%同一、さらに好ましくは、少なくとも約90%同一、及び、最も好ましくは、少なくとも約95%同一（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、100%）であるイヌフレームのアミノ酸配列を含んでいる免疫グロブリンポリペプチドをコード化する核酸も本発明に包含され、ここで、該アルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列の間で最大の一致を与えるように選択される。本発明は、さらに、B L A S Tアルゴリズムで比較を実施した場合に参照アミノ酸配列のいずれかと少なくとも約70%類似、好ましくは、少なくとも約80%類似、さらに好ましくは、少なくとも約90%類似、及び、最も好ましくは、少なくとも約95%類似（例えば、95%、96%、97%、98%、99%、100%）しているアミノ酸配列を含んでいる免疫グロブリンポリペプチドのイヌフレームをコード化する核酸も提供し、ここで、該アルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列の間で最大の一致を与えるように選択され、同様に本発明に包含される。

10

【 0 0 8 3 】

配列同一性は、2つの配列を最適に整列させた場合に2つのポリペプチドのアミノ酸が等しい位置において同一である程度を示している。配列類似性は、同一の残基及び生化学的に関連する非同一のアミノ酸を包含する。類似した特性を共有し、交換可能であり得る生化学的に関連するアミノ酸が上記で論じられている。

20

【 0 0 8 4 】

以下の参考文献は、配列解析のためにしばしば使用されるB L A S Tアルゴリズムに関するものである： B L A S T A L G O R I T H M S : A l t s c h u l , S . F . , et al . , J . M o l . B i o l . 215 : 403 - 410 ( 1990 ) ; G i s h , W . , et al . , N a t u r e G e n e t . 3 : 266 - 272 ( 1993 ) ; M a d d e n , T . L . , et al . , M e t h . E n z y m o l . 266 : 131 - 141 ( 1996 ) ; A l t s c h u l , S . F . , et al . , N u c l e i c A c i d s R e s . 25 : 3389 - 3402 ( 1997 ) ; Z h a n g , J . , et al . , G e n o m e R e s . 7 : 649 - 656 ( 1997 ) ; W o o t t o n , J . C . , et al . , C o m p u t . C h e m . 17 : 149 - 163 ( 1993 ) ; H a n c o c k , J . M . et al . , C o m p u t . A p p l . B i o s c i . 10 : 67 - 70 ( 1994 ) ; A L I G N M E N T S C O R I N G S Y S T E M S : D a y h o f f , M . O . , et al . , " A m o d e l o f e v o l u t i o n a r y c h a n g e i n p r o t e i n s . " i n A t l a s o f P r o t e i n S e q u e n c e a n d S t r u c t u r e , v o l . 5 , s u p p l . 3 . M . O . D a y h o f f ( e d . ) , p p . 345 - 352 , ( 1978 ) ; N a t l . B i o m e d . R e s . F o u n d . , W a s h i n g t o n , D C ; S c h w a r t z , R . M . , et al . , " M a t r i c e s f o r d e t e c t i n g d i s t a n t r e l a t i o n s h i p s . " i n A t l a s o f P r o t e i n S e q u e n c e a n d S t r u c t u r e , v o l . 5 , s u p p l . 3 . " ( 1978 ) , M . O . D a y h o f f ( e d . ) , p p . 353 - 358 ( 1978 ) , N a t l . B i o m e d . R e s . F o u n d . , W a s h i n g t o n , D C ; A l t s c h u l , S . F . , J . M o l . B i o l . 219 : 555 - 565 ( 1991 ) ; S t a t e s , D . J . , et al . , M e t h o d s 3 : 66 - 70 ( 1991 ) ; H e n i k o f f , S . , et al . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 89 : 10915 - 10919 ( 1992 ) ; A l t s c h u l , S . F . , et al . , J . M o l . E v o

30

40

50

1. 36:290-300 (1993); ALIGNMENT STATISTIC S: Karlin, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990); Karlin, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993); Dembo, A., et al., Ann. Prob. 22:2022-2039 (1994); 及び、 Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), pp. 1-14, Plenum, New York (1997).

10

#### 【0085】

本発明は、さらに、本発明の単離された核酸を含んでいる発現ベクターも提供し、ここで、該核酸は、宿主細胞を該ベクターでトランスフェクトしたときに宿主細胞によって認識される制御配列に作動可能に連結されている。さらにまた、本発明の発現ベクターを含んでいる宿主細胞、及び、本明細書中で開示されている抗体又はその抗原結合フラグメントを作製する方法も提供され、ここで、該方法は、該抗体又は抗原結合フラグメントをコード化する発現ベクターを保有する宿主細胞を培地内で培養すること及び該抗原又はその抗原結合フラグメントを宿主細胞又は培地から単離することを含んでいる。

#### 【0086】

20

#### エピトープ結合及び結合親和性

本発明は、さらに、配列番号36及び/又は配列番号46のアミノ酸配列を含んでいるイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体とイヌCTLA-4上の同じエピトープに結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。該イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントは、イヌCTLA-4のイヌCD80及び/又はCD86への結合を阻害することができる。

#### 【0087】

該イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体は、以下の実施例に記載されているように、組換え的に産生させることができる。本明細書中で開示されている抗体又はフラグメントの発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当分野でよく知られており、そして、アメリカ培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)(ATCC)から入手可能な多くの不死化細胞株を包含する。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NSO、SP2細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎(BHK)細胞、サル腎細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)、A549細胞、3T3細胞、HEK-293細胞及び多くの他の細胞株が包含される。哺乳動物宿主細胞としては、ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ及びハムスターの細胞などがある。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有しているかを確認することによって選択される。使用し得る他の細胞株は、昆虫細胞株、例えば、Sf9細胞、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞及び真菌細胞である。当該重鎖又はその抗原結合部分若しくはフラグメント、当該軽鎖及び/又はその抗原結合フラグメントをコード化する組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、その宿主細胞において該抗体の発現を可能にするのに十分な期間、又は、さらに好ましくは、その宿主細胞がその中で増殖する培地の中に抗体の分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって当該抗体が産生される。

30

40

#### 【0088】

抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて、その培地から回収することができる。さらに、産生細胞株からの本発明の抗体(又は、それに由来する他の成分)の発現は、多くの既知技術を用いて増強することができる。例えば、グルタミンシンターゼ遺伝子発現系(GS系)は、特定の条件下で発現を増強するための一般的なアプローチである。該GS系は、欧州特許第0216846号、欧州特許第0256055号及び欧州特許第0

50



3 2 3 9 9 7 号並びに欧州特許出願第 8 9 3 0 3 9 6 4 . 4 号に関連して全体的に又は部分的に考察される。

#### 【 0 0 8 9 】

一般に、特定の細胞株又はトランスジェニック動物において産生される糖タンパク質は、その細胞株又はトランスジェニック動物で産生される糖タンパク質に特徴的なグリコシル化パターンを有する。従って、抗体の特定のグリコシル化パターンは、その抗体を産生させるのに使用される特定の細胞株又はトランスジェニック動物に依存する。しかしながら、本明細書中において提供されている核酸分子によってコード化される又は本明細書中において提供されているアミノ酸配列を含んでいる全ての抗体は、その抗体が有し得るグリコシル化パターンに関係なく、本発明を構成する。同様に、特定の実施形態では、非フコシル化 N - グリカンのみを含んでいるグリコシル化パターンを有する抗体は、これらの抗体が典型的にはインビトロ及びインビボの両方でそれらのフコシル化対応物よりも強力な効力を発揮することが示されているので、有利であり得る [ 例えば、以下のものを参照されたい : Shinkawa et al., J. Biol. Chem., 278 : 3466 - 3473 ( 2003 ) ; 米国特許第 6 , 946 , 292 号及び米国特許第 7 , 214 , 775 号 ]。

10

#### 【 0 0 9 0 】

本発明は、さらに、本明細書中で開示されているイヌ化抗ヒト CTLA - 4 抗体の抗体フラグメントを包含する。該抗体フラグメントには、例えばペプシンによる Ig G の酵素的切断によって生成され得る、F ( a b )<sub>2</sub> フラグメントが包含される。F a b フラグメントは、例えばジチオトレイトール又はメルカプトエチルアミンで F ( a b )<sub>2</sub> を還元することによって、生成させることができる。F a b フラグメントは、ジスルフィド架橋によって V<sub>H</sub> - C<sub>H1</sub> 鎖に付加された V<sub>L</sub> - C<sub>L</sub> 鎖である。F ( a b )<sub>2</sub> フラグメントは、2 つのジスルフィド架橋によって付加された 2 つの F a b フラグメントである。F ( a b )<sub>2</sub> 分子の F a b 部分は、その間にジスルフィド架橋が位置する F<sub>c</sub> 領域の一部分を含んでいる。F<sub>v</sub> フラグメントは、V<sub>L</sub> 領域又は V<sub>H</sub> 領域である。

20

#### 【 0 0 9 1 】

一実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、重鎖定常領域、例えば、イヌ定常領域、例えば、Ig G - A、Ig G - B、Ig G - C 及び Ig G - D イヌ重鎖定常領域又はその変異体を含んでいる。別の実施形態では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、軽鎖定常領域、例えば、イヌ軽鎖定常領域、例えば、ラムダ又はカッパイヌ軽鎖領域又はその変異体を含んでいる。例として、及び、限定するものではなく、該イヌ重鎖定常領域は、Ig G - B に由来することができ [ 例えば、改変された Ig G - B ; U . S . 10 , 106 , 607 B2 を参照されたい、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる ]、及び、該イヌ軽鎖定常領域は、カッパに由来することができる。

30

#### 【 0 0 9 2 】

##### 抗体工学

本発明のイヌ化抗ヒト CTLA - 4 抗体は、例えば、その抗体の特性を改善するために、親 ( 即ち、イヌ ) モノクローナル抗体の可変ドメイン内のフレームワーク残基を包含するイヌフレームへの改変を含むように操作した。

40

#### 【 0 0 9 3 】

##### 実験的及び診断的用途

本発明のイヌ化抗ヒト CTLA - 4 抗体又はその抗原結合フラグメントは、さらに、イヌ CTLA - 4 タンパク質に関する診断アッセイにおいて、例えば、特定の腫瘍細胞、組織又は血清におけるその発現の検出において、有用であり得る。そのような診断方法は、さまざまな病気 ( 特に、イヌの特定の癌 ) の診断において有用であり得る。

#### 【 0 0 9 4 】

例えば、そのような方法は、以下の段階を含んでいる :

( a ) 基質 ( 例えば、マイクロタイタープレートウェルの表面、例えば、プラスチック製プレートの表面 ) をイヌ化抗ヒト CTLA - 4 抗体又はその抗原結合フラグメントでコ

50

ーティングする段階；

(b) イヌCTLA-4の存在について試験されるサンプルを該基質に適用する段階；

(c) そのプレートを洗浄して、当該サンプル中の未結合の物質を除去する段階；

(d) CTLA-4抗原に対しても特異的である検出可能な標識化抗体（例えば、酵素結合抗体）を適用する段階；

(e) 該基質を洗浄して、結合していない該標識化抗体を除去する段階；

(f) 該標識化抗体が酵素結合している場合、酵素によって蛍光シグナルに変換される化学物質を適用する段階；及び、

(g) 該標識化抗体の存在を検出する段階。

【0095】

さらなる実施形態では、該標識化抗体は、ABTS [例えば、2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)] 又は3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンと反応して検出可能な色の変化を生じるペルオキシダーゼで標識されている。あるいは、該標識化抗体は、シンチラントの存在下でシンチレーションカウンターによって検出することができる検出可能な放射性同位元素（例えば、<sup>3</sup>H）で標識されている。本発明のイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体は、ウエスタンブロット法又はイムノブロッティング法で使用する事ができる。

【0096】

そのような方法は、本発明の一部を形成し、そして、例えば、以下を含んでいる：

(i) 結合したイヌCTLA-4又はそのフラグメントの存在について試験される膜又は別の固体基質を、本発明のイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させること。そのような膜は、非変性PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）ゲル又はSDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動）ゲルの中のイヌCTLA-4の存在が試験されるタンパク質が（例えば、該ゲル中で電気泳動分離された後で）移されたニトロセルロース又はビニル系 [例えば、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）] 膜の形態であることができる。膜に該イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントを接触させる前に、該膜を、場合により、その膜上の非特異的タンパク質結合部位が結合するように例えば無脂乾燥乳などでブロックする；

(ii) 未結合のイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメント及び他の未結合物質を除去するために、該膜を1回以上洗浄すること；及び

(iii) 結合したイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントを検出すること。

【0097】

結合した抗体又は抗原結合フラグメントの検出は、その抗体又は抗原結合フラグメントを検出可能に標識された二次抗体（抗免疫グロブリン抗体）と結合させ、次いで、その二次抗体の存在を検出することによって、行うことができる。

【0098】

本明細書中で開示されているイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体及びその抗原結合フラグメントは、さらに、免疫組織化学に使用することができる。そのような方法は、本発明の一部を形成し、そして、例えば、以下を含んでいる：(1) イヌCTLA-4の存在について試験される細胞を、本発明のイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させること；及び、(2) その細胞の表面上又は内部の当該抗体又はフラグメントを検出すること。該抗体又は抗原結合フラグメント自体が検出可能に標識されている場合は、それは、直接検出することが可能である。あるいは、該抗体又は抗原結合フラグメントに、検出可能に標識された二次抗体を結合させることができ、それを検出する。

【0099】

本明細書中に開示されている特定のイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体及びその抗原結合フラグメントは、さらに、インビボ腫瘍イメージングに使用することもできる。そのような方法は、放射性標識されたイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントをイヌCTLA-4の発現に関連する腫瘍の存在について試験されるイヌの体内に注射す

10

20

30

40

50

ること、続いて、当該患者の身体を核イメージングに付して、例えば腫瘍に結合している高濃度の当該抗体又は抗原結合フラグメントを含んでいる場所において、標識された当該抗体又は抗原結合フラグメントの存在を検出すること、を含み得る。

#### 【0100】

イメージング技術としては、SPECTイメージング（単一光子放射型コンピュータ断層撮影）又はPETイメージング（ポジトロン放射型断層撮影）などがある。標識としては、例えば、以下のものなどがある：例えばSPECTイメージングと組み合わせた、ヨウ素-123 ( $^{123}\text{I}$ ) 及びテクネチウム-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、又は、例えばPETイメージングと組み合わせた、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 若しくは $^{18}\text{F}$ 、又は、インジウム-111 [例えば、「Gordon et al., International Rev. Neurobiol. 67:385-440 (2005)」を参照されたい]。

10

#### 【0101】

##### 医薬組成物及び投与

イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントの医薬組成物又は滅菌組成物を調製するために、そのイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントを薬学的に許容される担体又は賦形剤と混合させる。[例えば、以下のものを参照されたい：Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984)]。

#### 【0102】

治療薬及び診断薬の製剤は、例えば凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液又は懸濁液の形態にある、許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合させることによって、調製することができる [例えば、以下のものを参照されたい：Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY]。一実施形態では、本発明の抗CTLA-4抗体を酢酸ナトリウム溶液 (pH 5~6) の中で適切な濃度に希釈し、そして、張度のためにNaCl又はスクロースを添加する。安定性を高めるために、ポリソルベート20又はポリソルベート80などの付加的な作用物質を添加することができる。

20

30

40

#### 【0103】

単独で又は別の作用物質と組み合わせて投与される該抗体組成物の毒性及び治療効果は、例えばLD<sub>50</sub>（母集団の50%に致死的な用量）及びED<sub>50</sub>（母集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養物又は実験動物における標準的な薬学手順によって確認することができる。毒性作用と治療効果の間の用量比が治療指数 (LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>) である。特定の態様においては、高い治療指数を示す抗体が望ましい。これらの細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータは、イヌにおける使用のための投与量範囲を設定するのに使用することができる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、殆ど又は全く毒性を伴わないED<sub>50</sub>を包含する循環濃度の範囲内にある。該投

50

与量は、使用される投与形態及び投与経路に応じてこの範囲内でさまざまであり得る。

【0104】

投与の方法はさまざまであり得る。適切な投与経路としては、以下の経路などがある：経口、直腸、経粘膜、腸、非経口；筋肉内、皮下、皮内、髄内、髄腔内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻内、眼内、吸入、吹送、局所、皮膚、経皮、又は、動脈内。

【0105】

特定の実施形態では、該イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体又はその抗原結合フラグメントは、注射などの侵襲的経路によって投与することができる。本発明のさらなる実施形態では、イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体若しくはその抗原結合フラグメント又はその医薬組成物は、静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、腫瘍内に、又は、吸入、エアロゾル送達によって、投与される。非侵襲的経路（例えば、経口的に；例えば、丸剤、カプセル剤又は錠剤中で）による投与も、本発明の範囲内である。

10

【0106】

組成物は、当技術分野で知られている医療機器を用いて投与することができる。例えば、本発明の医薬組成物は、皮下注射針（これは、例えば、プレフィルドシリンジ又は自己注射器を包含する）による注射によって投与することができる。本明細書中で開示されている医薬組成物は、さらに、無針皮下注射装置（例えば、米国特許：第6,620,135号；第6,096,002号；第5,399,163号；第5,383,851号；第5,312,335号；第5,064,413号；第4,941,880号；第4,790,824号又は第4,596,556号に開示されている装置）を用いて投与することもできる。

20

【0107】

本明細書中で開示されている医薬組成物は、注入によって投与することもできる。医薬組成物を投与するためのよく知られているインプラント及びモジュールの例としては、以下のものなどがある：米国特許第4,487,603号、これは、薬剤を制御された速度で投与するための移植可能なマイクロ注入ポンプを開示している；米国特許第4,447,233号、これは、薬剤を正確な注入速度で送達するための薬剤注入ポンプを開示している；米国特許第4,447,224号、これは、持続的な薬剤送達のための可変流量の移植可能な注入装置を開示している；米国特許第4,439,196号、これは、マルチチャンバー区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示している。多くの他のそのようなインプラント、送達システム及びモジュールは、当業者にはよく知られている。

30

【0108】

あるいは、例えば、多くの場合、デポー製剤又は持続放出製剤で、免疫病理学によって特徴付けられる病原体誘発性病変又は関節炎の関節の内部に該イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体を直接注入することによって、該イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体を全身的ではなく局所的に投与することができる。さらに、例えば、免疫病理学によって特徴付けられる病原体誘発性病変又は関節炎の関節を標的とする、標的化薬物送達システムで、例えば、組織特異的抗体で被覆されたりボソームに入れて、当該イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体を投与することができる。該リボソームは、罹患組織を標的とし、そして、罹患組織によって選択的に取り込まれる。

40

【0109】

投与レジメンは、治療用抗体の血清又は組織代謝回転速度、症状のレベル、治療用抗体の免疫原性及び生物学的マトリックス中の標的細胞の接近可能性を包含するいくつかの因子に依存する。好ましくは、該投与レジメンは、同時に望ましくない副作用を最小限に抑えながら、標的疾患部位において改善をもたらすのに十分な治療用抗体を送達する。従って、送達される生物学的製剤の量は、一部には特定の治療用抗体及び処置される状態の重症度に依存する。治療用抗体の適切な用量の選択における指針を入手することが可能である[例えば、以下のものを参照されたい：Wawrzyniczak Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK (1996); Kresina (ed.) Monoclonal

50

Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY (1991); Bach (ed.) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY (1993); Baert, et al. New Engl. J. Med. 348:601-608 (2003); Milgrom et al. New Engl. J. Med. 341:1966-1973 (1999); Slamon et al. New Engl. J. Med. 344:783-792 (2001); Beniaminovitz et al. New Engl. J. Med. 342:613-619 (2000); Ghosh et al. New Engl. J. Med. 348:24-32 (2003); Lipsky et al. New Engl. J. Med. 343:1594-1602 (2000)].

10

【0110】

適切な用量の決定は、例えば処置に影響を及ぼすことが当分野で既知である又は推測されるパラメータ又は因子を使用して、獣医によって行われる。一般に、当該投与は、最適用量よりいくぶん低い量から開始し、その後、負の副作用と比較して所望の又は最適の効果が達成されるまで、少しずつ増量する。重要な診断基準としては、症状の診断基準、例えば、炎症又は産生される炎症性サイトカインのレベルの症状の診断基準などがある。

【0111】

本明細書中で開示されている抗体又はその抗原結合フラグメントは、連続注入によって提供され得るか、又は、例えば、1日1回、週に1~7回、週1回、隔週に1回、月1回、隔月に1回、3ヶ月に1回、半年に1回、年1回などで投与される用量によって提供され得る。用量は、例えば、静脈内、皮下、局所、経口、鼻腔、直腸、筋肉内、脳内、脊髄内に、又は、吸入によって、提供され得る。1週間の総用量は、一般に、少なくとも0.05 µg/kg体重であり、より一般的には、少なくとも0.2 µg/kg、0.5 µg/kg、1 µg/kg、10 µg/kg、100 µg/kg、0.25 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/mL、10 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg又はそれ以上である[例えば、以下のものを参照されたい: Yang, et al. New Engl. J. Med. 349:427-434 (2003); Herold, et al. New Engl. J. Med. 346:1692-1698 (2002); Liu, et al. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456 (1999); Portielji, et al. Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144 (2003)]。用量は、さらにまた、対象者の血清中における該イヌ化抗ヒトCTLA-4抗体のあらかじめ定められた目標濃度(例えば、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300 µg/mL又はそれ以上)を達成するように提供され得る。別の実施形態では、本発明のイヌ化抗ヒトCTLA-4抗体は、週1回、隔週に1回、「4週間に1回」、月1回、隔月に1回又は3ヶ月に1回に基づいて、10、20、50、80、100、200、500、1000又は2500 mg/対象者で、皮下投与又は静脈内投与される。

20

30

40

【0112】

本明細書中で使用されている場合、「阻害する」又は「処置する」又は「処置」は、障害に関連する症状の発現の先送り及び/又はそのような障害の症状の重症度の軽減を包含する。これらの用語は、さらに、既存の制御されていない又は望ましくない症状を改善すること、付加的な症状を予防すること及びそのような症状の基礎となる原因を改善又は予防することを包含する。従って、これらの用語は、障害、疾患若しくは症状を有している又はそのような障害、疾患若しくは症状を発現する可能性を有している脊椎動物対象者に有益な結果が与えられていることを意味する。

【0113】

本明細書中で使用されている場合、用語「治療有効量」、「治療有効用量」及び「有効

50

量」は、単独で又は付加的な治療薬と組み合わせて細胞、組織又は対象者に投与された場合に、疾患若しくは状態の１以上の症状における又はそのような疾患若しくは状態の進行における測定可能な改善を生じさせるのに有効な、本発明のイヌ化抗ヒトＣＴＬＡ－４抗体又はその抗原結合フラグメントの量を示している。治療有効用量は、さらに、症状の少なくとも部分的な改善、例えば、関連する医学的状态の処置、治癒、予防若しくは改善又はそのような状態の処置、治癒、予防若しくは改善の速度の増大をもたらすのに十分な結合性化合物の量を示している。単独で投与される個々の活性成分に対して適用される場合、治療有効用量は、その成分単独を示している。組合せに対して適用される場合、治療有効用量は、併用して、連続的に又は同時に投与されるかどうかにかかわらず、治療効果をもたらす有効成分の合計量を示している。治療薬の有効量は、診断基準又はパラメータの少なくとも１０％、通常は少なくとも２０％、好ましくは少なくとも約３０％、さらに好ましくは少なくとも４０％、最も好ましくは少なくとも５０％の改善をもたらす。有効量は、さらにまた、疾患の重症度を評価するのに主観的基準を用いる場合は、主観的基準の改善ももたらすことができる。

【０１１４】

#### 他の併用療法

先に記載したように、該イヌ化抗ヒトＣＴＬＡ－４抗体又はその抗原結合フラグメントは、１種類以上の別の治療薬（例えば、化学療法薬）と同時に投与することができる。該抗体は、該別の治療薬に（免疫複合体として）連結させることができ、又は、該別の治療薬とは別々に投与することができる。後者（別々の投与）の場合、該抗体は、該別の治療薬の前に、後で若しくは同時に投与することが可能であり、又は、別の既知療法と同時に投与することができる。

【０１１５】

#### キット

さらに、ＣＴＬＡ－４に特異的に結合する１種類以上の成分〔これは、限定するものではないが、本明細書中で論じられている抗体又は抗原結合フラグメントを包含する〕（例えば、本発明のイヌ化抗ヒトＣＴＬＡ－４抗体又はその抗原結合フラグメント）を１種類以上の付加的な成分〔これは、限定するものではないが、本明細書中で論じられている薬学的に許容される担体及び／又は化学療法薬を包含する〕と一緒に含んでいるキットが提供される。該結合性組成物及び／又は該化学療法薬は、医薬組成物において、純粋な組成物として製剤することができるか、又は、薬学的に許容される担体と組み合わせて製剤することができる。

【０１１６】

一実施形態では、該キットは、１つの容器（例えば、無菌のガラス性バイアル又はプラスチック性バイアル）の中の本発明の結合性組成物（例えば、配列番号３６及び配列番号４６のアミノ酸配列を含んでいる該イヌ化抗ヒトＣＴＬＡ４抗体又はその医薬組成物）並びに別の容器（例えば、無菌のガラス性バイアル又はプラスチック性バイアル）の中の医薬組成物及び／又は化学療法薬を含んでいる。

【０１１７】

別の実施形態では、該キットは、結合性組成物成分（例えば、配列番号３６及び配列番号４６のアミノ酸配列を含んでいるイヌ化抗ヒトＣＴＬＡ４－抗体）を薬学的に許容される担体と一緒に含んでいる本発明の組合せを、場合により、一緒に（場合により、医薬組成物において）製剤された１種類以上の治療薬成分と組み合わせて、単一の共通する容器の中に含んでいる。

【０１１８】

該キットが対象者への非経口投与用の医薬組成物を含んでいる場合、そのキットは、そのような投与を実施するための装置を含んでいることができる。例えば、該キットは、上記で論じた１以上の皮下注射用針又は他の注射装置を含んでいることができる。該キットは、さらに、そのキットの中の医薬組成物及び投与形態に関する情報を含む添付文書も含んでいることができる。一般に、そのような情報は、ペットの飼い主及び獣医が同封され

10

20

30

40

50

ている医薬組成物及び投与形態を有効かつ安全に使用するのに役立つ。例えば、本発明の組合せに関する以下の情報が添付文書中で提供され得る：薬物動態学、薬力学、臨床試験、効力パラメータ、適応症及び用法、禁忌、警告、注意、有害反応、過量、適切な投与量及び投与、供給方法、適切な保存条件、参考文献、製造業者／配給業者情報、及び、特許情報。

#### 【 0 1 1 9 】

便宜上、本明細書中で開示されている抗体又は特定の結合性薬剤は、キット中で、即ち、診断又は検出アッセイを実施するための指示書と共に所定量の試薬の包装された組合せで、提供され得る。該抗体が酵素で標識されている場合、該キットは、基質及び当該酵素が必要とする補因子（例えば、検出可能な発色団又は発蛍光団を提供する基質前駆体）を含有する。加えて、他の添加物、例えば、安定化剤、緩衝液（例えば、ブロック緩衝液又は溶解緩衝液）なども含まれる。さまざまな試薬の相対的な量は、当該アッセイの感受性を実質的に最適化する試薬の溶液中の濃度を提供するように広範囲に変えることができる。特に、該試薬は、溶解した際に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含有する、通常は凍結乾燥された、乾燥粉末として提供され得る。

#### 【実施例】

#### 【 0 1 2 0 】

##### 実施例 1

##### 抗 C T L A - 4 キメラ抗体の構築

ヒト C T L A - 4 に結合すること及びヒト C T L A - 4 とヒト C D 8 6 の結合をブロックすることの両方が分かっている、ヒト C T L A - 4 に対して産生された従来技術のモノクローナル抗体も、イヌ C T L A - 4 に結合して、おそらく、イヌ C D 8 6 とイヌ C T L A - 4 をブロックし得る可能性があると考えられた。この可能性について試験するために、抗ヒト C T L A - 4 モノクローナル抗体 3 B 1 0 ( W O 2 0 1 2 1 2 0 1 2 5 に開示されている ) の重鎖可変領域に対応する既知ヌクレオチド配列を、改変されたイヌ定常重鎖のヌクレオチド配列 ( C H 1 - ヒンジ - C H 2 - 3 ) に融合させて、配列番号 1 として示されているキメラマウス - イヌ重鎖ヌクレオチド配列を生成させた。抗ヒト C T L A - 4 の軽鎖可変領域に対応するアミノ酸配列をコード化する第 2 の既知のヌクレオチド配列をイヌ定常カッパ軽鎖ドメインのヌクレオチド配列に融合させて、配列番号 3 として示されているキメラマウス - イヌ軽鎖ヌクレオチド配列を生成させた。該キメラマウス - イヌ重鎖ヌクレオチド配列によってコード化されるタンパク質は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでおり；及び、該キメラマウス - イヌ軽鎖ヌクレオチド配列によってコード化されるタンパク質は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでいる。キメラヒト - イヌの重鎖及び軽鎖を、標準的な分子生物学技術を使用して別々の発現プラスミドにクローン化させた。重鎖及び軽鎖遺伝子を含んでいるプラスミドを H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトし、発現した抗体をプロテイン A を使用して H E K 2 9 3 細胞上清から精製した。

#### 【 0 1 2 1 】

同様に、W O 2 0 1 2 1 2 0 1 2 5 に以前に開示された可変ドメインを含んでいるキメラ抗体 8 H 5 も、それぞれ配列番号 5 ~ 配列番号 8 として記載されている D N A 配列及びアミノ酸配列を含んでいる重鎖と軽鎖の組み合わせによって形成される抗体によって例示されるように構築した。さらに、W O 2 0 0 0 0 3 7 5 0 4 に開示されている可変ドメインを含んでいるキメラ抗体 4 1 1、4 1 8 及び 6 1 1 も、それぞれ配列番号 9 ~ 配列番号 2 0 として記載されている核酸配列及びアミノ酸配列を含んでいる重鎖と軽鎖の組み合わせによって形成される抗体によって例示されるように構築した。U . S . 8 , 0 1 7 , 1 1 4 B 2 に開示されている可変ドメインを含んでいるキメラ抗体 1 0 D 1 及び 1 E 2 も、それぞれ配列番号 2 1 ~ 配列番号 2 8 として記載されているヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を含んでいる重鎖と軽鎖の組み合わせによって形成される抗体によって例示されるように構築した。さらに、W O 2 0 1 0 0 9 7 5 9 7 に開示されている可変ドメインを含んでいるキメラ抗体 3 B 3 も、それぞれ配列番号 2 9 ~ 配列番号 3 2 として記載されているヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を含んでいる重鎖と軽鎖の組み合わせによって形成

される抗体によって例示されるように構築した。該キメラ抗体のアミノ酸配列識別番号が、下記表 1 に示されている。

【表 3】

表 1  
キメラ抗体に関するアミノ酸配列

	キメラ	重鎖 配列番号	軽鎖 配列番号
3B10	マウス - イヌ	2	4
8H5	マウス - イヌ	6	8
411	ヒト - イヌ	10	12
418	ヒト - イヌ	14	16
611	ヒト - イヌ	18	20
10D1	ヒト - イヌ	22	24
1E2	ヒト - イヌ	26	28
3B3	マウス - イヌ	30	32

## 【 0 1 2 2 】

### 実施例 2

#### 抗 C T L A - 4 キメラ抗体の反応性

実施例 1 のキメラ抗体を、E x p i 2 9 3 細胞 [ T H E R M O F I S H E R S C I N E T I F I C (登録商標) から得られた E x p i 2 9 3 発現系 ] で発現させ、プロテイン A カラムで精製した。次いで、そのキメラ抗体を、以下のように、E L I S A によってイヌ C T L A - 4 との反応性について試験した：

- 1 . イムノプレートに 2 0 0 n g / ウェルの C T L A - 4 をコーティングし、そのプレートを 4 で一晩インキュベートした；
- 2 . プレートを 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ( P B S T ) を含んでいる P B S で 3 回洗浄した；
- 3 . プレートを、室温で 4 5 ~ 6 0 分間、P B S 中の 0 . 5 % B S A でブロッキングした；
- 4 . プレートを P B S T で 3 回洗浄した；
- 5 . 希釈プレートの各列又は行で、抗体を 3 倍に希釈した；
- 6 . 希釈した抗体をイムノプレートの各列又は行に移し、そのプレートを室温で 4 5 ~ 6 0 分間インキュベートした；
- 7 . プレートを P B S T で 3 回洗浄した；
- 8 . プレートの各ウェルに 1 : 2 0 0 0 希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗イヌ I g G F c を添加し、そのプレートを室温で 4 5 ~ 6 0 分間インキュベートした；
- 9 . プレートを P B S T で 3 回洗浄した；
- 1 0 . プレートの各ウェルに T M B 基質を添加し、そのプレートを室温で 1 0 ~ 1 5



分間インキュベートして、発色させた；

11． 各ウェルに100μLの1.5Mリン酸を加えて反応を停止させた；

12． プレートを540nmの参照波長を用いて450nmで読み取った。

【0123】

E L I S Aの結果は、図1に示されており、そして、選択された抗体がイヌCTLA-4に結合できたことを示している。さらに、3B10キメラ抗体は、このグループのキメラ抗体の中で最良の結合剤であることが見出された。

【0124】

### 実施例3

#### イヌ化抗ヒトCTLA-4モノクローナル抗体3B10の構築

3B10キメラ抗体がイヌCTLA-4に対して最も強い結合親和性を有することを確認したので(図1を参照されたい)、このキメラ抗体の6つのCDRからなるセットを選択してイヌのフレームに加えた。イヌ化のプロセスを実施するために、イヌIgGの重鎖及び軽鎖をコード化するDNA配列を確認した[U.S.10,106,607B2を参照されたい；その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる]。該イヌ重鎖及び軽鎖のDNA配列及びタンパク質配列は、当技術分野で知られており、そして、NCBI遺伝子及びタンパク質データベースを検索することによって得ることができる。イヌIgGの4つの既知IgGサブタイプが存在し、それらはIgG-A、IgG-B、IgG-C及びIgG-Dと称される。イヌ抗体には、カッパ及びラムダと称される2種類の軽鎖が存在する。

【表4】

表 2  
イヌ化抗体中の従来技術 CDRS の DNA 配列

CDR	ヌクレオチド配列	配列番号
H-1	gattataacatggat	47
H-2	aacattaacccgaacagcgaaagcaccagctataaccagaaatttaaaggc	49
H-3	gatggcaaccgctatgatgcgtggttgctat	51
L-1	agcgcgagcagcagcgtgacctatatgcat	53
L-2	agcaccagcattctggcgagc	55
L-3	cagcagcgcaccagctatccgctgacc	57

【表5】

表 3<sup>1</sup>  
イヌ化抗体中の従来技術 CDRS のアミノ酸配列

CDR	アミノ酸配列	配列番号
H-1	DYNMD	48
H-2	NINPNSESTSYNQKFKG	50
H-3	DGNRYDAWFAY	52
L-1	SASSSVTYMH	54
L-2	STSILAS	56
L-3	QQRTSYPLT	58

<sup>1</sup> 表2及び表3におけるCDRの核酸配列及びアミノ酸配列は、以前に得られており、そして、ヒト化抗ヒトCTLA-4抗体に関してWO2012120125の中で開示された。

## 【 0 1 2 5 】

特定のアプローチに拘束されるものではないが、さまざまな組み合わせで混合させてイヌ化抗ヒト C T L A - 4 m A b を産生させることができるイヌ化重鎖及び軽鎖を産生させる全プロセスは、以下のスキームを包含し得る：

( i ) 所望の抗 C T L A - 4 m A b の H 鎖と L 鎖の C D R を特定する。その C D R のアミノ酸配列を適切な D N A 配列に逆翻訳させる；

( i i ) イヌ I g G の H 鎖及び L 鎖（例えば、U . S . 1 0 , 1 0 6 , 6 0 7 B 2 に記載されている I g G - B の改変重鎖及び軽カッパ鎖）に対する適切な D N A 配列を特定する；

( i i i ) 上記配列のイヌ I g G H 鎖及び L 鎖 D N A の内因性 C D R をコード化する D N A 配列を特定する；

( i v ) 内因性のイヌ H 鎖及び L 鎖 C D R をコード化する D N A 配列を所望の抗ヒト C T L A - 4 C D R をコード化する D N A 配列で置き換える。改変されたイヌ I g G - B を使用した場合、配列番号 6 9 で番号付けされた D 3 1 A 及び N 6 3 A での改変は、U . S . 1 0 , 1 0 6 , 6 0 7 B 2 号（これは、その全体が本明細書に組み込まれる）において以前に記載されたように、イヌ I g G - B において実施した。さらにまた、場合により、いくつかのイヌフレームアミノ酸残基をコード化する D N A を所望の抗ヒト C T L A - 4 m A b イヌ領域からの選択されたアミノ酸残基をコード化する D N A に置き換えた。このプロセスは、復帰突然変異と称される。表 4 及び表 5 に記載されている、各重鎖に関する 4 つの変異体の 2 つのセット及び軽鎖可変領域に関する 3 つの変異体の 1 つのセットは、異なる復帰突然変異部位を含むセットの各変異体を用いて開発した；

( v ) 段階 ( i v ) からの D N A を合成し、それを適切な発現プラスミドにクローン化する；

( v i ) 所望のイヌ化 H 鎖及び L 鎖を含んでいるプラスミドを H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトする；

( v i i ) 発現されたイヌ化抗体を H E K 2 9 3 上清から精製する；

( v i i i ) 精製されたイヌ化抗体をイヌ C T L A - 4 への結合について試験する。

## 【 0 1 2 6 】

イヌ化 H 鎖及び L 鎖配列のセットを開発した。その配列番号は、下記表 4 及び表 5 に記載されている。

## 【表 6】

表 4  
イヌ化 3B10 重鎖の配列番号

イヌ化重鎖	改変された <sup>2</sup> IgG B (D31A/N63A)	配列番号 核酸	配列番号 アミノ酸
3B10 VH1	No	33	34
3B10 VH2	No	35	36
3B10 VH3	No	37	38
3B10 VH4	No	39	40
3B10 VH1	Yes	59	60
3B10 VH2	Yes	61	62
3B10 VH3	Yes	63	64
3B10 VH4	Yes	65	66

<sup>2</sup> 下記配列番号 6 9 において示されている。

10

20

30

40

50

## 【表 7】

表 5  
イヌ化 3B10 軽鎖の配列番号

イヌ化軽鎖	配列番号 核酸	配列番号 アミノ酸
3B10 VL1	41	42
3B10 VL2	43	44
3B10 VL3	45	46

10

## 【0127】

本発明は、上記表 4 及び表 5 に記載されているイヌ化重鎖と軽鎖との任意の組み合わせによって形成されたイヌ化抗体を提供する。次いで、その抗体を E x p i 2 9 3 細胞で発現させ、精製した。図 2 に示されている E L I S A の結果は、3 B 1 0 が首尾よくイヌ化され、その際、3 B 1 0 L 3 H 2、3 B 1 0 L 3 H 3 及び 3 B 1 0 L 3 H 4 が、全て、3 B 1 0 の親マウス - イヌキメラ抗体と同様の緊密な結合活性を有していることを示している。

20

## 【0128】

## 実施例 4

イヌ C D 8 6 と C T L A - 4 の相互作用に対するキメラ及びイヌ化抗体 3 B 1 0 のブロッキング活性

イヌ化 3 B 1 0 抗体がイヌ C T L A - 4 に対して親抗体と同じ中和活性を維持していることを確認するために、該イヌ化抗体を、イヌ - C D - 8 0 とイヌ C T L A - 4 の相互作用に対するブロッキング活性について、以下のように E L I S A によって試験した：

- 1 . イムノプレートに 2 0 0 n g / ウェルの C T L A - 4 をコーティングし、そのプレートを 4 時間で一晚インキュベートした；
- 2 . プレートを 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ( P B S T ) を含んでいる P B S で 3 回洗浄した；
- 3 . プレートを、室温で 4 5 ~ 6 0 分間、P B S 中の 0 . 5 % B S A でブロッキングした；
- 4 . プレートを P B S T で 3 回洗浄した；
- 5 . 希釈プレートの各列又は行で、抗体を 3 倍に希釈し、次いで、1 0 0 n g / ウェルのビオチン化 C D - 8 6 を添加し、抗体と混合させた；
- 6 . 希釈された抗体と C D - 8 6 の混合物をイムノプレートの各列又は行に移し、そのプレートを室温で 4 5 ~ 6 0 分間インキュベートした；
- 7 . プレートを P B S T で 3 回洗浄した；
- 8 . プレートの各ウェルに、1 : 2 0 0 0 希釈の西洋ワサビペルオキシダーゼがコンジュゲートしたストレプトアビジンを添加し、そのプレートを室温で 4 5 ~ 6 0 分間インキュベートした；
- 9 . プレートを P B S T で 3 回洗浄した；
- 1 0 . プレートの各ウェルに T M B 基質を添加し、そのプレートを室温で 1 0 ~ 1 5 分間インキュベートして、発色させた；
- 1 1 . 各ウェルに 1 0 0  $\mu$  L の 1 . 5 M リン酸を加えて反応を停止させた；
- 1 2 . プレートを 5 4 0 n m の参照波長を用いて 4 5 0 n m で読み取った。

30

40

## 【0129】

図 3 に示されている E L I S A プレートの結果のプロットは、該イヌ化 3 B 1 0 変異体が親 3 B 1 0 と同様のブロッキング活性を有していることを示している。

50

## 【 0 1 3 0 】

## 実施例 5

## キメラ抗体によって活性化されるイヌ P B M C の I F N 産生

## 序説：

インターフェロン - ガンマ ( I F N -  $\gamma$  ; I I 型インターフェロンとしても知られている ) は、主に、活性化 T リンパ球によって産生され、及び、おそらく、ナチュラルキラー細胞によって産生される。この属性は、E L I S A ベースのアッセイで I F N -  $\gamma$  産生を定量的に試験することにより、T 細胞活性化の指標として広く適用されている。C T L A - 4 に対する機能的抗体 ( 抗 C T L A - 4 抗体 ) を特定するために、選択された抗体を、以下のプロトコルを使用して、イヌ末梢血単核細胞での I F N -  $\gamma$  産生を刺激するそれらの活性について試験した。

10

## 【 0 1 3 1 】

## 実験及び結果

## イヌ末梢血単核細胞の分離

- 1 . E D T A 又はナトリウムヘパリン管に約 2 0 m L の全血を採取した ;
- 2 . 血液を 5 0 m L 容ポリスチレン管に移し、ハンクス平衡塩類溶液 ( H B S S ) で 5 0 : 5 0 に希釈した ;
- 3 . 1 5 m L の F i c o l l - P l a q u e P l u s を 4 x 5 0 m L S e p M a t e <sup>TM</sup> 管に添加した。次いで、約 1 0 m L の該 5 0 : 5 0 に希釈した血液をゆっくりと、F i c o l l を含んでいる各 S e p M a t e <sup>TM</sup> 管の側面に添加した ;
- 4 . 管を 1 2 0 0 x g で 2 0 分間遠心分離した ;
- 5 . 勾配界面から細胞を回収し、その細胞を 5 0 m L 容ポリプロピレン管に移した。4 0 ~ 4 5 m L のマークまで H B S S を添加し、細胞を 8 0 0 x g で 1 0 分間遠心分離した ;
- 6 . 上清を廃棄し、細胞を 4 0 ~ 4 5 m L H B S S に再懸濁させ、管を再度 8 0 0 x g で 1 0 分間遠心分離した ;
- 7 . 上清を廃棄し、各管からの細胞を 2 m L のイヌリンパ球培地で再懸濁させた ( 細胞を、同じ動物からプールした ) ;
- 8 . 細胞懸濁液の少量アリコートを取り、0 . 0 4 % トリパンブルーと混合させ、細胞数をカウントした ;
- 9 . 細胞懸濁液は、使用するまで 2 - 7 で保存した [ しかしながら、使用する 2 4 時間前からは 2 ~ 7 で保存しなかった ] 。

20

30

## 【 0 1 3 2 】

## イヌ末梢血単核細胞に関する細胞増殖アッセイ

- 1 . 抗体をイヌリンパ球培地 [ L O N Z A から購入した R P M I 培地 ( カタログ番号 1 2 - 1 6 7 Q ) 、又は、同等のもの ] 内で希釈して、最終濃度を 4 0  $\mu$  g / m L とし ( 調製は 1 6 0  $\mu$  g / m L ) 、0 . 2  $\mu$  m シリンジフィルターを使用して滅菌した。抗体を滅菌希釈プレートで 2 倍希釈し、置いておいた ;
- 2 . 細胞をイヌリンパ球培地内で 2 . 5 x 1 0 <sup>6</sup> 細胞 / m L に希釈し、9 6 ウェル組織培養プレート全体のウェルあたり 1 0 0  $\mu$  L を分注した ;
- 3 . C o n A をイヌリンパ球培地内で希釈して、最終濃度を 2 5 0 n g / m L とし ( 調製は 1 0 0 0 n g / m L ) 、0 . 2  $\mu$  m シリンジフィルターを使用して滅菌し、5 0  $\mu$  L を全てのウェルに加えた。 ( 注 : 細胞のみ対照用の 8 つのウェルの 1 つの列及び細胞 + m A b のみ対照用のウェルには、C o n A を加えなかった ) ;
- 4 . ウェルあたり 1 0 0  $\mu$  L のイヌリンパ球培地を細胞のみのウェルに添加し、5 0  $\mu$  L の培地を C o n A 対照ウェル ( m A b 処理なしの C o n A + 細胞 ) を含む列に添加した ;
- 5 . 5 0  $\mu$  L の希釈 m A b を複製ウェルに添加した ;
- 6 . プレートを、加湿インキュベーター内で、3 6  $\pm$  2 、4 . 0 - 6 . 0 % C O <sub>2</sub> で、6 8 ~ 1 2 4 時間インキュベートした。

40

50

## 【 0 1 3 3 】

I F N   E L I S A

- 1 .   6 8 ～ 1 2 4 時間のインキュベーション後、プレートを 8 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離した；
- 2 .   各ウェル及びプール複製から上清を収集した。これらのサンプルは、後で使用するために - 5 0   以下で凍結することができるか、又は、すぐに試験することができる；
- 3 .   必要に応じて上清サンプルを適切に希釈し、C a n i n e   I F N -   Q u a n t i k i n e <sup>TM</sup> E L I S A キット [ R & D   S y s t e m s   カタログ番号 C A I F 0 0 ] の指示に従って I F N -   E L I S A を実施した。

## 【 0 1 3 4 】

図 4 に示されている結果は、試験したキメラ抗体（特に、3 B 1 0、4 1 1 及び 6 1 1）が、イヌ T 細胞を有意に活性化して I F N -   を産生させたことを示している。

## 【 0 1 3 5 】

実施例 6イヌ化 3 B 1 0 抗体のエピトープマッピング

イヌ C T L A - 4（N C B I 参照配列：N P \_\_ 0 0 1 0 0 3 1 0 6；配列番号 6 8）上のイヌ化抗体 3 B 1 0 L 3 H 2 の結合エピトープを化学的架橋及び質量分析によってマッピングした。結果は、該抗体が、アミノ酸 R 3 3、R 3 8、S 4 2、T 4 5、R 8 3、T 8 7、Y 9 0、K 9 3 及び Y 9 8 を含んでいる抗原 C T L A - 4 上の 2 つの別々の線形領域に結合することを示している（図 5 を参照されたい）。図 5 では、該イヌ化抗体 3 B 1 0 L 3 H 2 が結合する C T L A - 4 の非隣接エピトープに関するアミノ酸残基が、2 つの線形部分（それぞれ、アミノ酸残基 3 0 ～ 5 0 及びアミノ酸残基 8 0 ～ 1 0 0）で構成されていることが示されている。

10

20

30

40

50

【表 8】

## 配 列

SEQ ID NO: 1: キメラマウスーイヌ重鎖 DNA (3B10):

GAAGTGCAGCTGCAGCAGTTTGGCGCGGAACTGGTGAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAATGAGCTGCAAAG  
CGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATAACATGGATTGGGTGCGCCAGAGCGGCAAAAGCCTGGAATGGAT  
TGGCAACATTAACCCGAACAGCGAAAGCACCAGCTATAACCAGAAATTTAAAGGCAAAGCGACCCTGACC  
GTGGATAAAAGCAGCAGCACCAGCGTATATGGAAGTGCAGCGCTGACCAGCGATGATACCGCGGTGTATT  
ATTGCACCCGCGATGGCAACCGCTATGATGCGTGGTTTTCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT  
GAGCAGCGCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTTCCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGCAGC  
ACCGTGGCGCTGGCGTGCTTGGTGAGCGGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCA  
GCCTGACCAGCGGCGTGCTATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTATAGCCTGAGCAGCAT  
GGTGACCGTGCCGAGCAGCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGCAAA  
ACCAAAGTGGATAAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACGGCCGCGTGCCGCGCCCGCCGGATTGCCCGAAAT  
GCCCGGCGCCGAAATGCTGGGCGGCCGAGCGTGTTTATTTTCCGCCGAAACCGAAAGATACCTTGCT  
GATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGCAGATT  
AGCTGGTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAACCCAGCCGCGCAAGAACAGTTTGCGGGCA  
CCTATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTGCAA  
AGTGAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCATCAG  
CCGAGCGTGTATGTGCTGCCGCCGAGCCGCAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCCTGA  
TTAAAGATTTTTTCCGCCGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGCCAGCAGGAACCGGAAAGCAA  
ATATCGCACCAACCCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTCTGTATAGCAAAGTGCAGTGGAT  
AAAAGCCGCTGGCAGCGCGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTTATA  
CCCAGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAAA

10

20

SEQ ID NO: 2: キメラマウスーイヌ重鎖アミノ酸配列 (3B10):

EVQLQQFGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMDWVRQSGKSLEWIGNINPNSESTSYNQKFKGKATLT  
VDKSSSTAYMELRSLTSDDTAVYYCTRDGNRYDAWFAYWGQGLTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGS  
TVALACLVSQYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASK  
TKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQI  
SWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQ  
PSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQQEPESKYRTTPPQLDEGQSYFLYSKLSVD  
KSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

SEQ ID NO: 3: キメラマウスーイヌ軽鎖 DNA (3B10):

CAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGATTATGAGCGCGAGCCCGGGCGAAAAAGTGACCATGACCTGCA  
GCGCGAGCAGCAGCGTGACCTATATGCATTGGTTTTCAGCAGAAACCGGGCACCCAGCCGAAACTGTGGAT  
TTATAGCACCAGCATTCTGGCGAGCGGCGTGCCGGCGCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTAT  
AGCCTGACCATTAGCCGCATGGAAGCGGAAGATGCGGCGACCTATTATTGCCAGCAGCGCACCCAGCTATC  
CGCTGACCTTTGGCACCGGCACCAACTGGAAGTGAACGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTATCTGTT  
TCAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCGAGCGTGCTGCTGCTGAACAGCTTTTATCCG  
AAAGATATTAAAGTGAATGGAAGTGGATGGCGTGATTACAGGATACCGGCATTACAGGAAAGCGTGACCG  
AACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACCATGAGCAGCACCGAATATCTGAG  
CCATGAACTGTATAGCTGCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCTGATTAAGGCTTTTCAGCGC  
AGCGAATGCCAGCGCGTGGAT

30

SEQ ID NO: 4: キメラマウスーイヌ軽鎖アミノ酸配列 (3B10):

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVTYMHWFFQKPGTSPKLWIYSTSILASGVPARFSGSGSGTSY  
SLTISRMEAEDAATYYCQRTSYPLTFGTGTLKLELRNDAQPAVYLFQSPDQLHTGSASVCLLNSFYF

40

KDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSSLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSQR  
SECQRVD

SEQ ID NO: 5: キメラマウスーイヌ重鎖 DNA (8H5)

**CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGATGATCTGGTGAAACCGGGCGGAGCGTGAAACTGAGCTGCAAAG**  
**CGAGCGGCTATACCTTTACCAGCTATTGGATTAACCTGGATTAAACAGCGCCCGGGCCAGGGCCTGGAATG**  
**GATTGGCCGCATTGCGCCGGGCGAGCGGCACCACCTATTATAACGAAGTGTTTAAAGGCAAAGCGACCCTG**  
**ACCGTGGATAAATATAGCAGCACCGCGTATATTAGCTGAGCAGCCTGAGCAGCGAAGATAGCGCGGTGT**  
**ATTTTTGCGCGCGCGCGGATTATGGCAGCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC**  
GCGAG  
CACCACCGCGCGGAGCGTGTTCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGCAGCACCCTGGCGCTG  
GCGTGCTGGTGAGCGGCTATTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCAGCCTGACCAGCG  
GCGTGCTATACCTTTCCGAGCGTGTGTCAGAGCAGCGGCTGTATAGCCTGAGCAGCATGGTGACCGTGCC  
GAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGCAAAACCAAAGTGGAT  
AAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGGCCGCGTGCCGCGCCCGCGGATTGCCCCGAAATGCCCGGCGCCG  
AAATGCTGGGCGGCGGAGCGTGTATTATTTTCCGCCGAAACCGAAAGATACCCCTGCTGATTGCGCGCAG  
CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGAGATTAGCTGGTTTGTG  
GATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAACCCAGCCGCGCGAAGAAGTGTGCGGGCACCTATCGCGTGG  
TGAGCGTGTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTGCAAAGTGAACAACAA  
AGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCATCAGCCGAGCGTGTAT  
GTGCTGCCGCGGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCCTGATTAAAGATTTTT  
TTCCGCGGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAGCAAATATCGCACCAC  
CCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAACCTGAGCGTGGATAAAAGCCGCTGG  
CAGCGCGGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGTGCATAACCATTTATACCCAGGAAAGCC  
TGAGCCATAGCCCGGGCAA

10

20

SEQ ID NO: 6: キメラマウスーイヌ重鎖アミノ酸配列 (8H5):

**QVQLQQSGDDLVPKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWIKQRPQGLEWIGRIAPGSGTTYNEVFKGKATL**  
**TVDKYSSTAYIQLSSLSSEDSAVYFCARGDYGSYWGQGLTVTVSS**ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVAL  
ACLVSGYFPEPVTVSWNSGLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVD  
KVPVKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWV  
DGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVY  
VLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVEWQSNQGEPESESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRW  
QRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

SEQ ID NO: 7: キメラマウスーイヌ軽鎖 DNA (8H5):

**CAGATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGATTATGAGCGCGAGCCCGGGCGAAAAAGTGACCATGACCTGCA**  
**GCGCGAGCAGCAGCATTAGCTATATGCATTGGTTTCAGCAGAAACCGGGCACAGCCCGAAACGCTGGAT**  
**TTATGATACCAGCAAACCTGGCGAGCGGCGTGCCGCGCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTAT**  
**AGCCTGACCATTAACAGCATGGAAGCGGAAGATGCGGCGACCTATTATTGCCATCAGCGCACCAAGCTATC**  
**CGCTGACCTTTGGCGCGGGCACCAAACCTGGAACCTGAAACGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTATCTGTT**  
TCAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCGAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAGCTTTTATCCG  
AAAGATATTAACGTGAAATGGAAGTGGATGGCGTGATTAGGATACCGGCATTAGGAAAGCGTGACCG  
AACAGGATAGCAAAGATAGCCTATAGCCTGAGCAGCACCCTGACCATGAGCAGCACCGAATATCTGAG  
CCATGAACTGTATAGCTGCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCTGATTAAAGCTTTACGCGC  
AGCGAATGCCAGCGCGTGGAT

30

SEQ ID NO: 8: キメラマウスーイヌ軽鎖アミノ酸配列 (8H5):

**QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSISYMHWFQQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSY**  
**SLTINSMEAEDAATYYCHQRTSYPLTFGAGTKLELKR**NDAPAVYLFQPSPDQLHTGSASVCLLNSFY  
KDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSSLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSQR  
SECQRVD

40

SEQ ID NO: 9: キメラヒト-イヌ重鎖 DNA (411):

**CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCGGGCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGTGG**  
**CGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCCATGGCATGCAATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATG**  
**GGTGGCGGTGATTTGGTATGATGGCCGCAACAAATATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATT**  
**AGCCGCGATAACAGCAAAAACACCTGTTTTCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGT**  
**ATTATTGCGCGCGGCGGCCATTTTTGGCCCGTTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAG**  
**CAGCGCGAGCACCAACCGCGCCGAGCGTGTTCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAAGCGGCAGCACCC**  
**GTGGCGCTGGCGTGCTTGGTGGAGCGGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCAGCC**  
**TGACCAGCGGCGTGATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTATAGCCTGAGCAGCATGGT**  
**GACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGCAAAACC**  
**AAAGTGGATAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACGCGCGCTGCCGCGCCCGCGGATTGCCCCGAAATGCC**  
**CGGCGCCGAAATGCTGGGCGGCGGAGCGTGTATTTTTTCCGCCGAAACCGAAAGATACCTGCTGAT**  
**TGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGACAGATTAGC**  
**TGGTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAACCCAGCCGCGCGAAGAACAGTTTGCGGGCACCT**  
**ATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTGCAAAGT**  
**GAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCATCAGCCG**  
**AGCGTGATGTGCTGCCGCCGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCCTGATTA**  
**AAGATTTTTTTTCCGCCGGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAGCAAATA**  
**TCGCACCAACCCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAACTGAGCGTGGATAAA**  
**AGCCGCTGGCAGCGCGCGGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTTATACCC**  
**AGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAA**

10

SEQ ID NO: 10: キメラヒト-イヌ重鎖アミノ酸配列 (411)

**QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLVASGFTFSSGHMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGRNKYYADSVKGRFTI**  
**SRDNSKNTLFLQMNSLRLEDTAVYYCARGGHFGPFDYWGQGLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGST**  
**VALACLVSIFYPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFSPVLSGLYSLSSMVTVPSSRPSETFTCNVAHPASKT**  
**KVDKPVPKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQIS**  
**WFVDGKQMOTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQP**  
**SVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPDIDVEWQSNQEQEPESKYRTTPPQLDEDDGSYFLYSKLSVDK**  
**SRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK**

20

SEQ ID NO: 11: キメラヒト-イヌ軽鎖 DNA (411):

**GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAACCGCGGACCTGAGCTGCC**  
**GCGCGAGCCAGAGCATTAGCAGCAGCTTTCTGGCGTGGTATCAGCAGCGCCCGGGCAGGCGCGCGCT**  
**GCTGATTTATGGCGCGAGCAGCCGCGGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACC**  
**GATTTTACCCTGACCATTAGCCGCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGGCA**  
**CCAGCCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATTAAACGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTA**  
**TCTGTTTTAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAGCTTTT**  
**TATCCGAAAGATATTAACGTGAAATGGAAAGTGGATGGCGTGATTAGGATACCGGCATTAGGAAAGCG**  
**TGACCGAACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACCATGAGCAGCACCGAATA**  
**TCTGAGCCATGAACTGTATAGCTGCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCTGATTTAAAGCTTT**  
**CAGCGCAGCGAATGCCAGCGCGTGGAT**

30

SEQ ID NO: 12: キメラヒト-イヌ軽鎖アミノ酸配列 (411):

**EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSISSSFLAWYQQRPQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT**  
**DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPWTFGQGTKVEIKRNDAPAVYLFQPSPDQLHTGSASVCLLNSF**  
**YPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSTLMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSF**  
**QRSECQRVD**

40



10

20

30

40

CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGTGGTGGAAACCGGGCCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCACCG  
CGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGGCATGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATG  
GGTGGCGGTGATTTGGTATGATGGCAGCAACAAACATTATGCGGATAGCGGAAAGGCCGCTTTACCATT  
AGCCGCGATAACAGCAAAAACACCCGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATAACCGCGGTGT  
ATTATTGCGCGCGCGCGGGCTGCTGGGCTATTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAG  
CAGCGCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGCAGCACC  
GTGGCGCTGGCGTGCCTGGTGAGCGGCTATTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCAGCC  
TGACCAGCGGCGTGCATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCATGGT  
GACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGCAAAACC  
AAAGTGGATAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGCCGCGTGCCGCGCCCGCCGGATTGCCGAAATGCC  
CGGCGCCGGAATGCTGGGCGGCCGAGCGTGTATTTTCCGCCGAAACCGAAAGATACCCTGCTGAT  
TGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGAGATTAGC  
TGGTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAAACCGCCGCGCGAAGAACAGTTTTCGGGGCACCT  
ATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTGCAAAGT  
GAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCATCAGCCG  
AGCGTGTATGTGCTGCCGCCGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCCTGATTA  
AAGATTTTTTTCCGCCGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAGCAAATA  
TCGACCACCCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAACCTGAGCGTGGATAAA  
AGCCGCTGGCAGCGCGCGGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTATACCC  
AGGAAAGCCTGAGCCATAGCCGGGCAA

10

SEQ ID NO: 18: キメラヒト-イヌ重鎖アミノ酸配列 (611)

**QVQLVESGGGVPEPGRSRLSCTASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKHYSADSAKRFTI**  
**SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGLLGYFDYWGQGLTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGST**  
VALACLVSIFYPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRPSETFTCNVAHPASKT  
KVDKPVPKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQIS  
WFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQP  
SVYVLPSPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPDIDVEWQSNQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDK  
SRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

20

SEQ ID NO: 19: キメラヒト-イヌ軽鎖 DNA (611)

**GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAACGCGGACCCCTGAGCTGCC**  
**GCGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCCGCT**  
**GATTTATGGCGTGAGCAGCCGCGGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAT**  
**TTTACCCTGACCATTAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGGCATT**  
**GCCCGTTTACCTTTGGCCCGGGCACCAAAGTGGATATTAAACGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTATCT**  
GTTTCAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCGAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAGCTTTTAT  
CCGAAAGATATTAACGTGAAATGGAAAGTGGATGGCGTGATTCAGGATACCGGCATTACAGAAAGCGTGA  
CCGAACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCATGAGCAGCACCGAATATCT  
GAGCCATGAACTGTATAGCTGCCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCCCTGATTAAGCTTTTACG  
CGCAGCGAATGCCAGCGCGTGGAT

30

SEQ ID NO: 20: キメラヒト-イヌ軽鎖アミノ酸配列 (611)

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRPLIYGVSSRATGIPDRFSGSGSGTD**  
**FTLTISRLEPEDFAVYYCQYGISPFITFGPGTKVDIKRNDAPAVYLFQPSDQLHTGSASVCLLNSFY**  
PKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSSLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQ  
RSECQRVD

SEQ ID NO: 21: キメラヒト-イヌ重鎖 DNA (10D1)

40

CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCGGGCGCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGG  
CGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATACCATGCATTGGGTGCGCCAGGCGCGGGCAAAGGCCTGGAATG  
GGTGACCTTTATTAGCTATGATGGCAACAACAATATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATT  
AGCCGCGATAACAGCAAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGT  
ATTATTGCGCGCGCACCGGCTGGCTGGGCCCCGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAG  
CAGCGCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGCAGCACC  
GTGGCGCTGGCGTGCCCTGGTGAGCGGCTATTTTCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCAGCC  
TGACCAGCGGCGTGCATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTATAGCCTGAGCAGCATGGT  
GACCGTGCCGAGCAGCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGCAAAACC  
AAAGTGGATAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGCCGCGTGCCGCGCCCCGCCGATTGCCCGAAATGCC  
CGGCGCCGGAATGCTGGGCGGCCGAGCGTGTTCATTTTTTCGCCGAAACCGAAAGATACCCTGCTGAT  
TGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGACAGATTAGC  
TGGTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAAAACCCAGCCGCGCGAAGAACAGTTTGCGGGCACCT  
ATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTGCAAAGT  
GAACAACAAAGCGTGCCGAGCCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCATCAGCCG  
AGCGTGTATGTGCTGCCGCGGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGAGCCTGACCTGATTA  
AAGATTTTTTCCGCCGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGCCAGCAGGAACCGGAAAGCAAATA  
TCGCACCACCCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTCTGTATAGCAAACTGAGCGTGGATAAA  
AGCCGCTGGCAGCGCGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTATACCC  
AGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAAA

10

SEQ ID NO: 22. キメラヒト-イヌ重鎖アミノ酸配列 (10D1)

QVQLVESGGGVQPGRSRLSLCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTI  
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGWLGPFDYWGQTLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGST  
VALACLVSIFYPEPVTVSWNSGLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKT  
KVDKPVPKRENGRVP RPDPCKCPAPEMLGGPSVFI FPPKPKD TLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQIS  
WFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQP  
SVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVEWQNSGQQEPESKYRTTPPQLDEDEGSYFLYSKLSVDK  
SRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

20

SEQ ID NO: 23. キメラヒト-イヌ軽鎖 DNA (10D1)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGGCACCTTGAGCCTGAGCCCCGGGCGAACGCGCGACCTTGAGCTGCC  
GCGCGAGCCAGAGCGTGGGCAGCAGCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCT  
GCTGATTTATGGCGCGTTTTAGCCGCGCGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACC  
GATTTTACCCTGACCATTAGCCGCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTATGGCA  
GCAGCCCGTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATTAAAACGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTA  
TCTGTTTCAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCGAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAGCTTT  
TATCCGAAAGATATTAACGTGAAATGGAAAGTGGATGGCGTGATTCAGGATACCGGCATTGAGGAAAGCG  
TGACCGAACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACCATGAGCAGCACCGAATA  
TCTGAGCCATGAACGTATAGCTGCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCTGATTAAAAGCTTT  
CAGCGCAGCGAATGCCAGCGCGTGGAT

30

SEQ ID NO: 24. キメラヒト-イヌ軽鎖アミノ酸配列 (10D1)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGT  
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSSPWTFGQGTKVEIKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGSASVCLNSF  
YPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSF  
QRSECQRVD

SEQ ID NO: 25. キメラヒト-イヌ重鎖 DNA (1E2)

40

CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCGGGCGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGG  
CGAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGGCATGCATTGGGTGCGCCAGGCGCGGGCAAAGGCCTGGAATG  
GGTGGCGGTGATTTGGTATGATGGCAGCAACAAATATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCAT  
AGCCGCGATAACAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGT  
TTTATTGCGCGCGCGCGCCGAACATATTTGCGCGCTTTGATGTGTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGT  
GAGCAGCGCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTCCTGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGCAGC  
ACCGTGGCGCTGGCGTGCTGGTGGAGCGCTATTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCA  
GCCTGACCAGCGGCGTGCTACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTATAGCCTGAGCAGCAT  
GGTGACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGCAAA  
ACCAAAGTGATAAAACCGGTGCCGAAACGCGAAAACGCGCCGCTGCCGCGCCCGCCGATTGCCCGAAAT  
GCCCCGCGCCGGAATGCTGGGCGGCGCCGAGCGTGTATTTTTCCGCGGAAACCGAAAGATACCTTGCT  
GATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGAGATT  
AGCTGGTTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGGAAAACCCAGCCGCGCGAAGAACAGTTTGCGGGCA  
CCTATCGCGTGGTGGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTGCAA  
AGTGAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCGCAGCGCATCAG  
CCGAGCGTGATGTGCTGCCGCGGAGCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCCTGA  
TTAAAGATTTTTTTCCGCGGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGCCAGCAGGAACCGGAAAGCAA  
ATATCGCACCACCCCGCGCAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAACCTGAGCGTGGAT  
AAAAGCGCTGGCAGCGCGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTATA  
CCCAGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAAA

10

SEQ ID NO: 26: キメラヒトーイヌ重鎖アミノ酸配列 (1E2)

**QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSNKYYADSVKGRFTI**  
**SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVFYCARAPNYIGAEDVWGQGTMTVTVSS**ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGS  
TVALACLVSIFYPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASK  
TKVDKPVPKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDILLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQI  
SWFVDGKQMOTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQ  
PSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPDIDVEWQSNQQEPESKYRTTPPQLDEDGSIYFLYSKLSVD  
KSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

20

SEQ ID NO: 27: キメラヒトーイヌ軽鎖 DNA (1E2)

**GATATTTCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCC**  
**GCGCGAGCCAGGGCATTAGCAGCTGGCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGAAAAAGCGCCGAAAAGCCT**  
**GATTTATGCGGCGAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAT**  
**TTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTATAACAGCT**  
**ATCCGCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATTA**AAACGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTATCT  
GTTTCAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCGAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAGCTTTTAT  
CCGAAAGATATTAACGTGAAATGGAAAGTGGATGGCGTGATTCAGGATACCGGCATTTCAGGAAAGCGTGA  
CCGAACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACCATGAGCAGCACCGAATATCT  
GAGCCATGAACTGTATAGCTGCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCTGATTAAGCTTTTCAG  
CGCAGCGAATGCCAGCGCGTGGAT

30

SEQ ID NO: 28: キメラヒトーイヌ軽鎖アミノ酸配列 (1E2)

**DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD**  
**FTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKVEIK**RNDAPAVYLFQPSPDQLHTGSASVVCLLNSFY  
PKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSSLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQ  
RSECQRVD

SEQ ID NO: 29: キメラマウスーイヌ重鎖 DNA (3B3)

40

GAAGTGAAACTGGTGAACAGCGGCGGCGCCTGGTGCAGCCGGGCAACAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGA  
CCAGCGGCTTTACCTTTACCGATTTTATATGAGCTGGGTGCGCCAGCCGCCGGGCAAAGCGCTGGAATG  
GCTGGGCTTTGTGCGCAACCGCGCAACGGCTATACCACCGAATATAGCGTGAGCGTGAAAGCGCGCTTT  
ATTATTAGCCGCGATAAATTTAGAGACCCCTGTTTCTGCGAGATGAACACCCTGCGCGCGGAAGATAGCG  
GCACCTATTATTGCGTGCGCGCCCGGGCGATAACCGCGGATTATACCATGGATTATTGGGGCCAGGGCAC  
CAGCGTGACCGTGAGCAGCGCAGCACCACCGCGCGGAGCGTGTTTCCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGC  
ACCAGCGGCAGCACCGTGCGCTGGCGTGCCTGGTGAGCGGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCT  
GGAACAGCGGCAGCCTGACCAGCGGCGTGACATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGCCTGTATAG  
CCTGAGCAGCATGGTGACCGTGCCGAGCAGCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCAT  
CCGGCGAGCAAAACCAAAGTGATAAACCGGTGCCGAAACCGCAAAACGGCCGCGTGCCGCGCCCCGCCG  
ATTGCCCGAAATGCCCGGCGCGGAAATGCTGGGCGGCGCGAGCGTGTTTATTTTCCGCCGAAACCGAA  
AGATACCCTGCTGATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGGAAGATCCG  
GAAGTGCAGATTAGCTGGTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAAACCCAGCCGCGCAAGAAC  
AGTTTGGCGGCACCTATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACA  
GTTTACCTGCAAAGTGAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGCG  
CAGGCGCATCAGCCGAGCGTGATGTGCTGCCGCGGAGCCGCGAAGAAGTGAAGCAAAACACCGTGAGCC  
TGACCTGCCTGATTAAAGATTTTTCGCCCGGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGA  
ACCGGAAAGCAAATATCGCACCAACCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAA  
CTGAGCGTGGATAAAAGCCGCTGGCAGCGCGGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGC  
ATAACCATTATACCCAGGAAAGCTGAGCCATAGCCCGGGCAA

10

SEQ ID NO: 30. キメラマウスーイヌ重鎖アミノ酸配列 (3B3)

**EVKLVNSGGGLVQPGNSLRSLSCATSGFTFTDFYMSWVRQPPGKALEWLGFVRNRANGYTTEYSVSVKGRF**  
**IISRDNFQSTLFLQMNTRLRAEDSGTYCYVRGPGDTADYTMDYWGQGTSVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGS**  
TSGSTVALACLVSIFYPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSFTFCNVAH  
PASKTKVDKPVPKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFFPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDP  
EVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARG  
QAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQQEPESESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSK  
LSVDKSRWQRGDTFICAVMHLEALHNHYTQESLSHSPGK

20

SEQ ID NO: 31: キメラマウスーイヌ軽鎖 DNA (3B3)

**CAGGCGGTGGTGACCCAGGAAAGCGCGTTTACCACCAGCCCGGGCGGCACCGTGATTCTGACCTGCCGCA**  
**GCAGCACCGGCGCGGTGACCACCAACAATATGCGAACTGGGTGCAGGAAAAACCGGATCATCTGTTTAC**  
**CGGCCTGATTGGCGGCACCAAGCAACCGCGCGCCGGGCGTGCCGGTGCGCTTTAGCGGCAGCCTGATTGGC**  
**GATAAAGCGGCGCTGACCATTACCGGCGCGCAGACCGAAGATGATGGCATGTATTTTTCGCGCGCTGTGGT**  
**ATACCACCATTTTGTGTTTGGCGGCGGCACCAAAGTGACCGTGCTGGGCCAGCCGAAAGCGAGCCCGAG**  
CGTGACCCTGTTTCCGCCGAGCAGCGAAGAAGTGGGCGCGAACAAGCGACCCCTGGTGTGCCTGATTAGC  
GATTTTTATCCGAGCGGCGTGACCGTGGCGTGGAAGCGGATGGCAGCCCGATTACCCAGGCGTGGA  
CCACCAAACCGAGCAAACAGAGCAACAACAAATATGCGGCGAGCAGCTATCTGAGCCTGACCCCGGATAA  
ATGGAAGCCATAGCAGCTTTAGCTGCCTGGTGACCCATGAAGGCAGCACCGTGGAAGAAAAAGTGCGC  
CCGGCGGAATGCAGC

30

SEQ ID NO: 32: キメラマウスーイヌ軽鎖アミノ酸配列 (3B3)

**QAVVTQESAFTTSPGGTVILTCRSSTGAVTTNNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTSNRAPGVPVRFSGSLIG**  
**DKAALTITGAQTEDDGMFYFALWYTHFVFGGGTKVTVLGQPKASPSVTLFPPSSEELGANKATLVCLIS**  
DFYPSGVTVAWKADGSPITQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPDKWKSHSSFCLVTHEGSTVEKKVA  
PAECS

SEQ ID NO: 33: イヌ化 3B10 重鎖 DNA (VH1)

40

GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAACAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG  
CGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATAACATGGATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCGGCGGCTGGATTG  
GATGGGCAACATTAAACCCGAACAGCGAAAGCACCAGCTATAACCAAGAAATTTAAAGGCCGCGTGACCCTG  
ACCGCGGATACCAGCACCAGCACCAGCGGTATATGGAACAGAGCAGCCTGCGCGCGGGCGATATTGCGGTGT  
ATTATTGCACCCGCGATGGCAACCGCTATGATGCGTGGTTTTCGCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC  
CGTGAGCAGCGCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGC  
AGCACCCTGGCGCTGGCGTGCCCTGGTGAGCGGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCG  
GCAGCCTGACCAGCGCGTGCATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGCAG  
CATGGTGACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGC  
AAAACCAAAGTGGATAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGCCGCGTGCCGCGCCCGCGGATTGCCCGA  
AATGCCCGGCGCCGGAATGCTGGGCGGCGCGAGCGTGTTCGCTGGCGGAAACCGAAAGATAACCT  
GCTGATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGCGAG  
ATTAGCTGGTTTGTGGATGGCAACAGATGCAGACCGCGAAACCCAGCCGCGCGGAAGAAGAGTTTAACG  
GCACCTATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTG  
CAAAGTGAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCAT  
CAGCCGAGCGTGTATGTGCTGCCGCGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAAACCCGTGAGCCTGACCTGCC  
TGATTAAAGATTTTTTCCGCGGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAG  
CAAATATCGCACCACCCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTCTGTATAGCAAACCTGAGCGTG  
GATAAAAGCCGCTGGCAGCGCGCGGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATT  
ATACCCAGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAA

10

SEQ ID NO: 34. イヌ化 3B10 重鎖アミノ酸配列 (VH1)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQAPGAGLDWMGNINPENSESTSYNQKFKGRVTL  
TADTSTSTAYMELSSLRAGDIAVYYCTRDGNRYDAWFAYWGQGLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSG  
STVALACLVSIFYPEPVTVSWNSGLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPAS  
KTKVDKPVPKRENGRVPRPDCPKCPAPEMLGGPSVFI FPPKPKDILLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQ  
ISWFVDGKQMOTAKTQPREEQFNQTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAH  
QPSVYVLPSSREELSKNTVSLTCLIKDFPDPIDVEWQSNQEQEPESKYRTTPPQLDEDGSIYFLYSLSV  
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

20

SEQ ID NO: 35. イヌ化 3B10 重鎖 DNA (VH2)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAACAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG  
CGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATAACATGGATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCGCGAGCCTGGATTG  
GATTGGCAACATTAAACCCGAACAGCGAAAGCACCAGCTATAACCAAGAAATTTAAAGGCAAAGCGACCCCTG  
ACCGTGGATAAAAGCACCAGCACCAGCGGTATATGGAACAGAGCAGCCTGCGCGCGGGCGATATTGCGGTGT  
ATTATTGCACCCGCGATGGCAACCGCTATGATGCGTGGTTTTCGCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC  
CGTGAGCAGCGCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGC  
AGCACCCTGGCGCTGGCGTGCCCTGGTGAGCGGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCG  
GCAGCCTGACCAGCGCGTGCATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGCAG  
CATGGTGACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGC  
AAAACCAAAGTGGATAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGCCGCGTGCCGCGCCCGCGGATTGCCCGA  
AATGCCCGGCGCCGGAATGCTGGGCGGCGCGAGCGTGTTCGCTGGCGGAAACCGAAAGATAACCT  
GCTGATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGCGAG  
ATTAGCTGGTTTGTGGATGGCAACAGATGCAGACCGCGAAACCCAGCCGCGCGGAAGAAGAGTTTAACG  
GCACCTATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTG  
CAAAGTGAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCAT  
CAGCCGAGCGTGTATGTGCTGCCGCGGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAAACCCGTGAGCCTGACCTGCC  
TGATTAAAGATTTTTTCCGCGGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAG  
CAAATATCGCACCACCCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTCTGTATAGCAAACCTGAGCGTG  
GATAAAAGCCGCTGGCAGCGCGCGGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATT  
ATACCCAGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAA

30

40

SEQ ID NO: 36: イヌ化 3B10 重鎖アミノ酸配列 (VH2)

**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF****TDYNMDWVRQAPGASLDWIGNINPNSESTSYNQKFKGKATL**  
**TVDKSTSTAYMELSSLRAGDIAVYYCTRDGNRYDAWFAYWGQGT****LVTVSS****ASTTAPSVFPLAPSCGSTSG**  
STVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPAS  
KTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFI FPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQ  
ISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAH  
QPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSV  
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

SEQ ID NO: 37: イヌ化 3B10 重鎖 DNA (VH3)

**GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG**  
**CGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATAACATGGATTGGGTGCGCCAGGCGCATGGCGCGAGCCTGGATTG**  
**GATTGGCAACATTAAACCCGAACAGCGAAAGCACCAGCTATAACCAGAAATTTAAAGGCAAAGCGACCCTG**  
**ACCGTGGATAAAAGCACCAGCACC****CGCTATATGGA****ACTGAGCAGCCTGCGCGCGGGCGATATTGCGGTGT**  
**ATTATTGCACCCGCGATGGCAACCGCTATGATGCGTGGT****TTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAC**  
**CGTGAGCAGC****GCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTTCCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGC**  
AGCACCCTGGCGCTGGCGTGCCCTGGTGAGCGGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCG  
GCAGCCTGACCAGCGCGTGCCATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGCAG  
CATGGTGACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGC  
AAAACCAAAGTGGATAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGCCGCGTGCCGCGCCCGCGGATTGCCCCGA  
AATGCCCGCGCGCGGAAATGCTGGCGGCCCGAGCGTGTTTATTTTCCGCCGAAACCGAAAGATACCCT  
GCTGATTGCGCGCACCCCGAAAGTGACCTGCGTGCTGGTGATCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGCAG  
ATTAGCTGGTTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAAACCCAGCCGCGCGAAGAACAGTTTAACG  
GCACCTATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTG  
CAAAGTGAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCAT  
CAGCCGAGCGTGATGTGCTGCCGCCGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCC  
TGATTAAGATTTTTTCCGCCGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAG  
CAAATATCGCACCACCCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAACCTGAGCGTG  
GATAAAAGCCGCTGGCAGCGCGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATT  
ATACCCAGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAA

10

20

SEQ ID NO: 38. イヌ化 3B10 重鎖アミノ酸配列 (VH3)

**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF****TDYNMDWVRQAHGASLDWIGNINPNSESTSYNQKFKGKATL**  
**TVDKSTSTAYMELSSLRAGDIAVYYCTRDGNRYDAWFAYWGQGT****LVTVSS****ASTTAPSVFPLAPSCGSTSG**  
STVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPAS  
KTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFI FPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQ  
ISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAH  
QPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSV  
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

30

SEQ ID NO: 39: イヌ化 3B10 重鎖 DNA (VH4)

**GAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG**  
**CGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATAACATGGATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCGCGAGCCTGGATTG**  
**GATTGGCAACATTAAACCCGAACAGCGAAAGCACCAGCTATAACCAGAAATTTAAAGGCAAAGCGACCCTG**  
**ACCGTGGATAAAAGCACCAGCACC****CGCTATATGGA****ACTGCGCAGCCTGACCGCGGGCGATATTGCGGTGT**  
**ATTATTGCACCCGCGATGGCAACCGCTATGATGCGTGGT****TTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAC**  
**CGTGAGCAGC****GCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTTCCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGC**  
AGCACCCTGGCGCTGGCGTGCCCTGGTGAGCGGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCG  
GCAGCCTGACCAGCGCGTGCCATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGCAG  
CATGGTGACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGC

40

AAAACCAAAGTGGATAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACGGCCGCGTGCCGCGCCCGCCGGATTGCCCGA  
AATGCCCGGCGCCGGAATGCTGGGCGGCCGAGCGTGTTATTTTCCGCCGAAACCGAAAGATACCCCT  
GCTGATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGCAG  
ATTAGCTGGTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAAACCCAGCCGCGCGAAGAACAGTTTAACG  
GCACCTATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTG  
CAAAGTGAACAACAAAGCGTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCAT  
CAGCCGAGCGTGATGTGCTGCCGCCGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCC  
TGATTAAAGATTTTTTCCGCCGGATATTGATGTGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAG  
CAAATATCGCACCCCGCCGCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAACCTGAGCGTG  
GATAAAGCCGCTGGCAGCGCGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATT  
ATACCCAGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAAA

10

SEQ ID NO: 40: イヌ化 3B10 重鎖アミノ酸配列 (VH4)

**EVQLQQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMDWVRQAPGASLDWIGNINPNSESTSYNQKFKGKATL**  
**TVDKSTSTAYMELRSLTAGDIAVYYCTRDGNRYDAWFAYWGQGLVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTG**  
STVALACLVSIFYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPAS  
KTKVDKPVKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFI FPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQ  
ISWFDVGKQMOTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAH  
QPSVYVLPSSREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVEWQNSGQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSV  
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

SEQ ID NO: 41: イヌ化 3B10 軽鎖 DNA (VL1)

**GATATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACC**  
**GCGCGAGCAGCAGCGTGACCTATATGCATTGGTTTCGCCATAAACCGGGCCAGAGCCCGCAGAGCCTGAT**  
**TTATAGCACCAGCATTCTGGCGAGCGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTT**  
**ACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGATGATGCGGGCGTGATTATTGCCAGCAGCGCACCGCTATC**  
**CGCTGACCTTTGGCACCGGCACCAAACTGGAAGTGAACGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTATCTGTT**  
TCAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCGAGCGTGCGTGTGCCTGCTGAACAGCTTTTATCCG  
AAAGATATTAACGTGAAATGGAAAGTGGATGGCGTGATTGAGGATACCGGCATTGAGGAAAGCGTGACCG  
AACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCATGAGCAGCACCGAATATCTGAG  
CCATGAACTGTATAGCTGCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCCCTGATTAAAAGCTTTTCAGCGC  
AGCGAATGCCAGCGCGTGAT

20

SEQ ID NO: 42: イヌ化 3B10 軽鎖アミノ酸配列 (VL1)

**DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCSASSSVTYMHWFRHKPGQSPQSLIYSTSILASGVPDRFSGSGSGTDF**  
**TLKISRVEADDAGVYYCQQRSTSYPLTFGTGKLELKRNDAPAVYLFQPSPDQLHTGSASVCLNLSFYF**  
KDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQR  
SECQRVD

30

SEQ ID NO: 43: イヌ化 3B10 軽鎖 DNA (VL2)

**CAGATTGTGATGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACC**  
**GCGCGAGCAGCAGCGTGACCTATATGCATTGGTTTCAGCAGAAACCGGGCCAGAGCCCGCAGAGCCTGAT**  
**TTATAGCACCAGCATTCTGGCGAGCGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTT**  
**ACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGATGATGCGGGCGTGATTATTGCCAGCAGCGCACCGCTATC**  
**CGCTGACCTTTGGCACCGGCACCAAACTGGAAGTGAACGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTATCTGTT**  
TCAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCGAGCGTGCGTGTGCCTGCTGAACAGCTTTTATCCG  
AAAGATATTAACGTGAAATGGAAAGTGGATGGCGTGATTGAGGATACCGGCATTGAGGAAAGCGTGACCG  
AACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCATGAGCAGCACCGAATATCTGAG  
CCATGAACTGTATAGCTGCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCCCTGATTAAAAGCTTTTCAGCGC  
AGCGAATGCCAGCGCGTGAT

40



SEQ ID NO: 44: イヌ化 3B10 軽鎖アミノ酸配列 (VL2)

**QIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCSASSSVTYMHWFOQKPGQSPQSLIYSTSILASGVPDRFSGSGSGTDF**  
**TLKISRVEADDAGVYYCQORTSYPLTFGTGTKLELKR**NDAPAVYLFQPSDQLHTGSASVCLLNSFYF  
KDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSSLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQR  
SECQRVD

SEQ ID NO: 45: イヌ化 3B10 軽鎖 DNA (VL3)

**CAGATTGTGCTGACCCAGACCCCGCTGAGCCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACCGGCGAGCATTAGCTGCA**  
**GCGCGAGCAGCAGCGTGACCTATATGCATTGGTTTCAGCAGAAACCGGGCCAGAGCCCGAAAAGCTGGAT**  
**TTATAGCACCAGCATTCTGGCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTT**  
**ACCTGAAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGATGATGCGGGCGTGATATTATGCCAGCAGCGCACCGCTATC**  
**CGCTGACCTTTGGCACCAGGCACCAAACTGAACTGAAA**CGCAACGATGCGCAGCCGGCGGTGTATCTGTT  
TCAGCCGAGCCCGGATCAGCTGCATACCGGCAGCGCGAGCGTGCTGTGCCTGCTGAACAGCTTTTATCCG  
AAAGATATTAACTGAAATGGAAAGTGATGGCGTGATTTCAGGATACCGGCATTAGGAAAGCGTGACCG  
AACAGGATAGCAAAGATAGCACCTATAGCCTGAGCAGCACCTGACCATGAGCAGCACCGAATATCTGAG  
CCATGAACTGTATAGCTGCGAAATTACCCATAAAAGCCTGCCGAGCACCTGATTAAAGCTTTTCAGCGC  
AGCGAATGCCAGCGCTGGAT

10

SEQ ID NO: 46: イヌ化 3B10 軽鎖アミノ酸配列 (VL3)

**QIVLTQTPLSLSVSPGEPASISCSASSSVTYMHWFOQKPGQSPKSWIYSTSILASGVPDRFSGSGSGTDF**  
**TLKISRVEADDAGVYYCQORTSYPLTFGTGTKLELKR**NDAPAVYLFQPSDQLHTGSASVCLLNSFYF  
KDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDSKDYSLSSLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQR  
SECQRVD

20

SEQ ID NO: 59: イヌ化 3B10 重鎖 IgGBm DNA (VH1)

**GAAGTGCAGCTGGTGACAGCGGCGCGGAAGTGAACAAACCGGGCGGAGCGTGAAAGTGAAGCTGCAAG**  
**CGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATAACGATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCGCGGCGCTGGATTG**  
**GATGGGCAACATTAAACCCGAACAGCGAAAGCACCAGCTATAACCAGAAATTTAAAGGCCGCGTGACCTG**  
**ACCGCGGATACAGCACAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCGCGGGCGATATTGCGGTGT**  
**ATTATTGCACCCGCGATGGCAACCGCTATGATGCGTGGTTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAC**  
**CGTGAGCAGCGCGAGCACACCGCGCGGAGCGTGTTTCCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACAGCGGC**  
AGCACCGTGCGCTGGCGTGCTGGTGAGCGGCTATTTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCG  
GCAGCCTGACAGCGGCGTGATACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGCAG  
CATGGTGACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGC  
AAAACCAAAGTGATAAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGCCGCGTGCCGCGCCCGCGGATTGCCCCGA  
AATGCCCGGCGCGGAAATGCTGGGCGGCGCGAGCGTGTTTATTTTCCGCCGAAACCGAAAGATACCTT  
GCTGATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGCAG  
ATTAGCTGGTTTGTGGATGGCAACAGATGCAGACCGCGAAACCCAGCCGCGCGAAGAACAGTTTGCCG  
GCACCTATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTG  
CAAAGTGAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCAT  
CAGCCGAGCGTGATGTGCTGCCGCGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCC  
TGATTAAAGATTTTTTTCCGCCGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAG  
CAAATATCGCACCAACCCCGCGCAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAAGTGAAGCTG  
GATAAAAGCCGCTGGCAGCGCGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCAT  
ATACCCAGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAA

30

SEQ ID NO: 60: イヌ化 3B10 重鎖 IgGBm アミノ酸配列 (VH1)

**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYNMDWVRQAPGAGLDWMGNINPNSESTSYNQKFKGRVTL**  
**TADTSTSTAYMELSSLRAGDIAVYYCTRDGNRYDAWFAYWGQGLVTVSS**ASTTAPSVFPLAPSCGSTSG  
STVALACLVSIFYPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPAS

40

KTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFI FPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQ  
ISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAH  
QPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSV  
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

SEQ ID NO: 61: イヌ化 3B10 重鎖 IgGBm DNA (VH2)

**GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG**  
**CGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATAACATGGATTGGGTGCGCCAGGCGCGGGCGCGAGCCTGGATTG**  
**GATTGGCAACATTAACCCGAACAGCGAAAGCACCAGCTATAACCAGAAATTTAAAGGCAAAGCGACCCTG**  
**ACCGTGGATAAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAC TGAGCAGCCTGCGCGCGGGCGATATTGCGGTGT**  
**ATTATTGCACCCGCGATGGCAACCGCTATGATGCGTGGTTTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC**  
**CGTGAGCAGC**GCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTTCCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGC  
AGCACCGTGGCGCTGGCGTGCTGCTGGTGAGCGGCTATTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCG  
GCAGCTGACCAGCGGCGTGCTACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTATAGCCTGAGCAG  
CATGGTGACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGC  
AAAACCAAAGTGATATAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGCCGCGTGCCGCGCCCGCCGGATTGCCCGA  
AATGCCCGCGCCGGAATGCTGGGCGGCCCGAGCGTGTTTATTTTCCGCGGAAACCGAAAGATACCCT  
GCTGATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGCAG  
ATTAGCTGGTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAACCCAGCCGCGCAAGAACAGTTTGCCG  
GCACCTATCGCGTGGTGAGCGTGCTGCCGATTGGCCATCAGGATTGGCTGAAAGGCAAACAGTTTACCTG  
CAAAGTGAACAACAAAGCGCTGCCGAGCCCGATTGAACGCACCATTAGCAAAGCGCGCGGCCAGGCGCAT  
CAGCCGAGCGTGATGTGCTGCCGCGGAGCCGCGAAGAACTGAGCAAAAACACCGTGAGCCTGACCTGCC  
TGATTAAAGATTTTTTCCGCGGATATTGATGTGGAATGGCAGAGCAACGGCCAGCAGGAACCGGAAAG  
CAAATATCGCACCCCGCCGAGCTGGATGAAGATGGCAGCTATTTTCTGTATAGCAAACCTGAGCGTG  
GATAAAAGCCGCTGGCAGCGCGCGATACCTTTATTTGCGCGGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATT  
ATACCCAGGAAAGCCTGAGCCATAGCCCGGGCAA

10

20

SEQ ID NO: 62: イヌ化 3B10 重鎖 IgGBm アミノ酸配列 (VH2)

**EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF****FTDYNMDWVRQAPGASLDWIGNINPNSESTSYNQKFKGKATL**  
**TVDKSTSTAYMELSSLRAGDIAVYYCTRD****GNRYDAWFAYWGQGLVTVSS****ASTTAPSVFPLAPSCGSTSG**  
STVALACLVSIFYPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPAS  
KTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFI FPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQ  
ISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAH  
QPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSV  
DKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK

SEQ ID NO: 63: イヌ化 3B10 重鎖 IgGBm DNA (VH3)

**GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAG**  
**CGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATAACATGGATTGGGTGCGCCAGGCGCATGGCGCGAGCCTGGATTG**  
**GATTGGCAACATTAACCCGAACAGCGAAAGCACCAGCTATAACCAGAAATTTAAAGGCAAAGCGACCCTG**  
**ACCGTGGATAAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAC TGAGCAGCCTGCGCGCGGGCGATATTGCGGTGT**  
**ATTATTGCACCCGCGATGGCAACCGCTATGATGCGTGGTTTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGAC**  
**CGTGAGCAGC**GCGAGCACCACCGCGCCGAGCGTGTTTCCGCTGGCGCCGAGCTGCGGCAGCACCAGCGGC  
AGCACCGTGGCGCTGGCGTGCTGCTGGTGAGCGGCTATTTCCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACAGCG  
GCAGCTGACCAGCGGCGTGCTACCTTTCCGAGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTATAGCCTGAGCAG  
CATGGTGACCGTGCCGAGCAGCCGCTGGCCGAGCGAAACCTTTACCTGCAACGTGGCGCATCCGGCGAGC  
AAAACCAAAGTGATATAACCGGTGCCGAAACGCGAAACCGCCGCGTGCCGCGCCCGCCGGATTGCCCGA  
AATGCCCGCGCCGGAATGCTGGGCGGCCCGAGCGTGTTTATTTTCCGCGGAAACCGAAAGATACCCT  
GCTGATTGCGCGCACCCCGGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGCTGGATCCGGAAGATCCGGAAGTGCAG  
ATTAGCTGGTTTGTGGATGGCAAACAGATGCAGACCGCGAAACCCAGCCGCGCGCAAGAACAGTTTGCCG

30

40

SEQ ID NO: 64: イヌ化 3B10 重鎖 IgGBm アミノ酸配列 (VH3)

10

20

30

40

GGCGAGCAGCCGCGGCGTGGCGAGCTTTGTGTGCGAATATGGCAGCAGCGGCAACGCGGCGGAAGTGCGC  
GTGACCGTGCTGCGCCAGGCGGGCAGCCAGATGACCGAAGTGTGCGCGGCGACCTATACCGTGGAAGATG  
AACTGGCGTTTTCTGGATGATAGCACCTGCACCGGCACCGAGCAGCGGCAACAAAGTGAACCTGACCATTCA  
GGGCTTGC GCGCGATGGATACCGGCCTGTATATTTGCAAAGTGGAAGTGTATATCCGCGCGCGTATTAT  
GTGGGCATGGGCAACGGCACCCAGATTTATGTGATTGATCCGGAACCGTGCCCGGATAGCGATTTTCTGC  
TGTGGATTCTGGCGGCGGTGAGCAGCGGCCTGTTTTTTTATAGCTTTCTGATTACCGCGGTGAGCCTGAG  
CAAAATGCTGAAAAAACGCAGCCCGCTGACCACCGGCGTGTATGTGAAAATGCCGCGGACCGAACC GGAA  
TGCGAAAAACAGTTTCAGCCGTATTTTATTCCGATTAAC

SEQ ID NO: 68: イヌ CTLA-4 AA 配列 (NCBI 参照配列: NP\_001003106).

MAGFGFRRHGAQPDLASRTWPCTALFSLLFIPVFSKGMHVAQPAVVLAASSRGVASFVCEYGSSGNAAEVR  
VTVLRQAGSQMTEVCAATYTTVEDELAFLDDSTCTGTSSGNKVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPPYY  
VGMNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWLWILAAVSSGLFFYSFLITAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPEPE  
CEKQFQPYFIPIN

SEQ ID NO: 69: イヌ IgG B の遺伝子組換え cFc 領域 (U.S. 10,106,107 B2 から)

LGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVS  
VLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSSREELSKNTVSLTCLIKDFFP  
PDIDVEWQSNQGQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLS  
HSPGK

【 0 1 3 6 】

上記ヌクレオチド配列の全てにおいて、可変領域は太字で示されており、対応するアミノ酸配列においては、可変領域に関する配列は太字で示されており、及び、C D R は下線が引かれており且つ太字で示されている。

10

20

30

40

50

## 【図面】

## 【図 1】

Figure 1

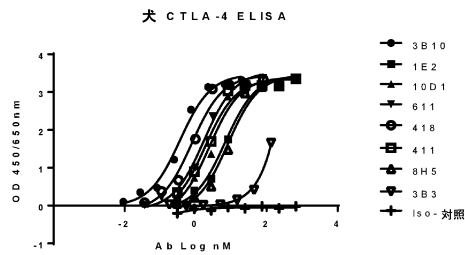


図 1. 選択されたキメラ抗体とイスCTLA-4の結合活性

## 【図 2】

Figure 2

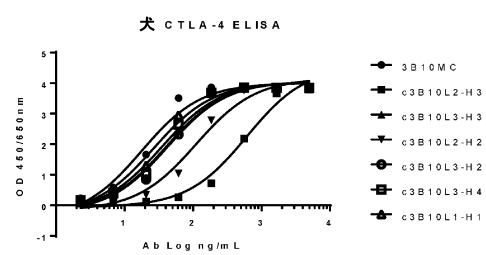


図 2. イソ化抗体とイスCTLA-4の結合活性

10

## 【図 3】

Figure 3

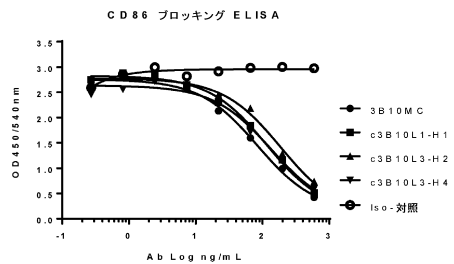
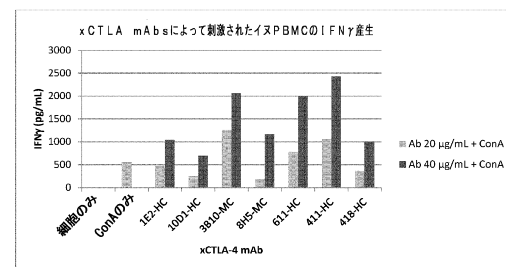


図 3. イソ化3B10抗体はイスCD86とCTLA-4の相互作用をブロックすることができる

## 【図 4】

Figure 4

図 4. 選択された抗体はイスPBMC細胞を活性化させてIFN $\gamma$ を産生させることができる。  
MC: マウス-イヌキメラ; HC: ヒト-イヌキメラ。

20

## 【図 5】

Figure 5

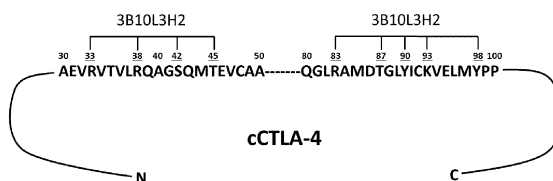


図 5. イヌCTLA-4上の3B10L3H2のエピトープは架橋される。抗体と相互作用する残基の番号に下線が引かれている

30

## 【配列表】

0007695228000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
		A 6 1 K	39/395	U

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 モーザー, モハマド

アメリカ合衆国、ノースイースト・ネブラスカ・6 8 0 2 2、エルクホーン、ウエスト・センター・ロード・2 1 4 0 1

(72)発明者 チャン, ユアンチョン

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・0 7 0 3 3、ケニルワース、ギャロッピング・ヒル・ロード・2 0 0 0

(72)発明者 ターピー, イアン

イギリス国、ミルトン・ケインズ・バッキンガムシャー・エムケー7・7エージェー、ウォルトン・マナー・ウォルトン

審査官 福澤 洋光

## (56)参考文献

特表2 0 1 4 - 5 1 2 8 0 9 ( J P , A )  
 特表2 0 1 9 - 5 0 6 1 4 6 ( J P , A )  
 特表2 0 1 7 - 5 0 0 8 6 7 ( J P , A )  
 特表2 0 1 7 - 5 3 4 2 6 7 ( J P , A )  
 国際公開第2 0 1 7 / 0 6 2 6 1 5 ( W O , A 2 )  
 PLoS ONE , 2018年 , Vol.13, No.7: e0201222 , pp.1-14

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
 C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0  
 C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E / E M B A S E ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 U n i P r o t / G e n e S e q  
 P u b M e d