

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-515243

(P2004-515243A)

(43) 公表日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	G 4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	J 4 B O 6 5
A 6 1 P 37/00	A 6 1 K 39/395	U 4 C O 8 4
A 6 1 P 37/06	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 134 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-549291 (P2002-549291)	(71) 出願人	000005245 藤沢薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
(86) (22) 出願日	平成13年12月14日 (2001.12.14)	(74) 代理人	100109542 弁理士 田伏 英治
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月13日 (2003.6.13)	(72) 発明者	ツォー・ジェイ・ヤン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 025 メンロ・パーク オーク・ブロー ブアベニュー #16 445番地
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/047955	(72) 発明者	ヒントン・ポール アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 085 サニーベール ダンスミューテ ル #4 321番地
(87) 国際公開番号	W02002/047721		
(87) 国際公開日	平成14年6月20日 (2002.6.20)		
(31) 優先権主張番号	60/255, 155		
(32) 優先日	平成12年12月14日 (2000.12.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイレント抗CD28抗体およびその使用

(57) 【要約】

本発明は分裂促進活性を欠く抗CD28抗体(サイレント抗CD28抗体)、それを製造する方法、それを含有する組成物、ならびに免疫抑制方法、T細胞寛容誘導方法、および臓器および/または組織移植拒絶治療法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サイレント抗 CD 28 抗体。

【請求項 2】

キメラ抗体である請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】

ヒト化抗体である請求項 1 記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号 2 または配列番号 4 記載のアミノ酸配列を含む可変領域を有する請求項 1 記載の抗体。

10

【請求項 5】

配列番号 2 および配列番号 4 記載のアミノ酸配列を含む可変領域を有する請求項 1 記載の抗体。

【請求項 6】

配列番号 6 または配列番号 8 記載のアミノ酸配列を含む可変領域を有する請求項 1 記載の抗体。

【請求項 7】

配列番号 6 および配列番号 8 記載のアミノ酸配列を含む可変領域を有する請求項 1 記載の抗体。

【請求項 8】

請求項 1 記載の抗体をエンコードするポリヌクレオチド。

20

【請求項 9】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、および配列番号 4 からなる群より選択される少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含む請求項 8 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 10 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

30

【請求項 13】

サイレント抗 CD 28 抗体の発現に適した条件下に請求項 11 記載の宿主細胞を培養し、発現した抗体を当該培養物から回収することを含まサイレント抗 CD 28 抗体の製造法。

【請求項 14】

サイレント抗 CD 28 抗体の発現に適した条件下に請求項 12 記載の宿主細胞を培養し、発現した抗体を当該培養物から回収することを含まサイレント抗 CD 28 抗体の製造法。

【請求項 15】

請求項 8 記載のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入し、該宿主細胞をサイレント抗 CD 28 抗体の発現に適した条件下に培養し、次いで、発現した抗体を当該培養物から回収することを含まサイレント抗 CD 28 抗体の製造法。

40

【請求項 16】

当該ポリヌクレオチドが配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、および配列番号 4 からなる群より選択される少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含む請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

請求項 10 記載の発現ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞をサイレント抗 CD 28 抗体の発現に適した条件下に培養し、次いで、発現した抗体を当該培養物から回収することを含まサイレント抗 CD 28 抗体の製造法。

【請求項 18】

請求項 1 記載のサイレント抗 CD 28 抗体および医薬的に許容し得る成分を含む医薬組成物。

50

【請求項 19】

患者にT細胞寛容を誘導する方法であって、当該患者にT細胞寛容を誘導するために、請求項1記載の抗体の有効量投与を含む方法。

【請求項 20】

当該投与がさらにもう1種の免疫抑制剤を投与することを含む請求項19記載の方法。

【請求項 21】

患者に免疫抑制力を与える方法であって、当該患者に免疫抑制力を与えるために、請求項1記載の抗体の有効量投与を含む方法。

【請求項 22】

当該投与がさらにもう1種の免疫抑制剤を投与することを含む請求項21記載の方法。

10

【請求項 23】

患者の臓器もしくは組織移植の拒絶を治療する方法であって、当該患者の臓器もしくは組織移植の拒絶を治療するために、該抗体の有効量投与を含む方法。

【請求項 24】

当該投与がさらにもう1種の免疫抑制剤を投与することを含む請求項23記載の方法。

【請求項 25】

HuTN228およびMuTN228およびそのFabフラグメントおよびそのF(ab)₂フラグメントからなる群より選択される抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

(技術分野)

本発明は分裂促進活性を欠く抗CD28抗体およびその使用に関する。

【0002】

(背景技術)

免疫反応、特に臓器移植拒絶反応は主にTリンパ球の活性化によるものである。このT細胞の活性化は抗原提示細胞(APC)からのシグナルにより誘導される。APCからのシグナルはT細胞レセプター(TCR)を経由する第一シグナルと共刺激性分子を経由する第二シグナル(共刺激性シグナル)からなる。第一シグナルはペプチド抗原の主要組織適合性抗原(MHC)複合体からのものであり、その場合APCはTCRを介してT細胞抗原を提示する。第二シグナルには数種の共刺激性分子が介在するが、その例として、B7(B7-1(CD80)およびB7-2(CD86))がAPC側のリガンドとして、またCD28、CTLA-4などがT細胞側のレセプターとして知られている。リガンドB7は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖タンパク質であり、抗原提示細胞群に属するB細胞などで発現される。共通のリガンドとしてB7を認識するCD28とCTLA-4は共に免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜透過性糖タンパク質である。従って、T細胞の活性化は、TCRを介する第一シグナルと、例えば、B7およびCD28/CTLA-4からの第二シグナルの同時伝達により調整される。B7からCD28へのシグナルはT細胞活性化を促進し、一方、B7からCTLA-4へのシグナルは活性化を阻害することが知られている[Waterhouse et al., Science, 270: 985-988 (1995)]。

30

40

【0003】

これまで、免疫抑制または寛容を目的として、CTLA-4Ig、抗B7-1抗体/抗B7-2抗体、または抗CD28抗体などを投与することにより、B7-CD28シグナルをブロックすることが試みられてきた。例えば、CTLA-4IgはB7に結合し、それによってB7とCD28との間の反応を阻害し、結果としてCD28からのシグナルをブロックして免疫抑制活性を示す。しかし、B7とCTLA-4との間の反応もまた同時に阻害されるので、T細胞の活性化にマイナスに働くCTLA-4のシグナルが抑制されて、結果として所望の寛容は誘導されないこととなる(Kirk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8789-8794 (1997))。抗B7抗体も調製されており、T細胞の活性化を抑制すると報告されているが、CT

50

L A - 4 I g の場合のように、同様に C T L A - 4 シグナルを抑制した。抗 C D 2 8 抗体は、インビトロの実験において、T細胞に分裂促進作用を生じることが判明したが、この抗体による刺激と抗 C D 3 抗体との組み合わせがT細胞の増殖と活性化を促進し、サイトカインの産生を上昇させた [W O 9 0 / 0 5 5 4 1 ; E u r . J . I m m u n o l o g y , 1 6 , 1 2 8 9 - 1 2 9 6 (1 9 8 6) 、 等] 。さらに、抗 C D 2 8 抗体による T 細胞 C D 2 8 レセプターの分裂促進刺激作用がインビトロで刺激され、その結果、第二シグナル同様の B 7 から C D 2 8 への T 細胞活性化シグナルが生成する [Y i n e t a l . , J . I m m u n o l o g y , 1 6 3 : 4 3 2 8 - 4 3 3 4 (1 9 9 9)] 。これらの T 細胞活性化機能は、抗 C D 2 8 抗体が癌および A I D S の治療に免疫増強剤として使用し得ることを示唆した (W O 9 0 / 0 5 5 4 1) 。

10

【 0 0 0 4 】

(発明の開示)

常套の技法により調製される抗 C D 2 8 抗体は、T細胞に分裂促進作用を及ぼす。この分裂促進活性の理由は、完全には理解されてはいないが、抗 C D 2 8 F c 領域が抗原提示細胞の F c レセプターに結合するとするのが、妥当な理由と信じられる (C o l e e t a l . , J . I m m u n o l o g y , 3 6 : 1 5 9 (1 9 9 7)) 。それ故、我々は遺伝子工学の技法を利用することで、抗 C D 2 8 抗体の F c レセプター結合部位に変異を導入して抗体を改変し、分裂促進活性を示さないようにした。本発明者が生成させたかかる抗体の一つが T N 2 2 8 I g G 2 M 3 であり、ここでの I g G 2 M 3 は I g G 遺伝子に 2 つのアミノ酸置換を有する。さらに、我々は得られたサイレント抗 C D 2 8 抗体は分裂促進活性を示さず、T細胞寛容の誘導に非常に有用であることを証明した。

20

【 0 0 0 5 】

従って、本発明は分裂促進活性を持たない抗 C D 2 8 抗体 (以下、サイレント抗 C D 2 8 抗体という) 、および当該抗体を使用することによる免疫反応の抑制方法、特に、移植拒絶の抑制方法、ならびに免疫寛容の誘導方法を提供する。

【 0 0 0 6 】

本発明の目的はサイレント抗 C D 2 8 抗体にあり、この場合の抗 C D 2 8 抗体はキメラ抗体および / またはヒト化抗体であってもよい。抗 C D 2 8 抗体の可変領域は配列番号 2 、 4 、 6 および 8 に示されるアミノ酸配列ならびにかかるアミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチドを包含する。例えば、かかるポリヌクレオチドは配列番号 1 、 3 、 5 、 および 7 のものである。

30

【 0 0 0 7 】

本発明のさらなる目的は、抗 C D 2 8 抗体をエンコードするポリヌクレオチドを含むベクターおよび宿主細胞にある。

【 0 0 0 8 】

本発明のさらなる目的は、サイレント抗 C D 2 8 抗体の製造法であって、該抗 C D 2 8 抗体をエンコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、該ポリヌクレオチドの発現を可能とする条件下に培養し、産生された遺伝子産物を収集することからなる方法にある。

【 0 0 0 9 】

本発明のさらなる目的は、1種以上のサイレント抗 C D 2 8 抗体を含む医薬組成物、好ましくは1種以上の医薬的に許容し得る成分と混合した医薬組成物にある。

40

【 0 0 1 0 】

サイレント抗 C D 2 8 抗体は T 細胞寛容の誘導、免疫抑制のために、また臓器もしくは組織移植拒絶の予防 / 治療用薬として有用である。従って、本発明は 1 種以上のサイレント抗 C D 2 8 抗体を哺乳動物に投与することによる、T細胞寛容の誘導、免疫抑制の方法、また臓器もしくは組織移植拒絶に際しての予防もしくは治療の方法を提供する。好ましくは、かかるサイレント抗 C D 2 8 抗体は本明細書記載の医薬組成物として投与するが、さらに適切な場合にはさらなる医薬 / 薬剤を含んでもよい。

【 0 0 1 1 】

(発明を実施するための最良の形態)

50

本発明に関連する用語“サイレント抗CD28抗体”は分裂促進活性を欠く抗CD28抗体を意味する。より詳しくは、該抗体はT細胞表面上の抗原CD28レセプターに特異的に結合するが、抗CD3抗体と組み合わせさせた刺激によるT細胞の増殖または活性化を促進することはない抗体である。

【0012】

サイレント抗CD28抗体は抗CD28抗体または抗CD28抗体産生ハイブリドーマに基づき、アゴニストの抗CD28抗体を遺伝子工学技法または化学修飾により変異または改変させることにより構築することができる。一例として遺伝子工学技法を採る場合、Fcレセプターに対する抗CD28抗体の結合親和性は、該抗体のFcドメインのアミノ酸配列に変異を導入することにより削減または除去することができる。例えば、サイレント抗CD28抗体は、抗CD28モノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ細胞からcDNAを単離し、Fcレセプターへの結合において重要な役割を果たすFcドメインに対応する配列領域に変異を導入することにより入手することができる(WO88/07089)。変異の部位には、Fcレセプターへの結合が阻害され得る限りにおいて特に制限はない。従って、IgGクラスの抗体の場合には、例えば、H-鎖アミノ酸残基234、235、236、237、318、320および322が好適であり、サイレント抗CD28抗体はこれらアミノ酸の少なくとも1個を異なるアミノ酸で置換することにより構築することができる。

10

【0013】

かかるサイレント抗CD28抗体の起源は該抗体を使用する動物を考慮して選択することができる。例えば、非ヒトモノクローナル抗体はかなり広い範囲でヒトに抗原性を示すアミノ酸配列を含んでいる。外来抗体を注射した後の該抗体に対するヒトの免疫応答は甚だしく強力であり、抗体を投与した途端に患者を危険な状態とするか、またはその抗体の治療効果が無効となる。従って、該抗体を治療標的動物にとって、比較的相同性の高いFc領域に置き換えるか、可変領域の枠組み部分を置き換えるか、または標的動物の抗体遺伝子を導入したトランスジェニック動物から得られた抗体を使用することが推奨される。例えば、抗体がヒトに投与するものである場合、Fc領域を置換して利用し得るキメラ抗体(EP125023)、枠組み部分を置き換えたヒト化抗体(EP0239400、EP045126)またはヒト抗体遺伝子を導入したトランスジェニック動物から得られるヒト抗体(EP546073、W97/07671)などである。上記のような遺伝子工学技法または化学修飾により、これらの抗体に変異を導入することによって、抗体の分裂促進活性を削減または除去することができる。

20

30

【0014】

サイレントFc領域を有する抗CD28抗体の具体例としては、本明細書の実施例に記載した抗体のみではなく、治療標的動物の定常領域遺伝子と配列番号2および4または配列番号6および8に示した可変領域のアミノ酸配列に基づく可変領域ポリヌクレオチドとを用いて合成的に調製した抗体も例示することができる。かかるポリヌクレオチドの例は配列番号1、3、5、および7である。

【0015】

本発明のより具体的な例はHuTN228とMuTN228およびそのFabフラグメント、そのF(ab)'₂フラグメント、その誘導体などである。

40

【0016】

当業者周知のように、第三塩基の縮重のために、殆どすべてのアミノ酸はコードするヌクレオチド配列の少なくとも1組のトリプレットコドンにより表すことが可能である。さらに、マイナーな塩基対の変化は、エンコードされたアミノ酸配列に変化(同類置換)をもたらし得るかもしれないが、必ずしも遺伝子産物の生物学的活性を実質的に変えるとは予期できない。このように、本明細書に開示したようなタンパク質またはペプチドをエンコードする核酸配列は、僅かに配列が改変され得る(例えば、トリプレットコドンのヌクレオチドの置換)が、改変されてもなお、この核酸配列は、同じアミノ酸配列である遺伝子産物をエンコードし続ける。

50

【0017】

“発現ベクター”という用語は、本発明のペプチドをエンコードし、選択された宿主細胞においてその発現に必要な配列を提供するポリヌクレオチドをいう。発現ベクターは一般に転写プロモーターとターミネーターを含有するか、または内在性のプロモーターに隣接して組み込まれる。発現ベクターは通常プラスミドであり、さらに複製の開始点及びひとつ又は複数の選択可能なマーカを含む。しかし、発現ベクターは、あるいは宿主に感染するように設計したウイルス組換え体であってもよいし、または宿主ゲノム内の好適な部位に組み込まれるように設計した組込みベクターでもよい。発現ベクターの例は“分子クローニング：実験室マニュアル、第二版、サムブルーク、フリッシュ、およびマニアティス、コールドスプリングハーバー・ラボラトリープレス、1989”に開示されている。

10

【0018】

サイレント抗CD28抗体の発現に適した宿主細胞は、原核生物、酵母、古細菌、および他の真核細胞である。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞性宿主にて使用するのに適したクローニング発現ベクターは技術上周知であり、例えば、パウエルス(Pouwells)ら、クローニング・ベクター：実験室マニュアル、エルスヴィア、ニューヨーク(1985)に記載されている。好ましくは、該細胞は哺乳動物細胞である。該ベクターはプラスミドベクター、一本鎖または二本鎖ファージベクター、または一本鎖または二本鎖RNAまたはDNAウイルスベクターなどである。かかるベクターは、DNAおよびRNAを細胞に導入するための周知方法により、ポリヌクレオチド、好ましくはDNAとして細胞に導入することができる。該ベクターは、ファージおよびウイルスベクターの場合、感染と形質移入の周知技法により、パッケージウイルスまたは莢膜ウイルスとして細胞に導入することが可能であり、そうするのが好ましい。ウイルスベクターは複製可能なものであっても複製不可能なものであってもよい。後者の場合、ウイルスの増殖は一般に相補性宿主細胞においてのみ起こる。無細胞翻訳系も、存在するDNA構築物から誘導したRNAを使用して、タンパク質の産生に採用することができた。

20

【0019】

サイレント抗CD28抗体/タンパク質は、タンパク質化学の分野で一般的に知られるタンパク質に対する単離/精製方法により精製することができる。より詳しくは、例えば、抽出、再結晶、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどによる塩析、遠心分離、透析、限外濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過法、ゲル透過クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、電気泳動、向流分配など、およびこれらの組み合わせが例示し得る。

30

【0020】

本発明によると、精製した抗体は上記の組換え発現系によって産生させることができる。該方法は、該タンパク質をエンコードするDNA配列を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞を、該タンパク質の発現を促進するのに十分な条件下で培養することからなる。該タンパク質は次いで使用した発現系に応じて培地または細胞抽出物から回収する。当業者周知のように、組換えタンパク質の精製手法は、採用した宿主細胞のタイプ、また組換えタンパク質が培地に分泌されているかどうかなどのファクターによって変わり得る。

40

【0021】

医薬組成物に製剤化したサイレント抗CD28抗体は、(a)臓器または組織の移植、例えば、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、皮膚、角膜、肺、すい臓、小腸、筋肉、神経などの移植後の拒絶反応；(b)骨髄移植における移植片対宿主反応；(c)リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、I型糖尿病などの自己免疫疾患；および(d)喘息、アトピー性皮膚炎などの免疫性疾患、に使用することができる。

【0022】

サイレント抗CD28抗体はそれ自体が免疫反応および移植拒絶反応を抑制し、免疫寛容を誘導すると期待されるが、他の薬物と合わせて使用することも可能である。サイレント抗CD28抗体との組合せに有用なかかる他の薬物の中では、種々の免疫抑制剤、例え

50

ば、ラパマイシン、デオキシスパ - ガウリン、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、プログラフィ、サイクロスポリンA、抗IL2抗体、抗IL2レセプター抗体、抗IL12抗体、抗IL12レセプター抗体、およびMMFなどが挙げられる。ラパマイシンは取分けIL2レセプターからのシグナルの中で、T細胞の増殖に関係するシグナルの伝達を阻害するが、アポトーシス関連のシグナルの伝達は阻害しないので、CD28シグナルの特異的阻害剤と組合わせて使用することは有用であると期待される。

【0023】

本発明のサイレント抗CD28抗体は経口または非経口的に、好ましくは静脈内、筋肉内または皮下ルートにより投与することができる。

【0024】

本発明のサイレント抗CD28抗体は溶液または凍結乾燥粉末の形状に調製可能であり、要すれば、種々の医薬的に許容し得る添加物、例えば、添加剤、希釈剤、安定剤、等張化剤、緩衝剤などにより製剤化してもよい。好適な添加物はマルトースなどの糖類、ポリソルベートなどの界面活性剤、グリシンなどのアミノ酸、ヒト血清アルブミンなどのタンパク質、塩化ナトリウムなどの塩類などである。

【0025】

また、投与形態としては、例えば、注射用剤（溶液、懸濁液、エマルジョン、用時溶解用固体など）、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、粉末剤、液剤、リポソーム封入剤、軟膏、ゲル剤、外用粉末剤、スプレー、吸入粉末剤、点眼剤、眼軟膏、座剤、ペッサリーなど、投与方法に対応して適宜選択することが可能であり、従って、本発明のペプチドはそのように製剤化することができる。一般的な製剤については“総合医薬化学”（Comprehensive Medicinal Chemistry, Editor Hanschet al., Pergamon Press, 1990）第5巻25章の2に記載がある。

【0026】

本発明医薬組成物の投与用量は、多くの変数の中でも特に、具体的な組成、治療または予防の対象となる疾患のタイプ、投与方法、患者の年齢と症状、および治療期間に左右される。しかし、静脈内、筋肉内または皮下投与の場合、成人に1日0.01~100mg/kg、好ましくは、0.1~10mg/kgを投与する。

【0027】

本発明のサイレント抗CD28抗体を臓器または組織移植での移植拒絶反応の抑制または免疫寛容の誘導に使用する場合、該化合物は、移植直前、移植直後、および移植後3、7、12、18、25、35、45および60日目に、約1mg/kg/日の用量で、静脈内、筋肉内または皮下注射により投与することができる。投与回数および用量は、移植後の拒絶反応の推移をモニターしながら注意深く増減するとよい。

【0028】

投与間隔は、様々なファクターの中でも、用いる投与方法と患者の症状に左右されるが、連続投与でも間欠的投与でも実行可能である。従って、本発明のサイレント抗CD28抗体は一種の抗体であるため、持続した効果を生じるので、間欠投与が期待通りの有効性をもたらす。治療期間については、一旦、寛容状態が確立した時点で、サイレント抗CD28抗体の使用を中止しても、この寛容は維持し得る。この点で、本サイレント抗CD28抗体は、中断後免疫抑制効果が低下する他の免疫抑制剤よりも疑いなく優れている。

【0029】

（実施例）

本発明について全般的に記載したが、さらに理解を得るために参照する特定の具体例をここに提供するが、これらの例は説明を目的とするものであって、特に断りのない限り、本発明を限定しようとするものではない。以下の実施例は標準的技法を用いて実施するが、これらの技法は当業者にとって周知、かつ日常的なものである。ただし、詳細に別段に記載した場合については例外とする。

【0030】

10

20

30

40

50

実施例 1

マウス抗ヒトCD28抗体のアミノ酸配列

抗ヒトCD28抗体(クローン:TN228、マウスIgG1カップ)産生ハイブリドーマは八木田博士(順天堂大学医学部、日本)より恵与頂いた。精製した抗ヒトCD28抗体(TN228)約0.2mgを、0.64MグアニジンHCl、0.28Mトリス-HCl、pH8.5、0.055M-DTT中、60(アルゴン気流下)で90分還元し、ヨード酢酸を0.13Mまで加えて室温(暗所)で45分間カルボキシメチル化し、次いでDTTを0.32Mまで加え(カルボキシメチル化反応停止のため)、直ちにPD-10カラム(アマシャム・ファルマシア・バイオテック(Amersham Pharmacia Biotech)、ウプサラ、スウェーデン、カタログ番号#17-0851-01)を用いて0.1Mリン酸ナトリウム、0.002M-EDTA、pH8.0にバッファー交換した。この溶出液を0.005M-DTT、0.02%グリセロールに調整し、この溶液の3分の1(約0.35ml)を別個のチューブに移し、重鎖のN-末端脱ブロックに付した。このサンプルを1800μUのピログルタミン酸アミノペプチダーゼ(宝酒造(株)、東京、日本、カタログ番号#7334)により45で24時間消化した。脱ブロックサンプルからの軽鎖および重鎖のN-末端配列は、モデル241タンパク質シーケンサー(ヒューレット・パカード(Hewlett Packard)、パロアルト、カリフォルニア)上、自動化エドマン分解20サイクルとPTH分析により決定した。PTH誘導体はハイパージル(Hypersil)ODSC18カラムで分析した。シーケンサーとHPLCはヒューレット・パカードから入手した試薬、溶媒、カラムを用いて、メーカーの指図書に従って操作した。

10

20

【0031】

ピログルタミン酸アミノペプチダーゼで脱ブロックしたTN228のN-末端配列決定結果は以下の通りであった:

【0032】

【表1】

残基番号	アミノ酸	残基番号	アミノ酸	残基番号	アミノ酸	残基番号	アミノ酸
1	D、Q	6	Q、E	11	L	16	G、Q
2	I、V	7	S	12	A、V	17	Q、S
3	V、Q	8	P、G	13	V、A	18	R、L
4	L	9	A、P	14	S、P	19	A、S
5	T、K	10	S、G	15	L、S	20	T、I

30

40

【0033】

実施例 2

可変領域cDNAのクローニング

TN228の軽鎖および重鎖用V領域cDNAはコー(Co)ら記載のアンカーポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によりハイブリドーマ細胞からクローン化した(Co, M. S., N. M. Avadalo vic, P. C. Caron, M. V. Avadalo vic, D. A. Scheinberg, and C. Queen, 1992. CD33抗原に特異性を有するキメラおよびヒト化抗体。J. Immunol. 148: 1149-1154)。増幅はcDNA上、マウスカッパ鎖とガンマ鎖C領域にそれぞれアニールする3プライマー、およびcDNAの付加G-尾部にアニールする5

50

ライマーを使用し、実施した。V L P C R用の3 プライマーは配列番号13の配列：
 5 T A T A G A G C T C A A G C T T G G A T G G T G G G A A G A T G G A T
 A C A G T T G G T G C 3
 を持ち、マウスC 領域にハイブリダイズする残基17～46を有する。V H P C R用の3 プライマーは配列番号14、15および16の変質配列：

A

5' T A T A G A G C T C A A G C T T C C A G T G G A T A G A C C G A T G

T

G T

GGGCTGTCGTTTTTGGC3'

10

を持ち、マウスI g G C_H1にハイブリダイズする残基17～50を有する。2種のプライマーセットにおける非ハイブリダイズ配列はクローニングに用いられる制限部位を含む。V LとV Hのc D N Aは配列決定のために、T O P O I Iプラント・ベクター（インビトロゲン・インク（Invitrogen, Inc.）、カールスバッド、カリフォルニア）にサブクローン化した。

【0034】

数種の軽鎖および重鎖クローンを2つの独立したP C R反応により配列決定した。軽鎖については、マウス軽鎖可変領域に相同の2つのユニーク配列を同定した。一方のV L配列はフレームシフト突然変異のために非機能的であり、非生産性対立遺伝子と同定した。もう一方のV L配列は典型的な機能的マウスC_H1鎖可変領域であった。重鎖については、典型的なマウス重鎖可変領域に相同のユニーク配列を同定した。それらのヌクレオチド配列とその推定される可変領域のアミノ酸配列を図2および図3に示す。

20

【0035】

実施例3

キメラTN228-IgG2M3の構築と発現

（方法）

TN228V_LおよびV_Hをヒー（He）ら記載のようにP C RによりX b a I部位に隣接してミニ-エキソン・セグメントに変換し（He, X.Y., Z. Xu, J. Melrose, A. Mullowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M.S., Co, and B.L. Berg, 1998。E-セレクトインおよびP-セレクトイン双方に特異性を持つモノクローナル抗体のヒト化と薬物動態学。J. Immunol. 160: 1029-1035）、軽鎖および重鎖発現プラスミドにサブクローン化した（図1）。各ミニ-エキソンはシグナルペプチド配列、成熟可変領域配列および殆ど相同のマウスJ鎖遺伝子に由来するスプライシングドナー配列を含む。かかるスプライシングドナー配列はV領域エキソンをヒト抗体の定常領域にスプライスするのに使用する。各ミニ-エキソンは発現ベクターにクローン化した後に配列決定し、正しい配列が得られたこと、およびP C Rエラーは発生しなかったことを確認した。軽鎖および重鎖発現プラスミドの定常領域エキソンもまた配列決定により確認した。

30

【0036】

本明細書では、ChTN228をキメラ抗体とし、マウスTN228V_LおよびV_H可変領域、重鎖のヒトI g G 2 M 3、および軽鎖のヒト・C_H1鎖定常領域を含むものとする。重鎖の定常領域は生殖系列ヒト2ゲノムフラグメントから改変し（Cole, M.S., C. Anasetti, and J.Y. Tso. 1997。キメラ抗CD3のヒトI g G 2変異体はT細胞に対し非分裂促進性である。J. Immunol. 159: 3613-3621）、軽鎖は生殖系列ヒトKゲノムフラグメントから誘導した。重鎖および軽鎖の遺伝子は共にヒト・サイトメガロウイルスの主要初期プロモーターとエンハンサーにより転写される。重鎖遺伝子はヒト補体遺伝子C2由来の転写ターミネーターを伴う（Ashfield, R., P. Enriquez-Harris, and N.J. Proudfoot. 1991。密着結合したヒト補体遺伝子C2およびファク

40

50

ターB間の転写終結：C2およびc-mycの共通終止ファクターか？EMBO J. 10:4197-4207)。軽鎖選択マーカーgpt遺伝子(Mulligan, R. C., and P. Berg. 1981。キサンチン-グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする大腸菌遺伝子を発現する動物細胞の選択。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-2076)および重鎖選択マーカーdhfr遺伝子(Simonsen, C. C., and A. D. Levinson. 1983。改変マウス・ジヒドロ葉酸レダクターゼcDNAの単離と発現。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495-2499)は共にSV40初期プロモーターにより転写される。キメラTN228を発現させるために、リポフェクタミン(GIBCO BRL; カタログ番号#10964-013)を用いて、COS-7細胞(サル腎臓細胞株)に一時的に形質移入した。一過性形質移入体からの使用培地について、ヒトIgG2M3抗体が産生されているかELISAにより分析した。その際、捕捉試薬としてヤギ抗ヒトIgGガンマ鎖特異抗体を、また発色試薬としてHRP-結合ヤギ抗ヒトIgGカップ鎖抗体を使用した。また、使用培地については、ChTN228がP815/CD28⁺細胞(P815(マウス肥満細胞腫)にCD28を安定的に形質移入した細胞)に結合する能力についても、間接的免疫蛍光染色とフローサイトメトリー分析により試験した。安定な細胞株の産生については、キメラ発現プラスミドをエレクトロポレーションによりマウス骨髄腫細胞株Sp2/0に形質移入し、その形質移入体をgpt発現用を選択した。安定な形質移入体からの使用培地を一過性形質移入としてELISAにより分析した。

結果

クローン化V_LおよびV_H遺伝子をPCRによりミニ-エキソンに変換し(図2および3)、上記のように軽鎖および重鎖発現ベクターにサブクローン化し、図1に示した。

【0037】

COS-7細胞の一過性形質移入：キメラ発現ベクターを一過性にサル腎臓細胞株COS-7に形質移入し、キメラTN228⁺抗体を産生させた。形質移入した細胞からの使用培地について、キメラIgG2M3抗体の産生についてはELISAにより、またP815/CD28⁺細胞への結合についてはフローサイトメトリーにより試験した。両方のアッセイにおいて使用培地は陽性であった。一過性形質移入によるキメラ抗体の収量は~0.9μg/mlであった。一過性上清からのChTN228抗体は濃度依存的にP815/CD28⁺細胞に結合した(データ非開示)。

【0038】

Sp2/0細胞の安定な形質移入：安定な細胞株産生のために、キメラ発現ベクターをSp2/0細胞に形質移入した。数種の形質移入体からの使用培地は、キメラTN228抗体の産生について、また一過性形質移入体をもつものとしてP815/CD28⁺細胞への結合について試験した。両方のアッセイにおいて殆どの形質移入体が陽性であった。形質移入体の1つを高抗体産生株として選択し、無血清培地5L中で増殖拡大させた。使用した培地5LからアフィニティクロマトグラフィーによりChTN228を精製した。精製抗体の収量は~25mgであった。

【0039】

実施例4

キメラ抗体ChTN228のタンパク質精製

安定な形質移入からの高ChTN228発現形質移入体の1つ(クローン7H)をギブコ(GIBCO)ハイブリドーマ無血清培地(GIBCO BRL; カタログ番号#12045-076)中で増殖させた。細胞の生存度が10%以下に達したところで、使用した培地上清を収穫し、500mlに濃縮し、ファルマシアP1ポンプ(2~3ml/分)により、プロテインAセファロース5mlのカラムに負荷した。カラムをPBSで洗浄し、抗体を0.1Mグリシンと0.1M-NaCl、pH2.7で溶出した。溶出したタンパク質は2LのPBSを3回交換して透析し、次いで、0.1M-NaClをさらに含有するPBSで平衡化したPD-10カラム上で脱塩した。脱塩したタンパク質溶液を0.2

10

20

30

40

50

μmのフィルターで濾過し、4 で保存した。

【0040】

実施例5

サイズ排除HPLCとSDS-PAGEによる純度測定

サイズ排除HPLCは以下の装置からなるパーキンエルマー(Perkin Elmer) HPLCシステムを用いて実施した。PEISS200アドバンスドLCサンプルプロセッサ、PEシリーズ410バイオLCポンプ、PE235Cダイオードアレー検出器、およびPEネルソン600シリーズLINK。自動試料採取器、ポンプおよび検出器を制御するために、またデータの取得、保存および処理のために、パーキンエルマー・ターボクローム・ナビゲーター・バージョン4.1ソフトウェアを使用した。分離には、東ソーハースTSK-ゲルG3000SWXLサイズ排除HPLCカラム2本、7.8mm×300mm、5μm粒子径、250孔径(カタログ番号#08541、東ソーハース、モンゴメリエイル(Toso Haas, Montgomeryeille)メリーランド)を直列につないで使用した。移動相は200mMリン酸カリウム/150mM塩化カリウム(pH6.9)とし、流速は1.00mL/分とした。カラムの溶出液は220nmと280nm両方で分光光学的にモニターした。注入容量はChTN228サンプル50μL(50μg)とした。

【0041】

SDS-PAGEは4~20%グラジエント・ゲル(ノベックス(Novex)カタログ番号#EC6025、サンディエゴ、カリフォルニア)上、標準的手法に従い実施した。

【0042】

単離したChTN228の純度はサイズ排除HPLCとSDS-PAGEにより分析した。この分析に基づくと、該タンパク質は96.5%のモノマーであり、分子量~160kDのタンパク質に相当する移動度をもつ。MuTN228、イソタイプコントロールMuFd79(マウスIgG1)、ChTN228、およびイソタイプコントロールHuEP5C7(ヒトIgG2M3)を非還元条件下にSDS-PAGE分析すると、4種すべての抗体が約150~160kDの分子量をもつことを示した。同じ4種のタンパク質を還元条件下に分析すると、分子量約50kDの重鎖と分子量約25kDの軽鎖から構成されていることを示した。

【0043】

実施例6

競合実験

方法

滴定実験は、MuTN228-FITC抗体の系列2倍希釈液を用い、250ng/テストから開始し、実施した。P815/CD28⁺細胞(5×10⁵細胞/テスト)をFITC-標識抗体と氷上1時間インキュベートし、PBSで洗って、フローサイトメトリーで分析した。競合実験のために、25ngのMuTN228-FITCおよび競合するChTN228またはMuTN228抗体の系列2倍希釈液を800ng/テストから開始して、P815/CD28⁺細胞(5×10⁵細胞/テスト)に加えた。対照として、P815/CD28⁺細胞(5×10⁵細胞/テスト)を25ngのMuTN228-FITCのみ(すなわち、競合体なし)とインキュベートした。HuEP5C7およびMuFd79イソタイプコントロール抗体(800ng/テスト)についても競合体として試験した。細胞を抗体混合物と共に最終容量150μlとして、氷上(暗所にて)1時間インキュベートし、次いで洗浄して、フローサイトメトリーにより分析した。

結果

MuTN228とChTN228抗体の結合特異性は、方法の項に記載したように、フローサイトメトリー競合実験により比較した。種々量の非標識MuTN228またはChTN228を25ngのFITC標識MuTN228抗体と混合し、P815/CD28⁺細胞とインキュベートした。MuTN228とChTN228の両方を濃度依存的にMuTN228-FITCと競合し、両抗体の結合がCD28抗体に特異的であることを示し

10

20

30

40

50

た(図4)。イソタイプコントロール抗体MuF d 7 9およびHuEP 5 C 7はMuTN 2 2 8 - F I T Cと競合せず、MuTN 2 2 8とChTN 2 2 8抗体がV領域特異的相互作用を介してCD 2 8抗原を認識することを示した。

【0044】

実施例7

ヒトFRに対する親和性の低下したキメラ抗ヒトCD 2 8抗体は一次混合リンパ球反応を阻害する。

細胞調製

ヒト抹消血単核細胞(PBMC)を正常な健常ボランティアからフィコール-パックプラス(アマーシャム・ファルマシア・バイオテク(Amersham Pharmacia Biotech)、東京、日本)による濃度勾配遠心分離により調製した。ヒト血液を等容量のRPMI 1 6 4 0で希釈し、フィコール-パックプラス上に積層した。室温で30分間遠心分離した後、PBMCを採取し、RPMI 1 6 4 0で洗浄した。その後、PBMCを培地(2.5%ヒトAB型血清、2-メルカプトエタノール、および抗生物質を含有するRPMI 1 6 4 0)で懸濁し、ナイロンファイバーカラム(和光純薬、大阪、日本)に負荷した。5%CO₂中37℃で1時間インキュベートした後、T細胞を加温培地で溶出した。

10

【0045】

ヒトB細胞株(ラジ(Raji)およびJY)を混合リンパ球反応における刺激性細胞として使用した。これらの細胞を使用前にX線照射(2000R)した。

20

一次混合リンパ球反応(1次MLR)

精製ヒトT細胞(1×10⁵細胞/ウエル)および照射したラジ細胞(1×10⁵細胞/ウエル)を96穴平底マイクロプレートに容れた。抗体を培地に加え、細胞を7日間インキュベートした。培養物はすべて10kBq/ウエルの[³H]チミジン(アマーシャム・ファルマシア・バイオテク)で最終6時間標識した。細胞を採集し、取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

【0046】

一次MLRに対するTN 2 2 8 - I g G 2 m 3 (ChTN 2 2 8)の作用は図5および6に示した。オリジナルの抗ヒトCD 2 8抗体TN 2 2 8 (MuTN 2 2 8)は一次MLRを阻害しなかったが、しかし、キメラ抗体TN 2 2 8 - I g G 2 m 3は用量依存的に阻害した。従って、抗ヒトCD 2 8抗体のFc領域を、ヒトFcRに対して親和性の低下した抗体に変換することは、該抗体をT細胞増殖に対して拮抗作用をもつ抗体とすることである。

30

【0047】

ヒトFcRに対して低下した親和性をもつキメラ抗ヒトCD 2 8抗体は、二次混合リンパ球反応においてT細胞を低応答性のものとした。

二次混合リンパ球反応(2次MLR)

精製ヒトT細胞(1×10⁵細胞/ウエル)および照射したラジ細胞(1×10⁵細胞/ウエル)を96穴平底マイクロプレートに容れた。抗体を培地に加え、細胞をインキュベートした。5日後に細胞を採集し、新鮮な培地で洗浄した。細胞を新鮮な培地に懸濁し、8日間培養した。細胞を照射したラジ細胞またはJY細胞で再刺激した。さらに7日間培養した後、細胞を10kBq/ウエルの[³H]チミジンと6時間インキュベートした。細胞を採集し、放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

40

【0048】

TN 2 2 8 - I g G 2 m 3は一次MLRを阻害した(図5および6)。次いで、我々はこの抗体の二次MLRに対する作用を分析した。該抗体を一次MLR培養に付し、次いで抗体を培養上清から取り出した。細胞は抗体を含まない培地中で培養した後、同じ刺激性細胞(ラジ)または第三の刺激剤(JY)にて再刺激した。一次MLRを介してTN 2 2 8 - I g G 2 m 3で処理した細胞の増殖は未処理細胞に比べて低下していた。しかし、両細胞共に第三の刺激剤(JY)により殆ど同じ程度まで増殖した(図7)。この結果は、ヒ

50

トFcRに対して親和性の低下した抗ヒトCD28抗体がアロ抗原刺激を介してT細胞のエネルギーを誘導することを示している。

【0049】

実施例8

ヒト化TN228可変領域の設計

MuTN228のV領域配列をコンピュータモデル化により分析した。カバット(Kabat)の抗体配列データベース(8. Johnson, G., and T. T. Wu. 2000. カバット・データベースとその応用: 最初の可変性プロットから30年。Nucleic Acids Res. 28: 214-218)に対する配列相同性検索に基づき、IC4(Manheimmer-Lory, A., J. B. Katz, M. P. Pillinger, C. Ghossein, A. Smith, B. Diamond. 1991. 抗-DNA-会合イデオタイプを有する抗体の分子特性。J. Exp. Med. 174: 1639-1652)を選択し、ヒト化TN228重鎖および軽鎖の両可変領域に対し、枠組みを与えた。ヒト化TN228重鎖可変ドメインは85個の枠組み残基の内の65残基を有し、該枠組み残基はマウスTN228重鎖枠組み残基と同一であるか、または76%の配列同一性である。ヒト化TN228軽鎖可変ドメインは80個の枠組み残基の内の56残基を有し、該枠組み残基はマウスTN228軽鎖枠組み残基と同一であるか、または70%の配列同一性である。

【0050】

コンピュータプログラムABMODおよびENCAD(Levitt, M. 1983. 未変性タンパク質の分子動力学。I. 経路のコンピュータシミュレーション。J. Mol. Biol. 168: 595-620)を使用してTN228可変ドメインの分子モデルを構築し、それを用いてCDRと潜在的に相互作用するために十分にCDRと接近するマウスTN228枠組みのアミノ酸の位置づけを行った。ヒト化TN228重鎖および軽鎖可変領域を設計するために、マウスTN228重鎖からのCDRをヒトIC4重鎖の枠組み領域に移植し、マウスTN228軽鎖からのCDRをヒトIC4軽鎖の枠組み領域に移植した。コンピュータモデルがCDRとの有意な接触を示唆する枠組みの位置で、マウス抗体由来のアミノ酸が当初のヒト枠組みアミノ酸に置き換えられた。ヒト化TN228について、この置換は重鎖の27、29、30、48、67、71および78の残基でなされた。軽鎖については置換されなかった(すなわち、IC4枠組み領域にMuTN228CDRが直接に移植された)。さらに、ヒト抗体のデータベースにおいてはそのような位置で滅多に起こらない枠組み残基が、その位置でヒトの共通アミノ酸により置換された。ヒト化TN228の場合、この置換は重鎖の23、40、73、83および85の残基で、また軽鎖の69および77の残基で起こった。ヒト化TN228抗体の重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を図9および10に示す。

【0051】

実施例9

ヒト化TN228-IgG2M3の構築と発現

方法

ヒト化可変領域のアミノ酸配列を上記のように設計したので、シグナルペプチド、スプライシングドナーシグナルおよび適切な制限酵素部位を含め、それらをエンコードする遺伝子を構築した(図8)。重鎖および軽鎖可変領域の遺伝子は、長さが約65ないし80塩基の範囲の8種の重複した合成オリゴヌクレオチドを用いて構築し、増幅した(He, X. Y., Z. Xu, J. Melrose, A. Mullowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M. S. Co, and E. L. Berg. 1998. E-セレクチンとP-セレクチン両方に特異性を有するモノクローナル抗体のヒト化と薬物動態学。J. Immunol. 160: 1029-1035)。オリゴヌクレオチドを対となるようにアニールし、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメントにより伸張させ、4種の二本鎖フラグメントとした。得られたフラグメントを変性し、対としてアニールし、クレノウで伸張させ、

2種のフラグメントとした。これらのフラグメントを変性し、対としてアニールし、再度伸張させて完全長の遺伝子とした。得られる生成物をTaqポリメラーゼを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅し、ゲル精製し、XbaIで消化し、再度ゲル精製し、重鎖発現用のpVg2M3および軽鎖発現用のpVkのXbaIにサブクローン化した。ヒト・ガンマ2重鎖発現用のpVg2M3ベクター(Cole, M.S., C. Anasetti, and J.Y. Tso. 1997. キメラ抗CD3のヒトIgG2変異体はT細胞に対し非分裂促進性である。J. Immunol. 159: 3613-3621)およびヒト・カッパ軽鎖発現用pVkベクター(CO, M.S., N. M. Avadalo, P.C. Caron, M.V. Avadalo, D.A. Scheinberg, and C. Queen. CD33抗原に対し特異性をもつキメラおよびヒト化抗体。J. Immunol. 148: 1149-1154)はすでに記載されている。

【0052】

重鎖および軽鎖の最終プラスミドのV領域および定常領域エキソンの配列はヌクレオチド配列決定により立証された。最終プラスミドの全体構造は制限マッピングにより立証された。DNA操作はすべて標準法により実施した。

【0053】

本明細書において、HuTN228はヒト化抗体であって、ヒト化TN228V_HおよびV_L可変領域、重鎖用ヒトIgG2M3定常領域、および軽鎖用ヒトカッパ定常領域を含むものである。重鎖定常領域は生殖系列ヒト2ゲノムフラグメントから改変し(Cole, M.S., C. Anasetti, and J.Y. Tso. 1997. キメラ抗CD3のヒトIgG2変異体はT細胞に非分裂促進性である。J. Immunol. 159: 3613-3621)、軽鎖は生殖系列ヒトKゲノムフラグメントから誘導した。ヒト・サイトメガロウイルスの主要最初期プロモーターとエンハンサーは、重鎖および軽鎖の遺伝子を共に転写する。重鎖遺伝子にはヒト補体遺伝子C2から由来する転写ターミネーターが続く(Ashfield, R., P. Enriquez-Harris, and N.J. Proudfoot. 1991. 密着結合したヒト補体遺伝子C2およびファクターB間の転写終結: C2およびc-mycの共通終止ファクターか? EMBO J. 10: 4197-4207)。軽鎖選択マーカーgpt遺伝子(Mulligan, R.C., and P. Berg. 1981. キサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする大腸菌遺伝子を発現する動物細胞の選択。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076)および重鎖選択マーカーdhfr遺伝子(Simonsen, C.C., and A.D. Levinson. 1983. 改変マウス・ジヒドロ葉酸レダクターゼcDNAの単離と発現。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495-2499)は共にSV40初期プロモーターにより転写される。

【0054】

HuTN228を発現させるために、リポフェクタミン2000(ライフ・テクノロジー; カタログ番号#11668-027)を用いて、COS-7細胞(サル腎臓細胞株)に一時的に形質移入した。一過性形質移入体からの使用培地について、ヒトIgG2M3抗体が産生されているかELISAにより分析した。その際、捕捉試薬としてヤギ抗ヒトIgGガンマ鎖特異抗体を、また発色試薬としてHRP-結合ヤギ抗ヒトIgGカッパ鎖抗体を使用した。また、使用培地については、HuTN228がP815/CD28⁺細胞に結合する能力についても、間接的免疫蛍光染色とフローサイトメトリー分析により試験した(データ非開示)。安定な細胞株の産生については、ヒト化発現プラスミドをエレクトロポレーションによりマウス骨髄腫細胞株Sp2/0に形質移入し、その形質移入体をgpt発現で選択した。安定な形質移入体からの使用培地は一過性形質移入体と同様にELISAにより分析した。

結果

ヒト化V領域アミノ酸配列の設計に基づいて、重鎖および軽鎖のV遺伝子(図9および1

0) を方法の項記載どおりに構築した。図 8 に示すように、重鎖および軽鎖の V 遺伝子を pVg2M3 および pVk ベクターにそれぞれクローン化した。数種のクローンをヌクレオチド配列決定により分析し、重鎖および軽鎖発現ベクター双方について正しいクローンを形質移入に使用した。重鎖および軽鎖発現ベクター双方について定常領域もまた配列決定により確認した。

【0055】

実施例 10

HuTN228 の発現

COS-7 細胞の一過性形質移入：発現ベクターを一過性にサル腎臓細胞株 COS-7 に形質移入し、HuTN228 抗体を産生させた。形質移入した細胞からの使用培地について、ヒト化 IgG2M3 抗体の産生については ELISA により、また P815/CD28⁺ 細胞への結合についてはフローサイトメトリーにより試験した（データ非開示）。両方のアッセイにおいて使用培地は陽性であった。一過性形質移入によるヒト化抗体の収量は ~ 3.7 g/ml であった。一過性上清からの HuTN228 抗体は濃度依存性に P815/CD28⁺ 細胞に結合した（データ非開示）。

10

【0056】

Sp2/0 細胞の安定な形質移入：ヒト化発現ベクターを安定な細胞系の産生のために Sp2/0 細胞に形質移入した。数種の形質移入体からの使用培地について、一過性の形質移入体の様に HuTN228 抗体の産生を試験した。より高い抗体生産性を有するものについて 1 つの形質移入体（クローン 4）を選択し、ギブコ（GIBCO）ハイブリドーマ無血清培地にて拡張した。HuTN228 抗体をアフィニティークロマトグラフィーにより、使用培地 570 ml から精製した。精製抗体の収量は ~ 7 mg であった。

20

【0057】

実施例 11

タンパク質精製

安定な形質移入からの高 HuTN228 発現形質移入体の 1 つ（クローン 4）を 570 ml のギブコ（GIBCO）ハイブリドーマ無血清培地（ライフ・テクノロジーズ；カタログ番号 # 12045076）中で増殖させた。細胞の生存度が 10% 以下に達したところで、使用した培地上清を回収し、プロテイン A セファロース 2 ml のカラムに負荷した。カラムを PBS で洗浄し、抗体を 0.1 M グリシンと 0.1 M NaCl、pH 2.5 で溶出した。溶出したタンパク質は 2 L の PBS を 3 回交換して透析し、次いで、0.1 M NaCl をさらに含有する PBS で平衡化した PD-10 カラム上で脱塩した。脱塩したタンパク質溶液を 0.2 m のフィルターで濾過し、4℃ で保存した。

30

実施例 11

サイズ排除 HPLC と SDS-PAGE による純度測定

方法

サイズ排除 HPLC は以下の装置からなるパーキンエルマー（Perkin Elmer）HPLC システムを用いて実施した。PEISS200 アドバンスド LC サンプルプロセッサ、PE シリーズ 410 バイオ LC ポンプ、PE 235C ダイオードアレー検出器、および PE ネルソン 600 シリーズ LINK。自動試料採取器、ポンプおよび検出器を制御するために、またデータの取得、保存および処理のために、パーキンエルマー・ターボクロム・ナビゲーター・バージョン 4.1 ソフトウェアを使用した。分離には、東ソーハース TSK-ゲル G3000SWXL サイズ排除 HPLC カラム 2 本（7.8 mm x 300 mm、5 μm 粒子径、250 μm 孔径；カタログ番号 # 08541、東ソーハース、モンゴメリエイル（Toso Haas, Montgomeryeille）メリーランド）を直列につないで使用した。移動相は 200 mM リン酸カリウム / 150 mM 塩化カリウム（pH 6.9）とし、流速は 1.00 ml/分とした。カラムの溶出液は 220 nm と 280 nm 両方で分光光度的にモニターした。注入容量は HuTN228 サンプル 60 L（60 g）とした。

40

【0058】

50

S D S - P A G E は 4 ~ 2 0 % グラジエント・ゲル (ノベックス (N o v e x) カタログ
番号 # E C 6 0 2 5、サンディエゴ、カリフォルニア) 上、標準的手法に従い実施した。

【 0 0 5 9 】

精製抗体のイソタイプはヒト I g G サブクラス・プロフィル E L I S A キット (ザイムド
・ラボラトリーズ (Z y m e d L a b o r a t o r i e s)、南サンフランシスコ、カ
リフォルニア) により、製造業者の推奨に従い確認した。(結果)

単離した H u T N 2 2 8 抗体の純度はサイズ排除 H P L C と S D S - P A G E により分析
した。H u T N 2 2 8 の H P L C 溶出プロフィルは開示しない。この分析に基づくと、該
タンパク質は ~ 9 8 % のモノマーであり、分子量 ~ 1 6 0 k D のタンパク質に相当する移
動度をもつ。

10

【 0 0 6 0 】

M u T N 2 2 8、イソタイプコントロール M u F d 7 9 (マウス I g G 1)、H u T N 2
2 8、およびイソタイプコントロール H u E P 5 C 7 (ヒト I g G 2 M 3) を非還元条件
下に S D S - P A G E 分析すると、4 種すべての抗体が約 1 5 0 ~ 1 6 0 k D の分子量を
もつことを示した。同じ 4 種のタンパク質を還元条件下に分析すると、分子量約 5 0 k D
の重鎖と分子量約 2 5 k D の軽鎖から構成されていることを示した。

【 0 0 6 1 】

イソタイプの試験では、H u T N 2 2 8 抗体のイソタイプが予測した I g G 2 イソタイプ
と矛盾しないことを示した。

20

【 0 0 6 2 】

実施例 1 2

F A C S 競合実験

方法

滴定実験は、M u T N 2 2 8 - F I T C 抗体の系列 2 倍希釈液を用い、2 5 0 n g / テス
トから開始し、実施した。P 8 1 5 / C D 2 8 ⁺ 細胞 (3 × 1 0 ⁵ 細胞 / テスト) を F I
T C - 標識抗体と 1 0 0 L の F A C S 染色バッファー (F S B = P B S、2 % F B S、3
% 正常マウス血清、0 . 1 % N a N ₃) 中、氷上 1 時間インキュベートし、2 m l の F S
B で洗って、フローサイトメトリーで分析した (データ非開示) 。

【 0 0 6 3 】

競合実験のために、2 5 L の F S B 中 M u T N 2 2 8 - F I T C (5 0 n g / テスト) を
、2 5 L の F S B 中競合する H u T N 2 2 8 または M u T N 2 2 8 抗体の系列 3 倍希釈液
(2 0 0 g / m l から開始) と組合せ、5 0 L の F S B 中 P 8 1 5 / C D 2 8 ⁺ 細胞 (3
× 1 0 ⁵ 細胞 / テスト) に加えた。対照として、P 8 1 5 / C D 2 8 ⁺ 細胞を M u T N 2
2 8 - F I T C のみ (5 0 L の F S B 中 5 0 n g / テスト) とインキュベートした。H u
E P 5 C 7 (ヒト I g G 2 M 3) および M u F d 7 9 (マウス I g G 1) イソタイプコン
トロール抗体 (2 0 0 g / m l) についても 2 5 L の F S B 中、非特異的競合体として試
験した。細胞を抗体混合物と共に最終容量 1 0 0 L として、氷上 (暗所にて) 1 時間イン
キュベートし、次いで 2 m l の F S B で洗浄して、フローサイトメトリーにより分析した
。本実験は 3 回繰り返した。

30

結果

P 8 1 5 / C D 2 8 ⁺ 細胞上、C D 2 8 分子に対する M u T N 2 2 8 および H u T N 2 2
8 抗体の結合特異性は、方法の項に記載したとおりに、フローサイトメトリー競合実験に
より比較した。代表的な結果を図 5 に示す。M u T N 2 2 8 および H u T N 2 2 8 は共に
濃度依存的に M u T N 2 2 8 - F I T C と競合し、両抗体の結合が C D 2 8 抗原に特異的
であることを示した。H u T N 2 2 8 の相対的結合は M u T N 2 2 8 より 2 ~ 3 倍低かつ
た。イソタイプコントロール抗体 M u F d 7 9 および H u E P 5 C 7 は M u T N 2 2 8 -
F I T C と競合せず、M u T N 2 2 8 および H u T N 2 2 8 抗体が V 領域特異相互作用を
介して C D 2 8 抗原を認識することを示した。

40

【 0 0 6 4 】

実施例 1 3

50

E L I S A 競合実験

方法

96穴ELISAプレート(ヌンク(Nunc)イムノプレート、ナルジ(Nalge)ヌンク、ネイパービル(Naperville)、イリノイ;カタログ番号#439454)に、100L/ウエルのsCD28-Fc(PBS中0.5g/ml)(sCD28-Fcは融合タンパク質であり、そのCD28の細胞外ドメインはIgG1のCH2およびCH3ドメインと組合わせたものである)を4で一夜被覆した。該プレートを、TBS中、300L/ウエルのスーパーブロック・ブロッキング・バッファー(ピアース(Pierce)、ロックフォード、イリノイ;カタログ番号#37535)により30分間ブロックし、300L/ウエルのELISAウオッシュ・バッファー(EWB=PBS、0.1%トゥーン-20)で洗浄した。ELISAバッファー(EB=PBS、1%BSA、0.1%トゥーン-20)100L中MuTN228-ビオチン(0.5g/ml)およびEB100L中3倍系列希釈したHuTN228またはMuTN228競合抗体(100g/mlから開始)の混合物を最終容量200L/ウエルとして1濃度3ウエルあて(triplicate)加えた。イソタイプコントロール抗体HuEP5C7およびMuF79(100g/ml)についてEB100L中、非特異競合体として試験した。非競合体対照として、100LのEBを100LのMuTN228-ビオチン(0.5g/ml)に加えた。ブランクとして、200LのEBを残りのウエル(MuTN228-ビオチンを含まない)に加えた。プレートを室温、振とう下に1.5時間インキュベートした。ウエルを300L/ウエルのEWBで4回洗浄した後、ストレプトアビジン-HRP(1g/ml、ピアース・カタログ番号#21124)100L/ウエルを各ウエルに加えた。プレートを室温、振とう下に1時間インキュベートした。上記同様にウエルを洗浄した後、ABTS基質(KPLカタログ#507602と506502;ゲイサーズバーグ(Gaithersburg)、メリーランド)100L/ウエルを各ウエルに加えた。プレートを室温で5~7分間インキュベートし、光学吸光度を415nmで読み取った。本実験は3回繰り返した。

結果

HuTN228およびMuTN228抗体のsCD28-Fcに対する結合特異性を方法の項記載どおりに、ELISA競合実験において比較した。代表的な結果を図12に示す。MuTN228およびHuTN228は共に濃度依存的にMuTN228-ビオチンと競合した。イソタイプコントロール抗体MuF79およびHuEP5C7はMuTN228-ビオチンと競合せず、MuTN228およびHuTN228抗体がV領域特異相互作用を介してCD28抗原を認識することを示した。3回の実験すべてについて、MuTN228およびHuTN228のIC₅₀値を表2に示す。HuTN228の相対的結合は平均してMuTN228よりも2.6倍低かった。

【0065】

【表2】

表2 ELISA競合のまとめ

IC₅₀ (g/ml)

競合体	実験1	実験2	実験3	平均	標準偏差
MuTN228	0.21	0.20	0.15	0.19	0.03
HuTN228	0.37	0.64	0.48	0.50	0.14

【0066】

実施例14

1²⁵I-標識抗体の競合実験

方法

10

20

30

40

50

MuTN228およびHuTN228抗体の相対的結合親和性は、Queen (Queen)らの方法に従って決定した(Queen, C., W. P. Schneider, H. E. Selick, P. W. Payne, N. F. Landolfi, J. F. Duncan, N. M. Avdalovic, M. Levitt, R. P. Jungmans, T. A. Waldmann, 1989. インターロイキン2レセプターに結合するヒト化抗体。Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 10029-10033)。簡単に説明すると、結合バッファー(BB=PBS、2%FBS、1g/mlのマウスIgG、0.1%NaN₃)中、~10ngの¹²⁵I-標識MuTN228を、50LのBB中、MuTN228またはHuTN228競合抗体の3倍系列希釈液(400g/mlから開始)と、1濃度3チューブあて組合せ、インキュベーション・チューブ(スカトロン・マクロウエル・チューブ・ストリップ(Skatoron Macrowell Tube Strips)、カタログ番号#15773、モレキュラー・デバイス(Molecular Devices)、サニーヴェール、カリフォルニア)中のP815/CD28⁺細胞(2.5×10⁵細胞/テスト)100Lに加え、緩やかに振とうしながら4で90分間培養した。イソタイプコントロール抗体HuEP5C7およびMuFd79(400g/ml)についても、非特異的競合体として、50LのBB中で試験した。インキュベーションした後、該細胞-抗体混合物を、0.1mlの80%フタル酸ジブチル/20%オリーブ油を容れた遠沈管(サーステッド(Sarstedt)マイクロチューブ、カタログ番号#72.702、サーステッド、ニュートン、ノースカロライナ)に移し、インキュベーションチューブは50LのBBで1度洗い、結合カウントと遊離カウントとを記載どおりに遠心分離により分離した(Kuziel, W. A., S. J. Morgan, T. C. Dawson, S. Griffin, O. Smithies, K. Ley, N. Maeda. 1997. CCケモカイン欠損マウスにおける白血球接着と単球血管外遊出の激しい減少。Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12053-12058)。本実験は3回繰り返した。

結果

MuTN228およびHuTN228抗体の相対的親和性を、方法の項記載のように、¹²⁵I-標識抗体の競合実験により比較した。代表的な結果を図13に示す。MuTN228およびHuTN228は共に濃度依存的に¹²⁵I-標識MuTN228と競合した。イソタイプコントロール抗体MuFd79は高濃度で弱い反復可能な競合を示したが、イソタイプコントロール抗体HuEP5C7は¹²⁵I-標識MuTN228と競合せず、HuTN228抗体がV領域特異相互作用を介してCD28抗原を認識することを示した。3回の実験すべてについて、MuTN228およびHuTN228のIC₅₀値を表3に示す。HuTN228の見かけ上の結合親和性はMuTN228抗体よりも大よそ2.4倍低かった。

【0067】

【表3】

表3 I-125競合のまとめ

IC₅₀ (nM)

競合体	実験1	実験2	実験3	平均	標準偏差
MuTN228	0.93	1.05	1.02	1.00	0.06
HuTN228	2.65	2.43	2.13	2.40	0.26

【0068】

実施例15

ハムスター抗マウスCD28抗体のアミノ酸配列決定

方法

ハイブリドーマと抗体：アルメニア・ハムスター抗マウスCD28ハイブリドーマPV1はATCCから入手した(ATCC HB-12352)。精製PV1、R-フィコエリトリン(R-PE)結合PV1はサザーン・バイオテクノロジー(バーミンガム、アラバマ)から購入した。シリア・ハムスター抗CD28抗体37.51はファーマーミンゲン(PharMingen)(サンディエゴ、カリフォルニア)から購入した。二次抗体蛍光(FITC)結合ロバ抗アルメニア・ハムスターIgG(H+L)、FITC-結合ロバ抗シリア・ハムスターIgG(H+L)、FITC-結合ロバ抗マウスIgG(H+L)、R-PE-F(ab')₂ロバ抗マウスIgG(H+L)は、ジャクソン・イムノリサーチ(ウエスト・グロブ、ペンシルバニア)から購入した；また、FITC-結合ヤギ抗マウス・カップ、R-PE-結合ヤギ抗マウスIgG3、および西洋わさび(HRP)結合ヤギ抗マウスカップはサザーン・バイオテクノロジーから購入した。ヤギ抗マウスIgG3およびマウスIgG3イソタイプコントロールFLOPC22は、シグマ・ケミカルズ(セントルイス、ミズーリ)から購入した。アルメニア・ハムスター抗マウスCD3抗体145.2C11およびそのハムスター/マウス・キメラ・バージョン145.2C11-IgG3は、我々の研究室にて生成させた。FITC-結合145.2C11はベリンガー・マンハイム(インディアナポリス、イリノイ)から購入した。

10

【0069】

可変領域cDNAのクローニング：PV1の軽鎖および重鎖のV領域cDNAはコー(Co)ら記載のアンカーポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりハイブリドーマ細胞からクローン化した(Co, M.S., N.M. Avadalo, P.C. Caron, M.V. Avadalo, D.A. Scheinberg, and C. Queen, 1992. J. Immunol. 148: 1149-1154)。増幅はcDNA上、ハムスター・カップ鎖とガンマ鎖C領域にそれぞれアニールする3プライマー、およびcDNAの付加G-尾部にアニールする5プライマーを使用し、実施した。V_L PCR用の3プライマーは：5' TATAGAGCTCCACTTCCA GTGCC (配列番号20)の配列を有し、ハムスターのC領域にハイブリダイズする残基11~24を有する。V_H PCR用の3プライマーは変質配列(配列番号17、18および19の配列)：

20

A

5' TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATG

30

T

G T

GGGCTGTCGTTTTGGC

を有し、殆どのげっ歯類のIgG C_H1にハイブリダイズする残基19~50を有する。2つのプライマーセットにおける非ハイブリッド形成配列はクローニングに使用する制限部位を含む。V_LおよびV_H cDNAをpUC19ベクターにサブクローン化し、配列決定用とした。PCR-生成エラーを避けるために、各cDNAの5種の独立クローンの配列を決定し、その配列が共通配列と一致したクローンのみを選択してキメラPV1を発現した。

40

結果

PV1 V領域cDNAのクローニング：PV1軽鎖と重鎖のV領域cDNAは、方法の項に記載したとおりに、ハイブリドーマ細胞からクローン化した。V_L PCRでは、ハムスターC領域に相当する3プライマーのみがPV1からV_L cDNA産物を産生し得た。他方、ハムスターC領域からの3プライマーはPCR産物を産生しなかった。これらの結果は、ハイブリドーマPV1はその軽鎖にカップを使用することを示した。数種の軽鎖および重鎖のクローンを配列決定し、それらがそれぞれ同一のV_LおよびV_Hを含むことが見出された。限られたC_H1およびC配列のデータは、クローン化された重鎖および軽鎖がマウス起源ではないことを示した。

【0070】

実施例16

50

キメラPV1 - IgG3の構築と発現

方法

PV1 V_L および V_H をPCRによりXbaI部位に隣接してミニ-エキソン・セグメントに記載どおりに作製し(He, X.Y., Z. Xu, J. Melrose, A. Mullowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M.S., Co, and B.L. Berg, 1998. J. Immunol. 160: 1029-1035)、それらを個々に軽鎖と重鎖の発現プラスミドに導入した(図14)。各ミニ-エキソンはシグナルペプチド配列、成熟可変領域配列および殆ど相同のマウスJ鎖遺伝子から誘導された5 スプライシングドナー配列を含む。かかるスプライシングドナー配列はV領域エキソンをマウス抗体の定常領域にスプライスするのに使用する。各ミニ-エキソンは発現ベクターにクローン化した後に再び配列決定し、正しいスプライシングシグナルが得られたこと、およびPCRエラーは発生しなかったことを確認した。

10

【0071】

単一のプラスミドからキメラPV1 - IgG3の重鎖および軽鎖遺伝子の両方を発現するためにベクターを構築した。この報告において、PV1 - IgG3とは、ハムスターPV1の V_L および V_H 可変領域、重鎖のマウスIgG3定常領域、および軽鎖のマウス・カッパ定常領域を含むキメラ抗体をいう。発現ベクターpV1.g3.rg.dE(図14)はコールらの記載に類似の2段階クローニング工程により入手した(Cole, M.S., C. Anasetti, and J.Y. Tso. 1997. J. Immunol. 159: 3613-3621)。重鎖定常領域はマウス3ゲノム・フラグメントから誘導し、軽鎖はフラグメントから誘導した。重鎖および軽鎖の遺伝子は共にヒト・サイトメガロウイルスの主要最初期プロモーターとエンハンサーにより駆動され、またそれらはヒト補体遺伝子C2由来の転写ターミネーターにより分離される(Ashfield, R., P. Enriquez-Harris, and N.J. Proudfoot. 1991. EMBO J. 10: 4197-4207)。選択マーカーgp t遺伝子(Mulligan, R.C., and P. Berg. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076)は、改変SV40初期プロモーターにより転写させる。キメラPV1 - IgG3の発現のために、単一のプラスミド・ベクターをマウス骨髄腫細胞株NS0に形質移入し、形質移入体をgp tの発現で選択した。形質移入体からの使用培地について、マウスIgG3抗体が産生されているかELISAにより分析した。その際、捕捉試薬としてヤギ抗マウスIgG3を、また発色試薬としてHRP-結合ヤギ抗マウス・カッパ鎖を使用した。該アッセイはマウスIgG3に特異的である；他のマウスIgG3イソタイプはこの分析で陰性である。

20

30

結果

キメラPV1 - IgG3の発現：クローン化 V_L と V_H を、材料と方法の項および図15に記載したように、ミニ-エキソンに導入し(図15)、発現ベクターに組込んだ。次いで、発現ベクターをマウス骨髄腫細胞株NS0に移入し、キメラPV1 - IgG3を産生させた。数種の形質移入体からの使用培地について、マウスIgG3抗体が産生されているかELISAによりアッセイし、EL4細胞への結合についてはFACSによりアッセイした。殆どの形質移入体が両アッセイにおいて陽性であった。抗体生産性の高い形質移入体の一つを選択し、無血清培地1L中で増殖させた。PV1 - IgG3は1Lの使用培地からアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。収量は>10mg/Lであった。

40

【0072】

実施例17

HPLCおよびSDS-PAGEによる精製キメラPV1 - IgG3のキャラクタリゼーション

方法

タンパク質精製：IgG3高発現形質移入体の一つ(クローン#1)を1Lのギブコ(G

50

I B C O) 無血清ハイブリドーマ培地にて増殖した。細胞の生存度が30%以下に達したところで、使用した培地上清を収穫し、200mlに濃縮し、ファルマシアP1ポンプ(2~3ml/分)により、プロテインAセファロース5mlのカラムに負荷した。次いで、カラムをさらに0.1M-NaClを含むPBS(NaClの最終濃度は0.25M)で洗浄し、抗体を3.5M-MgCl₂で溶出した。次いで、0.1M-NaClをさらに含有するPBSで平衡化したPD-10カラム上で脱塩した。脱塩したタンパク質溶液を0.2µmのフィルターで濾過し、4℃で保存した。マウスIgG3すべてと同様に、高濃度のPV1-IgG3(>1mg/ml)を冷所で沈殿させ、次いで37℃に加温して溶液に戻した。抗体は室温で溶液のままである。冷却沈殿を数回繰り返しても抗体の抗原結合活性に影響するようには見えない。

10

【0073】

サイズ排除HPLCおよびSDS-PAGEによる純度測定：サイズ排除HPLCは以下の装置からなるパーキンエルマー(Perkin Elmer)HPLCシステムを用いて実施した。PEISS200アドバンスドLCサンプルプロセッサ、PEシリーズ410バイオLCポンプ、PE235Cダイオードアレー検出器、およびPEネルソン600シリーズLINK。自動試料採取器、ポンプおよび検出器を制御するために、またデータの取得、保存および処理のために、パーキンエルマー・ターボクローム・ナビゲーター・バージョン4.1ソフトウェアを使用した。分離には、東ソーハースTSK-ゲルG3000SWXLサイズ排除HPLCカラム2本(7.8mm×300mm、5µm粒子径、250µm孔径；カタログ番号#08541、東ソーハース、)を直列につないで使用した。移動相は200mMリン酸カリウム/150mM塩化カリウム(pH6.9)とし、流速は1.00ml/分とした。カラムの溶出液は220nmと280nm両方で分光光学的にモニターした。注入容量は未希釈のPV1-IgG3サンプル50µL(63.5µg)とした。SDS-PAGEは標準的手法に従い実施した。

20

結果

単離したPV1-IgG3の純度はサイズ排除HPLCとSDS-PAGEにより分析した。PV1-IgG3のHPLC溶出プロファイルを図16に示す。この分析に基づくと、該タンパク質は99%がモノマーであり、分子量150kDに相当する移動度を有する。PV1、PV1-IgG3およびイソタイプコントロールを非還元条件下にSDS-PAGE分析すると、3種すべての抗体が約150kDの分子量をもつことを示した(図17A)。図17Aに見られるマイナーなバンドは非還元SDS中サンプルを沸騰させたことによるアーチファクトであった。それらは抗体中の不完全な鎖間ジスルフィド結合の数を反映していた。しかし、同じ3つのタンパク質を還元条件下で分析すると(図17B)、PV1-IgG3またはイソタイプコントロールではなく、PV1が通常IgGで見られる分子量50kDを僅かに超える分子量の重鎖をもつことを示した。ハムスター抗体PV1もまたC_H3のAsn₂₉₇に重糖鎖をもつか、または重鎖の別の場所に余分の糖鎖形成部位をもつ。後に検討するように、この異常な糖鎖形成パターンは、多分、レクチン/糖質相互作用によってEL4細胞とPV1の非特異的結合に関与しているであろう。

30

【0074】

実施例18

40

方法

フローサイトメトリー：マウスT細胞株EL4細胞(2.5×10⁵細胞/0.2ml)を1µg/mlのPV1、37.51またはPV1-IgG3により4℃で30分間染色し、2mlの冷PBSで洗浄し、次いで20µlの特異蛍光色素-結合二次抗体(10µg/ml)で染色した。暗所、4℃で20分間インキュベーションした後、細胞をPBSで洗浄し、FACSキャン(ベクトン・ディッケンソン(Becton Dickinson)、ミルピタス、カリフォルニア)で分析した。

【0075】

競合実験において、EL4細胞(2.5×10⁵細胞/0.2ml)を1µg/mlのR-PE-PV1および25µg/mlのPV1、PV1-IgG3またはIgG3イソタ

50

イブコントロールにより、暗所、4 で30分間染色し、P B Sで洗浄し、F A C Sキャンにより分析した。同様の競合反応は種々バージョンの145.2C11でも実施した。逆競合実験においては、E L 4細胞(2.5 × 10⁵細胞/0.2 ml)を1 μg/mlのP V 1 - I g G 3および25 μg/mlのP V 1により4 で30分間染色し、P B Sで2回洗浄し、F I T C - 結合ロバ抗マウスI g G (H + L)で染色し、洗浄後、F A C Sキャンにより分析した。P V 1に対する二次抗体の非特異的結合を制御するために、E L 4細胞をP V 1 - I g G 3不含の過剰のP V 1で染色し、分析した。

【0076】

マウスT細胞染色のために、B A L B / cマウス脾臓細胞(2.5 × 10⁵細胞/0.2 ml)を1 μg/mlのマウスI g G 3イソタイプコントロール(F L O P C 2 1)またはP V 1 - I g G 3により4 で30分間染色し、2 mlの冷P B Sで洗浄し、20 μlのF I T C - 結合145.2C11(10 μg/ml)および20 μlのR - P E - 結合ヤギ抗マウスI g G 3(10 μg/ml)により染色した。暗所4 で20分間インキュベーションした後、細胞をP B Sで洗浄し、F A C Sキャンにより分析した。

10

結果

フローサイトメリーによるP V 1とP V 1 - I g G 3のキャラクタリゼーション：P V 1を使用してC D 2 8陽性T細胞株E L 4細胞を染色し、F A C Sキャンにより分析した。染色パターンはP V 1が2つの異なる部位でE L 4細胞に結合することを示した(図17A)。さらに、P V 1ならびに数種のアルメニア・ハムスター抗マウスT細胞抗体(145.2C11、抗C D 3 ; H 5 7 - 5 9 7、抗T C R ; およびU C 1 0 - 4 F 1 0 - 1、抗C T L A 4)もまたC D 2 8 - 陰性骨髓細胞株N S 0に非特異的に結合する(データ非開示)。他方、シリア・ハムスター抗C D 2 8抗体37.51はE L 4細胞の一箇所のみ特異的に結合する(図17B)。C D 2 8の結合の外に、P V 1もまた他の部位に非特異的に、恐らく糖質/レクチン型の相互作用を介して結合すると思われる。図17Cに示すように、キメラP V 1 - I g G 3はこの非特異的結合活性を含んでいない。該抗体は37.51と同様のパターンでE L 4細胞に結合し、C D 2 8陰性N S 0細胞には結合しない(データ非開示)。従って、P V 1の非特異結合性はこの特定抗体の重鎖定常領域に存在し、キメラ化することで除去される。

20

【0077】

P V 1 - I g G 3がC D 2 8特異結合活性を含むことを証明するために、我々はF A C Sキャン競合アッセイを使用した。これらの実験において、R - P E結合P V 1は過剰(25倍)の非標識P V 1、P V 1 - I g G 3またはマウスI g G 3対照と混合し、その混合物をE L 4細胞の染色に用いた。図18Aに示すように、イソタイプコントロールではないP V 1およびP V 1 - I g G 3双方が、R - P E結合P V 1がE L 4細胞に結合するのを妨げた。P V 1 - I g G 3による阻害はP V 1によるよりも低く、我々はこれらのデータについて、P V 1 - I g G 3がC D 2 8に対してR - P E結合P V 1と競合するが、非特異部位に対しては競合しないと解釈した。同様に、145.2C11(アルメニア・ハムスター抗マウスC D 3)およびキメラ145.2C11 - I g G 3は共にR - P E結合145.2C11がE L 4細胞に結合するのを妨げる(図18B)が、キメラ抗体はR - P E - 145.2C11の細胞に対する非特異的結合を除去できないためにその効果は劣る。

30

40

【0078】

我々はまた、E L 4細胞への結合に対してP V 1 - I g G 3と競合する過剰(25倍)のP V 1を用いて、逆の競合実験を行った。この場合、P V 1 - I g G 3は標識しなかったが、このものはF I T C - 結合ロバ抗マウス抗体により特異的に認識された。図18Cの結果は、過剰のP V 1によるE L 4細胞に対するP V 1 - I g G 3の結合阻害が殆ど競合によるものであることを示したが、このことはP V 1とP V 1 - I g G 3が同じエピトープに結合することを証明するものである。

【0079】

最後に、P V 1 - I g G 3を用いてマウス脾臓細胞を染色した。P V 1 - I g G 3被覆脾

50

臓細胞は二次抗体 R - P E 結合ヤギ抗マウス I g G 3 が特異的に認識した。同時に、F I T C - 結合 1 4 5 . 2 C 1 1 もまた脾臓細胞に添加し、C D 3 陽性細胞を標識した。二色フローサイトメトリー分析において、P V 1 - I g G 3 は特異的に C D 3 陽性細胞を染色したが、C D 3 陰性細胞は染色しなかった (図 1 9 B) 。他方、マウス I g G 3 イソタイプコントロールは C D 3 陽性細胞を染色しなかった (図 1 9 A) 。従って、キメラ P V 1 - I g G 3 はマウス T 細胞上に発現される抗原を認識し、その抗原結合活性は抗 C D 2 8 抗体と矛盾がない。

【 0 0 8 0 】

実施例 1 9

コラーゲン誘発関節炎の誘導

10

方法

ウシ C I I (コラーゲン技術研究会、日本) 1 2 5 μ g を等容量の C F A (和光、日本) で乳化し、マウスの尾根部に皮内投与して免疫した。21日目にウシ C I I / C F A 1 2 5 μ g を皮内注射して追加免疫した。最初の免疫から7日間、抗 C D 2 8 抗体 (P V 1 - I g G 3) 1 m g / k g / 日の用量により、浸透圧ポンプを介して継続注入し、マウスを処理した。2度目の免疫から11日目に四肢の関節炎の発症を精査チェックし、四肢の炎症についてすでに記載されているように0から3まで配点した (T a d a , Y . , A . H o , D . - R . K o h , T . W . M a k . 1 9 9 6 . J . I m m u n o l . 1 5 6 : 4 5 2 0 . T a d a , Y . , A . H o , T . M a t s u y a m a , T . W . M a k . 1 9 9 7 . J . E x p . M e d . 1 8 5 : 2 3 1) 。各足に配点し、4つのスコアを加算してマウス1匹あたりの最大スコアが12となるようにした。実験マウスの合計スコアを合計マウス数で割って関節炎指数を計算した。

20

結果

マウスをウシ C I I で免疫し、関節炎の発症について観察した。二回目の免疫後11日目に、関節炎指数は、抗 C D 2 8 抗体で処理したマウスにおいて、対照 (7 . 5 0 \pm 0 . 6 6) に対して有意に低下した (0 . 6 3 \pm 0 . 5 0) ($p < 0 . 0 1$) 。

【 0 0 8 1 】

実施例 2 0

方法

30

マウス：動物

メス B A L B / c および C 3 H マウスはチャールス・リバー (C h a r l e s R i v e r) ジャパン・インク (横浜、日本) から入手した。動物はすべて特別の病原菌のない設備において、エアフィルター付きの飼料飲料水に自由に接近できる小型隔離ケージで飼育した。マウスはすべて実験開始時に6~8週令であった。

抗体：

抗マウス・サイレント C D 2 8 (P V 1 - I g G 3) は P V - 1 クローンのものに特異性を有しているが、インビトロで強いアゴニスト活性はもたない (F c I g G 3) 。抗マウス C D 1 5 4 (T R A P 1 、 I g G 1) は B D ファーミングエン (P h a r M i n g e n) (サンティエゴ、カリフォルニア) 、 C T L A 4 - I g (C T L A - 4 / F c キメラ) はジェンザイム (G e n z y m e) (ケンブリッジ、マサチューセッツ) から購入した。

40

尾部皮膚移植：

供与マウス (B A L B / c : H - 2 d) の尾部からの完全な厚さの皮膚移植片を受容マウス (C 3 H : H - 2 b) の胸郭部に移植し、バンドエイドで7日間保持した。生存した移植片は毎日目視精査した。拒絶は生存表皮移植組織の > 8 0 % が失われた場合とした。ダンネット (D u n n e t t) の多重比較試験を用い、統計分析を実施した。 $p < 0 . 0 5$ の値を有意と見なした。

処理プロトコール：

皮膚移植片受容者を10、50、および250 μ g の抗マウス・サイレント C D 2 8 、 2 5 0 μ g の抗マウス C D 1 5 4 および100 μ g の C T L A 4 - I g により、移植した日 (0 日) および術後3日目および6日目に腹腔内投与で処理した。

50

結果

抗マウス・サイレントCD28および抗マウスCD154の投与によるCD40およびCD28 T細胞の共刺激経路を同時に遮断すると、C3Hマウスにおいて皮膚同種間移植の生存を効果的に促進する。対照動物は9日目でその移植片を拒絶した。抗CD40 LmAbのみでは同種間移植の生存を適度に延長した(平均生存時間(MST)10日)が、CD28と併用した場合、生存が劇的に改善され、平均生存時間(MST)が33日を越える延長を認めた。この戦略はCTLA-4-Igと抗マウスCD40 LmAbの投与では顕著に効果が低下し、MSTは12日である。

実施例21

FabおよびF(ab')₂フラグメントならびに抗CD28抗体の調製

10

抗CD28抗体のFabフラグメントの調製

抗ヒトCD28抗体(HuTN228)を固定化フィシン(ピアース、米国)により消化した。固定化フィシンは5mM-EDTAおよび11.5mMシステインHCl含有の50mMトリスHClバッファー(pH6.8)にて活性化し、カラムに詰めた。抗体溶液をカラムに加え、37にて2~3日間インキュベートした。カラムをPBSで洗浄し、消化物は超遠心により濃縮した。濃縮した消化物をゲル濾過カラム(TSKゲル-3000Wx1、東ソー、日本)に付し、適切なフラクションを集めて超遠心により濃縮した。タンパク質濃度は280nm(Abs₂₈₀=1.4、1mg/mL)での吸光度により決定し、フラグメントのサイズをSDS-PAGEにより確認した。

抗CD28抗体のF(ab')₂フラグメントの調製

20

抗ヒトCD28抗体はFabフラグメントの場合と同じ方法で調製したが、その際、システイン濃度(1.15mM)およびインキュベーション時間(一夜)は例外とした。

【0082】

上記の教示に照らして、本発明を様々に修正および改変することは明らかに可能である。従って、本発明は上記の請求項の範囲内で、具体的に本明細書に記載した以外でも実施し得ることを理解すべきである。

【0083】

本明細書に記載したすべての出版物、特許出願、特許、およびその他の文献はその全体を参照により本明細書の一部とする。

【0084】

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> VASQUEZ, Maximiliano

HINTON, Paul

TAMURA, Kouichi

HIGASHI, Yauyuki

10

SEKI, Nobuo

UEDA, Hirotsugu

TSO, J. Yun

<120> SILENCED ANTI-CD28 ANTIBODIES AND USE THEREOF

20

<130> 200071USOPROV

<150> US 60/255,155

<151> 2000-12-14

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

10

<210> 1

<211> 427

<212> DNA

<213> hybrid

20

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(404)

<223>

<400> 1

tctagaccac c atg gag tca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctc 50

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu

1 5 10

tgg gtt cca ggc tcc act ggt gac att gtg ctc acc caa tct cca gct 98

Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala

15 20 25

10

tct ttg gct gtg tct ctg ggg cag aga gcc acc atc tcc tgc aga gcc 146

Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala

30 35 40 45

agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa 194

Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln

50 55 60

20

cag aaa cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac 242

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn

65 70 75

gta gat tct ggg gtc cct gcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca 290

Val Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

80 85 90

gac ttc agc ctc aac atc cat cct gtc gag gag gat gat att gca atg 338
 Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
 95 100 105

tat ttc tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc tcg ggg 386
 Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly
 110 115 120 125

aca aag ttg gaa ata aaa cgtaagtaga cttttgctct aga 427
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 130

10

<210> 2

<211> 131

<212> PRT

<213> hybrid

20

<400> 2

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

10

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110

20

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 3

<211> 877

<212> DNA

<213> hybrid

10

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(431)

<223>

20

<400> 3

tctagaccac c atg gag tca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctc	50
Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu	
1 5 10	

tgg gtt cca ggc tcc act ggt gac att gtg ctc acc caa tct cca gct	98
---	----

Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 15 20 25

tct ttg gct gtg tct ctg ggg cag aga gcc acc atc tcc tgc aga gcc 146
 Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 30 35 40 45

agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa 194
 Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
 50 55 60

10

cag aaa cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac 242
 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn
 65 70 75

gta gat tct ggg gtc cct gcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca 290
 Val Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 80 85 90

gac ttc agc ctc aac atc cat cct gtg gag gag gat gat att gca atg 338
 Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
 95 100 105

20

tat ttc tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc tcg ggg 386
 Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly
 110 115 120 125

aca aag ttg gaa ata aaa cgt aag tag act ttt gct cta gat cta 431
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Lys Thr Phe Ala Leu Asp Leu

130

135

gaccacatg gctgtcctgg tgcigtctct ctgcttgggt gcatttcaa gctgtgtcct 491
 gtcccaggig cagctgaagg agtcaggacc tggcctggig gcgccctcac agagcctgtc 551
 catcacttgc actgtctctg gatttcatt aaccagctat ggtgtacact gggttcgcca 611
 gcciccagga aagggtcigg aatggctggg agtcataigg cctgggtggag gcacaaatt 671
 taattcggct ctcattgcca gactgagcat cagcgaagac aaticcaaga gccaaagttt 731
 cttaaaaatg aacactctgc aaactgatga cacagccata tattattgtg ccagagatcg 791
 ggcgtatggg aactacctct atgcatgga ctactgggtt caaggaacct cagtcaccgt 851
 ctctcagggt aagaatggcc tctaga 877

10

<210> 4

20

<211> 133

<212> PRT

<213> hybrid

<400> 4

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

10

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser
 65 70 75 80

20

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Lys
130

<210> 5

10

<211> 6

<212> PRT

<213> hybrid

<400> 5

20

Thr Phe Ala Leu Asp Leu
1 5

<210> 6

<211> 450

<212> DNA

<213> hybrid

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(431)

10

<223>

<400> 6

tctagaccac c atg gct gtc ctg gtg ctg ttc ctc tgc ctg gtt gca ttt 50

Met Ala Val Leu Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe

1 5 10

20

cca agc tgt gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag gag tca gga cct ggc 98

Pro Ser Cys Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly

15 20 25

ctg gtg aag ccc tca gag acc ctg tcc ctc act tgc gct gtc tct gga 146

Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly

30 35 40 45

ttt tca tta acc agc tat ggt gta cac tgg att cgc cag cct cca gga	194	
Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly		
50 55 60		
aag ggt ctg gaa tgg ctg gga gtc ata tgg cct ggt gga ggc aca aat	242	
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn		
65 70 75		
ttt aat tcg gct ctc atg tcc aga ctg acc atc agc gaa gac acc tcc	290	
Phe Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser		10
80 85 90		
aag aac caa gtt tcc tta aaa ttg agc tct gtg aca gct gct gac aca	338	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr		
95 100 105		
gcc gta tat tat tgt gcc aga gat cgg gcg tat ggt aac tac ctc tat	386	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Leu Tyr		
110 115 120 125		
gcg atg gac tac tgg ggt caa gga acc tta gtc acc gtc tcc tca	431	20
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
130 135 140		
ggtaagaatg gcctctaga	450	

<211> 140

<212> PRT

<213> hybrid

<400> 7

Met	Ala	Val	Leu	Val	Leu	Phe	Leu	Cys	Leu	Val	Ala	Phe	Pro	Ser	Cys
1			5						10					15	

10

Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys
			20					25					30		

Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
		35					40					45			

20

Thr	Ser	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	50					55						60			

Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Pro	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	Ser
65					70					75					80

Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Leu Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

10

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 8

<211> 427

20

<212> DNA

<213> hybrid

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(404)

<223>

<400> 8

tctagaccac c atg gag tca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctc	50	
Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu		10
1 5 10		
tgg gtt cca ggc tcc act ggt gac att cag atg acc caa tct cca tct	98	
Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser		
15 20 25		
tct ttg tct gcg tct gtg ggg gac agg gtc acc atc aca tgc aga gcc	146	
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala		
30 35 40 45		20
agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa	194	
Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln		
50 55 60		
cag aaa cca gga aag gca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac	242	
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn		
65 70 75		

gta gat tct ggg gtc cct tcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca 290
 Val Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 80 85 90

gac ttc acc ctc acc atc tct tct ctg cag ccg gag gat att gca acg 338
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr
 95 100 105

tat tac tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc ggg ggg 386
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
 110 115 120 125

10

aca aag gtg gaa ata aaa cgtaagtaga cttttgctct aga 427
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 130

<210> 9

<211> 131

<212> PRT

<213> hybrid

<400> 9

20

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

10

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

20

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

115

120

125

Glu Ile Lys
130

<210> 10

<211> 445

<212> DNA

<213> hybrid

<220>

<221> CDS

<222> (21)..(419)

<223>

<400> 10

tctagacagt ~~ggg~~gaacaat atg gat tca cag atc cag gtc ctc atg tcc ctg 53

10

20

110

115

120

ttc ggt gat ggc acc aag cag gag ata aga cgtaagtaga atccaaagtc 439
 Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg

125

130

tctaga 445

<210> 11

10

<211> 133

<212> PRT

<213> hybrid

<400> 11

20

Met Asp Ser Gln Ile Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Met Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Tyr Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Tyr Tyr Ser Gly Ile Lys Lys Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Thr Arg
65 70 75 80

10

Leu Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Met Gly His Tyr
100 105 110

Phe Cys Gln Gln Gly Ile Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr
115 120 125

20

Lys Leu Glu Ile Arg
130

<210> 12

<211> 467

<212> DNA

<213> hybrid

<220>

10

<221> CDS

<222> (16)..(444)

<223>

<400> 12

tctagagtct tcacc atg gta tgg ggc ttg atc atc atc ttc ctg gtc aca 51 20
 Met Val Trp Gly Leu Ile Ile Ile Phe Leu Val Thr
 1 5 10

gca gct aca ggt gtc cac tcc cag gtc cag ttg aag cag tct ggg gct 99
 Ala Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala
 15 20 25

gag ctt gtg aag cct gga gcc tca gtg aag ata tcc tgc aaa act tca 147

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser		
30	35	40
ggc tat acc ttc act gat ggc tac atg aac tgg gtt gag cag aag cct	195	
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Gly Tyr Met Asn Trp Val Glu Gln Lys Pro		
45	50	55
60		
ggg cag ggc ctt gag tgg att gga aga att gat cct gat agt ggt aat	243	
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asn		
65	70	75
act cgg tac aat cag aaa ttc cag ggc aag gcc aca ctg act aga gac	291	
Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp		
80	85	90
aaa tcc tcc agc aca gtc tac atg gac ctc agg agc ctg aca tct gag	339	
Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu		
95	100	105
gac tct gct gtc tat tac tgt gcg aga gat ggg acc ttc tac ggt acc	387	
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Thr Phe Tyr Gly Thr		
110	115	120
tac ggc tac tgg tac ttc gat ttc tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc	435	
Tyr Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr		
125	130	135
140		
gtc tcc tca ggtgagtcct taaaacctct aga	467	
Val Ser Ser		

10

20

<210> 13

<211> 143

<212> PRT

<213> hybrid

10

<400> 13

Met Val Trp Gly Leu Ile Ile Ile Phe Leu Val Thr Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

20

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Gly Tyr Met Asn Trp Val Glu Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 14

tatagagctc aagcttggat ggtggaaga tggatacagt tggcgc

46

10

<210> 15

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 15

tatagagctc aagcttccag tggatagacc gatgggctg tcgtttggc

50

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> synthetic DNA

<400> 16

tatagagctc aagcttccag tggatagaca gatgggggtg tigtittggc

50

<210> 17

<211> 50

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 17

tatagagctc aagcttccag tggatagacc gtggggctg tcgttttggc 50

<210> 18

<211> 50

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

20

<400> 18

tatagagctc aagcttccag tggatagacc gatggggctg tcgttttggc 50

<210> 19

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 19

tatagagctc aagcttccag tggatagacc gatggggctg ttgttttggc 50

10

<210> 20

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 20

tatagagctc aagcttccag tggatagctc gatggggctg tcgttttggc 50

30

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 21

tatagagctc cacttccagt gcc 24

【 図面の簡単な説明 】

50

【図1】

図1. ChTN228抗体発現用プラスミドの構造。マウスTN228のVLおよびVHはXbaI部位の隣接するミニ-エキソンとして構築した。VL配列は発現ベクターpVkに組み込ませ、またVH配列は発現ベクターpVg2M3に組み込ませた。

【図2】

図2. ミニ-エキソンのChTN228軽鎖のヌクレオチド配列とその推定アミノ酸配列。シグナルペプチド配列はイタリックで示す。CDRには下線を付す。成熟軽鎖はアスパラギン酸残基(太字)から始まる。非翻訳イントロン配列は小文字で示す(配列番号1および2)。

【図3】

図3. ミニ-エキソンのChTN228重鎖可変領域のヌクレオチド配列とその推定されるアミノ酸配列。シグナルペプチド配列はイタリックで示す。CDRには下線を付す。成熟重鎖はグルタミン残基(太字)から始まる。非翻訳イントロン配列は小文字で示す(配列番号3および4)。

【図4】

図4. 競合実験。P815/CD28⁺細胞を25ngのMuTN228-FITCおよびChTN228またはMuTN228の2倍系列希釈液と記載のようにインキュベートした。P815/CD28⁻細胞もまた競合体なしに、MuTN228-FITCのみとインキュベートした。各試料の平均蛍光強度を競合体の濃度に対してプロットした。

【図5】

図5. ヒト一次MLR(1)に対するTN228-IgG2m3の阻害作用。4人の個体からの一次MLRの阻害率(%)を個々に示した。

【図6】

図6. ヒト一次MLR(2)に対するTN228-IgG2m3の阻害作用。4人の個体からの一次MLRの阻害率(%)を個々に示した。

【図7】

図7. 二次MLRに対するTN228-IgG2m3の作用。ボランティア2名からのデータを個々に示した。[³H]-チミジンの二次MLR取り込みは、一次MLRを100としてラジ(Raji)刺激のみのdpmのパーセントで表した。TN228-IgG2m3: 0.1μg/mL。

【図8】

図8. HuTN228抗体発現用のプラスミドの構造。ヒト化TN228のVLおよびVHはXbaI部位の隣接するミニ-エキソンとして構築した。VL配列は発現ベクターpVkに組み込ませ、またVH配列は発現ベクターpVg2M3に組み込ませた。

【図9】

図9. ミニ-エキソンのHuTN228重鎖可変領域のヌクレオチド配列とその推定されるアミノ酸配列。シグナルペプチド配列はイタリックで示す。CDRには下線を付す。成熟重鎖はグルタミン残基(太字)から始まる(配列番号5および6)。

【図10】

図10. ミニ-エキソンのHuTN228軽鎖可変領域のヌクレオチド配列とその推定されるアミノ酸配列。シグナルペプチド配列はイタリックで示す。CDRには下線を付す。成熟軽鎖はアスパラギン酸残基(太字)から始まる(配列番号7および8)。

【図11】

図11. FACS競合アッセイ。FITC-標識MuTN228が種々量の競合体MuTN228またはHuTN228抗体の存在下で、P815/CD28⁺細胞に結合するのを、実施例記載のように、フローサイトメトリー競合実験により分析した。

【図12】

図12. ELISA競合アッセイ。ビオチン化MuTN228が種々量の競合体MuTN228またはHuTN228抗体の存在下で、sCD28-Fcに結合するのを実施例記載のように、ELISA競合実験により分析した。

10

20

30

40

50

【図13】

図13. I-125競合アッセイ。¹²⁵I-標識MuTN228が種々量の競合体MuTN228またはHuTN228抗体の存在下で、P815/CD28⁺細胞に結合するのを、実施例記載のように、¹²⁵I-標識抗体競合実験により分析した。

【図14】

図14. PV1-IgG3抗体発現用のプラスミドの構造。PV1のV_LおよびV_HはXbaI部位の隣接するミニ-エキソンとして構築した。V_L配列は発現ベクターpMVk.rg.dEに組み込ませ、またV_H配列は発現ベクターpMVg3.D.Ttに組み込ませた。この2つのプラスミドにつき組換えを行って、PV1-IgG3の重鎖および軽鎖を同時発現する単一のプラスミドを生成させた。

10

【図15】

図15A. ミニ-エキソンの軽鎖および重鎖のcDNA配列とその推定されるアミノ酸配列。CDRには下線を付す。成熟軽鎖は20位のアスパラギン酸残基(二重下線)から始まる(配列番号9および10)。

【図16】

図15B. ミニ-エキソンのPV1の可変領域のcDNA配列とその推定されるアミノ酸配列。CDRには下線を付す。成熟重鎖は20位のグルタミン(二重下線)から始まる(配列番号11および12)。

【図17】

図16. 方法の項に記載したHPLC使用のサイズ排除クロマトグラフィーによるPV-1-IgG3の分析。タンパク質は280nMでの吸光度によりモニターした。

20

【図18】

図17. SDS-PAGEによる分析。マウスIgG3イソタイプコントロール(レーン1)、PV1(レーン2)、およびPV1-IgG3(レーン3)。パネルAのタンパク質は非還元条件下に、またパネルBは還元条件下に泳動させた。MWは分子量マーカを表す。数値はkDで示したMW標準品である。

【図19】

図18. PV1(A)、37.51(B)、またはPV1-IgG3(C)で染色し、フローサイトメトリーで分析したEL4細胞。使用した二次抗体は、PV1用FITC結合ロバ抗アルメニ・アハムスターIgG(H+L)、37.51用FITC結合ロバ抗シリア・アハムスターIgG、およびPV1-IgG3用FITC結合ヤギ抗マウスカッパであった。実線プロファイルは二次抗体のみで染色した細胞を表す。点線のプロファイルは方法の項に記載した一次抗体および二次抗体の両方で染色した細胞を表す。マウスIgG3イソタイプコントロールはEL4細胞を染色しなかった(データ非開示)。

30

【図20】

図19. (A)過剰のPV1、またはPVI-IgG3はEL4細胞へのR-PE結合PV1の結合と競合する。フローサイトメトリー・ヒストグラムの細い実線(黒)は染色しない細胞を表し、太い実線(濃紺)はR-RE-PV1のみで染色した細胞、細い点線(赤紫)はR-PE-PV1と過剰の非結合PV1で染色した細胞、細い二重点線(淡青)はR-PE-PV1と過剰の非結合PV1-IgG3で染色した細胞をそれぞれ示す。過剰のマウスIgG3イソタイプコントロールはEL4細胞に結合するR-PE-PV1に影響しなかった(データ非開示)。(B)過剰の145.2C11、または145.2C11-IgG3はEL4細胞へのR-PE結合145.2C11の結合と競合する。細い実線(黒)は染色しない細胞を表し、太い実線(濃紺)はR-RE-145.2C11のみで染色した細胞、細い点線(赤紫)はR-PE-145.2C11と過剰の非結合145.2C11で染色した細胞、細い二重点線(淡青)はR-PE-145.2C11と過剰の非結合145.2C11-IgG3で染色した細胞をそれぞれ示す。(C)過剰のPV1はEL4細胞へのPV1-IgG3の結合と競合する。EL4細胞は過剰のPV1の存在下または不存在下にPV1-IgG3により染色された。細胞を洗浄し、マウスIgG3特異FITC結合ロバ抗マウスIgG(H+L)で染色した。細い実線(黒)は二

40

50

次抗体のみで染色した細胞を表し、太い実線（濃紺）はPV1-IgG3と二次抗体で染色した細胞、細い点線（赤紫）はPV1-IgG3と過剰のPV1と二次抗体で染色した細胞をそれぞれ示す。

【図21】

図20. PV1-IgG3および145.2C11で染色したマウス脾臓細胞。マウスIgG3イソタイプコントロール(A)またはPV1-IgG3(B)で細胞を染色し、R-PE結合ヤギ抗マウスIgG3で染色し、次いでFITC結合145.2C11で染色して、材料と方法の項に記載したように、二色フローサイトメトリーにより分析した。リンパ球ゲートの細胞のみを分析した。PV1-IgG3陽性細胞は上部四半分にあり、CD3陽性細胞は右側四半分にある。各四半分中の数値はその特定した四半分中の細胞の百分比を表す。

10

【図1】

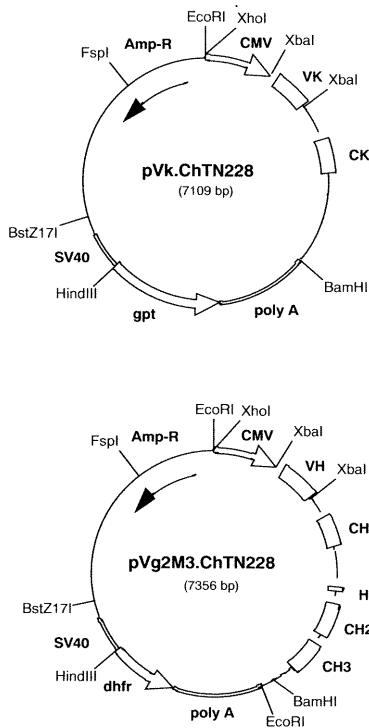


図1.

【図2】

```

30          60
tctagaccaccATGGAGTCAGACAGACTCCTGCTATGGGTGCTGCTCTGGGTCCAG
  M E S D T L L L W V L L L W V P

90          120
GCTCCACTGGTGACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGC
  G S T G D I V L T Q S P A S L A V S L G

150         180
AGAGAGCCACCATCTCTGCAGAGCCAGTCAAAGTGTGAATATATGTCACAAGTTAA
  Q R A T I S C R A S E S V E Y Y V T S L

210         240
TGCAGTGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGTCGATCCA
  M Q W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S

270         300
ACGTAGATTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCC
  N V D S G V P A R F S G S G S G T D F S

330         360
TCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGATGATATTGCAATGTATTCTGTGACCAAGTAGGA
  L N I H P V E E D D I A M Y F C Q Q S R

390         420
AGGTTCCATTCAGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACglaagtagacttttg
  K V P F T F G S G T K L E I K

ctctaga

```

図2.

【 図 3 】

```

          30          60
tctagaccaccATGGCTGTCCTGGTGTCTCCTCTGCCTGGTTGCAITTCACAGCTGTG
      M A V L V L F L C L V A F P S C

          90          120
TCCTGTCCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGGCCCTCACAGAGCC
V L S Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S

          150          180
TGCCATCACTTGCCTGTCTGGATTTCATTAACCAGCTATGGTGACACTGGGTTC
L S I T C T V S G F S L T S Y G V H W V

          210          240
GCCAGCCTCCAGGAAAGGCTGGAATGGCTGGGAGTCATATGGCCTGGTGGAGGCACAA
R Q P P G K G L E W L G V I W P G G G T

          270          300
ATTTAATTCCGGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCGAAGACAACCTCAAGAGCCAAG
N F N S A L M S R L S I S E D N S K S Q

          330          360
TTTTCTFAAAAAATGAACACTCTGCAAACTGATGACACAGCCATATATTATTGTGCCAGAG
V F L K M N T L Q T D D T A I Y Y C A R

          390          420
ATCGGGGGTATGGTAACTACCTCTATGCCATGGACTACTGGGCTCAAGGAACCTCAGTCA
D R A Y G N Y L Y A M D Y W G Q G T S V

          450
CCGTCTCCTCAGtaagaatggcctctaga
T V S S

```

図 3 .

【 図 4 】

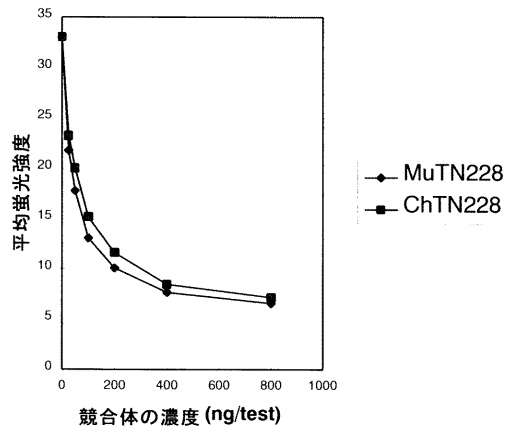


図 4 .

【 図 5 】

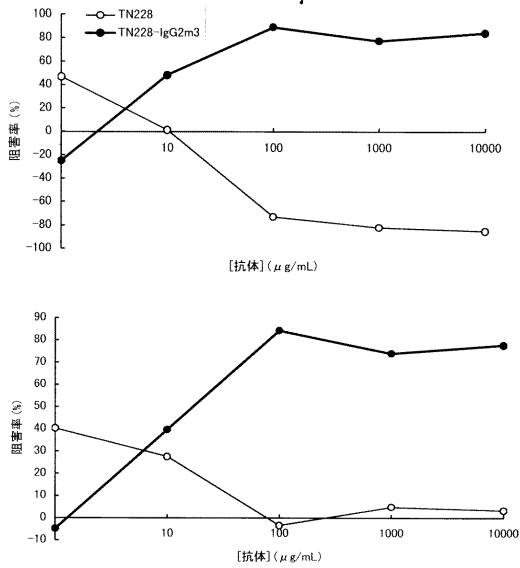


図 5

【 図 6 】

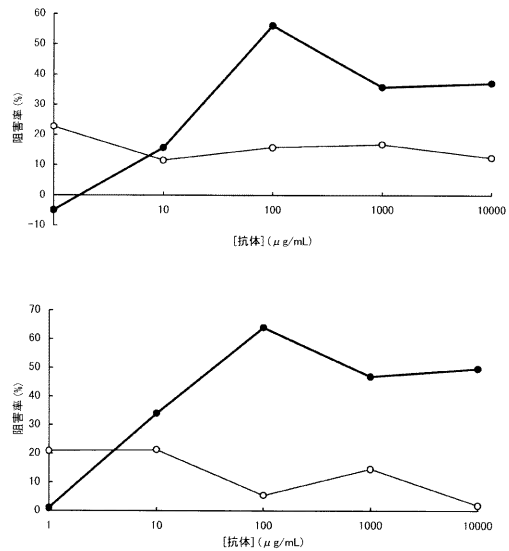
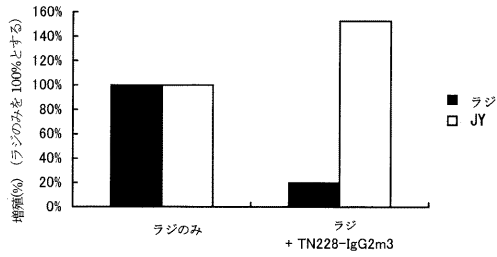


図 6

【 図 7 】

ボランティア:A



ボランティア:B

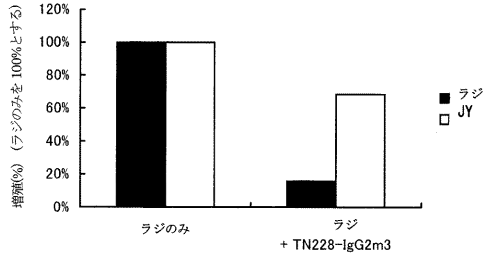


図 7

【 図 8 】

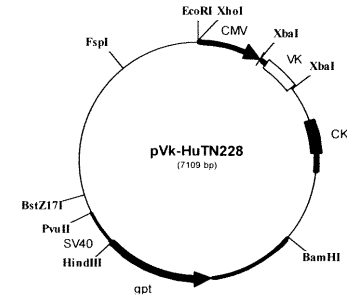
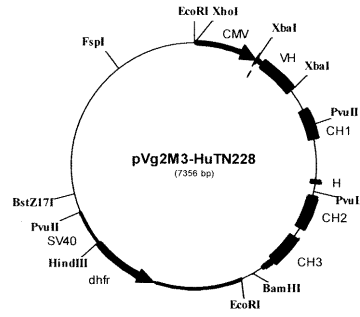


図 8

【 図 9 】

```

tctagaccaccATGGCTGCTCCTGGTCTCTGCCTGGCTTGCATTTCCAAGCTGTG
  M A V L V L F L C L V A F P S C
                                     90          120
TCCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACTGGCTGGTGAAGCCCTCAGAGACCC
  V L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T
                                     150          180
TGTCCTCACTTGGCTGTCTCTGGATTTTCATTAACACAGCTATGGTGTACACTGGATT
  L S L T C A V S G F S L T S Y G V H W I
                                     210          240
GCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGCTGGGAGTCATATGGCCTGGTGGAGGCACA
  R Q P P G K G L E W L G V I W P G G G T
                                     270          300
ATTTAATTCCGGCTCTCATGTCCAGACTGACCATCAGCAGAACACCTCCAAGAACAAG
  N F N S A L M S R L T I S E D T S K N Q
                                     330          360
TTTCCTTAAAMTTGAGCTCTGTGACAGCTGCTGACACAGCCGTATATTATTGTGCCAG
  V S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R
                                     390          420
ATCGGGCGTATGGTAACCTCTATGCGATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTTAGTCA
  D R A Y G N Y L Y A M D Y W G Q G T L V
                                     450
CCGTCTCTCAGGtaagaatggcctctaga
  T V S S
    
```

図 9

【 図 10 】

```

                                     30          60
tctagaccaccATGGAGTCAGACACTCTCTGCTATGGGTGCTGCTCTGGGTCCAG
  M E S D T L L L W V L L L W V P
                                     90          120
GCTCCACTGGTGACATTCAGATGACCAATCTCCATCTCTTTGCTGCGCTGTGGGGG
  G S T G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
                                     150          180
ACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGTGAAAGTGTGAATATTATGTCACAAGTTAA
  D R V T I T C R A S E S V E Y Y V T S L
                                     210          240
TGCAGTGTACCAACAGAAACCAGGAAAGGCACCCAACCTCTCATCTATGTCGATCCA
  M Q W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S
                                     270          300
ACGTAGATTCTGGGGTCCCTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTCACCC
  N V D S G V P S R F S G S G S G T D F T
                                     330          360
TCACCATCTCTCTGTCAGCCGGAGGATATTGCAAGCTTACTGTCAGCAAGTAGGA
  L T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q S R
                                     390          420
AGTTCCATTACGTTTCGGCGGGGGACAAAGGTGAAATAAAACgtaagtagacttttg
  K V P F T F G G G T K V E I K
ctctaga
    
```

図 10

【 図 1 1 】

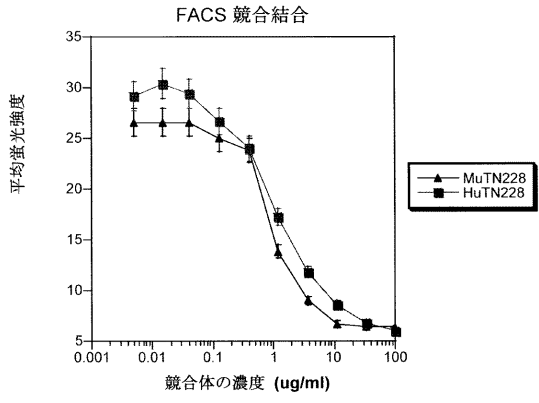


図 11.

【 図 1 2 】

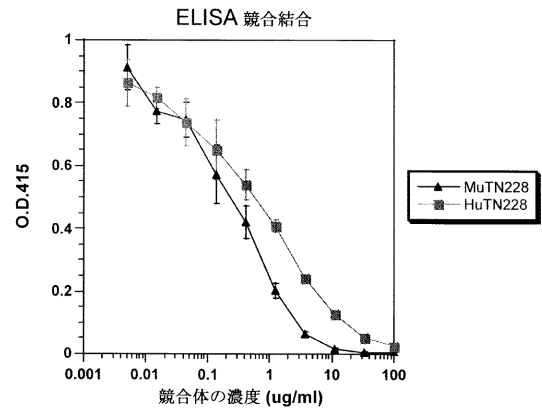


図 12.

【 図 1 3 】

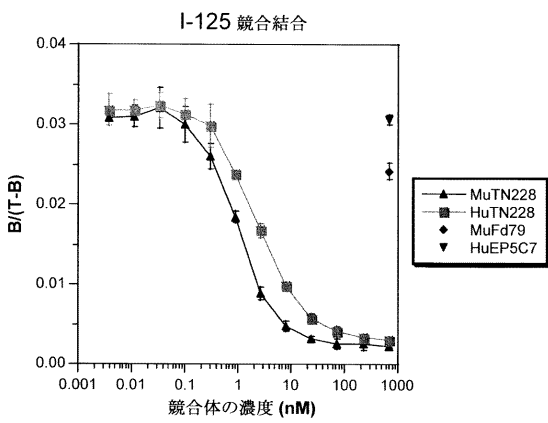


図 13.

【 図 1 4 】

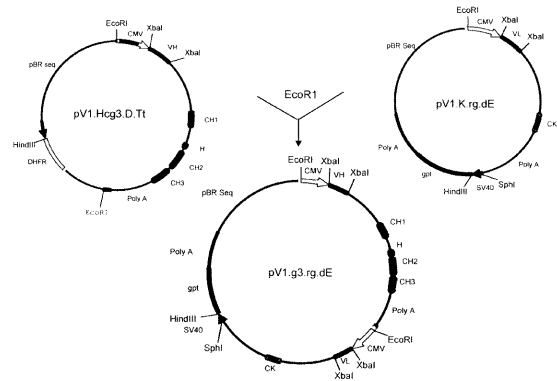


図 14.

【 15 】

A

XbaI
 tctagacagtggggaacaat ATG GAT TCA CAG ATC CAG GTC CTC ATG TCC
 M D S Q I Q V L M S

CTG CTC CTC TGG ATG TCT GGT GCC TGT GGA GAT ATT GTG ATG ACC
 L L L W M S G A C G D I V M T

CAG TCT CCA TAT TCC CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC ACC
 Q S P Y S L A V S A G E K V T

ATG AGT TGC AGG TCC AGT CAG AGC CTC TAT TAC AGT GGA ATC AAA
 M S C R S S Q S L Y Y S G I K

AAG AAC CTC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCG
 K N L L A W Y Q Q K P G Q S P

AAA CTG CTG ATC TAC TTT ACA TCT ACT CCG TTA CCT GGG GTA CCG
 K L L I Y E T S T R L P G V P

GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TAC ACT CTC ACC
 D R F T G S G S G T D Y T L T

ATC ACC AGT GTC CAG GCT GAA GAC ATG GGG CAT TAT TTC TGT CAG
 I T S V Q A E D M G H Y F C Q

CAG GGT ATA AGC ACT CCG CTC ACG TTC GGT GAT GGC ACC AAG CTG
 Q G I S T P L T F G D G T K

GAG ATA AGA Cgtaagtagaatccaaagtctctaga
 E I R XbaI

15A

【 16 】

B

XbaI
 tctagagtcttcacc ATG GTA TGG GGC TTG ATC ATC ATC TTC CTG GTC
 M V W G L I I I F L V

ACA GCA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAG TTG AAG CAG TCT
 T A A T G V H S Q V Q L K Q S

GGG GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGA GCC TCA GTG AAG ATA TCC TGC
 G A E L V K P G A S V K I S C

AAA ACT TCA GGC TAT ACC TTC ACT GAT GGC TAC ATG AAC TGG GTT
 K T S G Y T F T D G Y M N W V

GAG CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGA ATT GAT
 E Q K P G Q G L E W I G R I D

CCT GAT AGT GGT AAT ACT CCG TAC AAT CAG AAA TTC CAG GGC AAG
 P D S G N T R Y N Q K F Q G K

GCC ACA CTG ACT AGA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GTC TAC ATG GAC
 A T L T R D K S S T V Y M D

CTC AGG AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCT GTC TAT TAC TGT GCG
 L R S L T S E D S A V Y Y C A

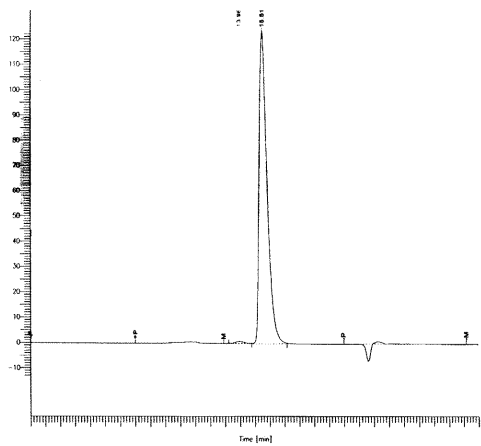
AGA GAT GGG ACC TTC TAC GGT ACC TAC GGC TAC TGG TAC TTC GAT
 R D G T F Y G T Y G Y W Y F D

TTC TGG GGC CAG GGG ACC CAG GTC ACC GTC TCC TCA G gtgagtcct
 F W G Q G T Q V T V S S

taaaacctctaga
 XbaI

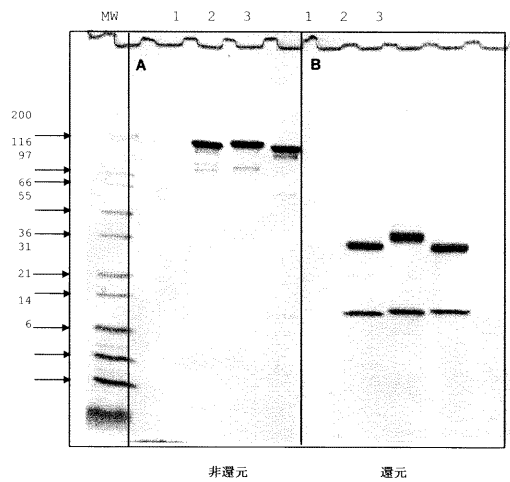
15.

【 17 】



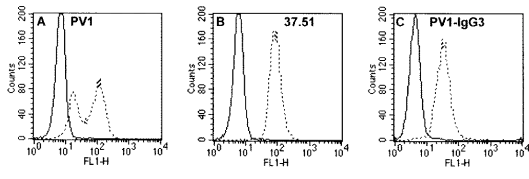
16

【 18 】



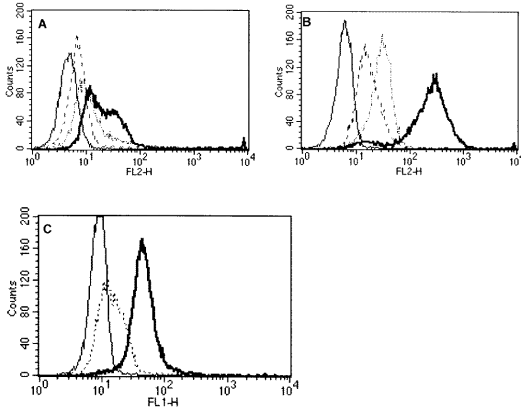
17.

【 19 】



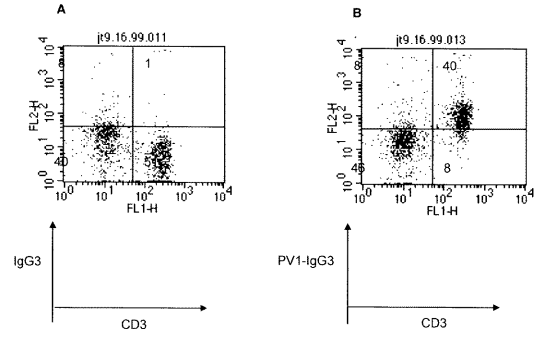
18 .

【 20 】



19 .

【 21 】



20 .

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 June 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/47721 A1(51) International Patent Classification: A61K 39/395,
C07K 16/28, C12N 5/10, 15/00, 15/12, 15/13

(74) Agent: OBLON, Norman, F.; Oblon, Spivak, McClelland, Maier & Neustadt, P.C., 1755 Jefferson Davis Highway, 4th floor, Arlington, VA 22202 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/47955

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
14 December 2001 (14.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/255,155 14 December 2000 (14.12.2000) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicants and

(72) Inventors: TSO, J., Yun [US/US]; 445 Oak Grove Avenue #16, Menlo Park, CA 94025 (US). HINTON, Paul [US/US]; 3825 Heritage Terrace #247, Fremont, CA 94536 (US). VASQUEZ, Maximiliano [US/US]; 3813 Louis Road, Palo Alto, CA 94303 (US). TAMURA, Kouichi [JP/JP]; Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 4-7, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8514 (JP). HIGASHI, Yasuyuki [JP/JP]; Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 4-7, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8514 (JP). SEKI Nobuo [JP/JP]; Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 4-7, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8514 (JP). UEDA, Hirotsugu [JP/JP]; Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 4-7, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8514 (JP).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/47721 A1

(54) Title: SILENCED ANTI-CD28 ANTIBODIES AND USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides anti-CD28 antibodies which are defective in mitogenic activity (silenced anti-CD28 antibodies), methods of producing, compositions containing the antibody and methods of immunosuppression, inducing T-cell tolerance and treating organ and/or tissue transplant rejections.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

TITLE OF THE INVENTION
SILENCED ANTI-CD28 ANTIBODIES AND USE THEREOF

Field of the Invention

5 This invention relates to anti-CD28 antibodies defective of mitogenic activity and to uses thereof.

Background of the Invention

Immune reactions, particularly organ transplant rejections, are chiefly attributed to the activation of T-lymphocytes. This activation of T cells is induced by a signal from antigen-presenting cells (APC). The signal from the APC involves a first signal via the T-cell receptor (TCR) and a second signal (costimulatory signal) via costimulatory molecules. The first signal is from the major histocompatibility antigen (MHC) complex of peptides antigen where the APC is presents the T-cell antigen through the TCR. The second signal is mediated by several co-stimulatory molecules, examples of which include B7 (B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86)) are known as ligands on the APC side and CD28, CTLA-4, etc. as receptors on the T-cell side. The ligand B7 is a glycoprotein belonging to the immunoglobulin super family and is expressed in B cells etc. which belong to the antigen-presenting cell group. Both CD28 and CTLA-4, which recognize B7 as the common ligand, are transmembrane glycoproteins belonging to the immunoglobulin super family. Thus, the activation of T cells is regulated by the concurrent transduction of the first signal via TCR and the second signal from, e.g., the B7 and CD28/CTLA-4. The signal from B7 to CD28 is known to promote whereas the signal from B7 to CTLA-4 inhibits the activation of T cells [Waterhouse et al., Science, 270:985-988 (1995)].

Heretofore, for the purpose of inducing immunosuppression or tolerance, attempts have been made to block the B7-CD28 signal by administering CTLA-4Ig, anti-B7-1 antibody/anti-B7-2 antibody, anti-CD28 antibody or the like. For example, CTLA-4Ig binds to B7 thereby interfering with the reaction between B7 and CD28 and, as a consequence, block the signal from CD28 to exhibit immunosuppressive activity. However, since the reaction between B7 and CTLA-4 is also inhibited simultaneously, the signal of CTLA-4 acting negatively on the activation of T cells is also suppressed so that the desired tolerance is not induced (Kirk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:8789-8794 (1997)). An anti-B7 antibody was also prepared and reported to have suppressed activation of T cells but just as in the case of CTLA-4Ig, it suppressed the CTLA-4 signal as well.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

An anti-CD28 antibody, in an *in vitro* experiment, was found to produce a mitogenic effect on T cells, and the combination of the stimulation with this antibody and an anti-CD3 antibody promoted the growth and activation of T cells and enhanced the production of cytokines [WO 90/05541, Eur. J. Immunology, 16, 1289-1296 (1986), etc.]. Furthermore, mitogenic stimulation of the CD28 receptor of the T cell by an anti-CD28 antibody has been stimulated *in vivo* resulted in the generation of a T-cell activation signal similar to the second signal from B7 to CD28 [Yin et al., J. Immunology, 163:4328-4334 (1999)]. These T-cell activating functions suggested that an anti-CD28 antibody might be used as an immunopotentiator in the therapy of cancer and AIDS (WO 90/05541).

SUMMARY OF THE INVENTION

The anti-CD28 antibodies prepared by conventional technologies exert a mitogenic action on T cells. Although the reasons for this mitogenic activity is not fully understood, the binding of the anti-CD28 Fc region to the Fc receptor of the antigen-presenting cell is believed to be the probable reason (Cole et al., J. Immunology, 36:159 (1997)). Therefore, by utilizing genetic engineering technology, we introduced mutations into the Fc receptor binding site of the anti-CD28 antibody to modify the antibody so that it would no longer have mitogenic activity. One such antibody the present inventors have generated, TN228 IgG2M3, in which IgG2M3 has two amino acid substitution in IgG gene. Furthermore, we demonstrated that the resulting silenced anti-CD28 antibody has no mitogenic activity which is very useful for inducing T cell tolerance.

Therefore, the present invention provides anti-CD28 antibodies having no mitogenic activity (hereinafter referred to as silenced anti-CD28 antibodies), and a methods of suppressing immune reactions, particularly transplant rejections, and inducing immunotolerance by using said antibodies.

An object of the present invention is a silenced anti-CD28 antibody, where the anti-CD28 antibody may be a chimeric antibody and/or a humanized antibody. The variable regions of the anti-CD28 antibodies may include the amino acid sequences shown in SEQ ID NOS: 2, 4, 6 and 8 and polynucleotides encoding such amino acid sequences. For example, such polynucleotides include SEQ ID NOS: 1, 3, 5, and 7.

Another object of the present invention is vectors and cell hosts comprising the polynucleotides which encode the anti-CD28 antibodies.

Another object of the present invention is methods for producing the silenced anti-CD28 antibody by culturing a cell host comprising the polynucleotides which encode the anti-CD28 antibodies under conditions which allow expression of the polynucleotide and collecting the gene products produced.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Another object of the present invention is a pharmaceutical composition comprising one or more of the silenced anti-CD28 antibodies, preferably admixed with one or more pharmaceutically acceptable ingredients.

The silenced anti-CD28 antibodies are useful for inducing T-cell tolerance, immunosuppression and as a prophylactic/therapeutic drug for organ or tissue transplant rejection. Accordingly, the present invention provides methods for inducing T-cell tolerance, immunosuppression, and providing a prophylaxis or treatment therapy during an organ or tissue transplant rejection by administering one or more of the silenced anti-CD28 antibodies to a mammal. Preferably, such silenced anti-CD28 antibodies are administered in as a pharmaceutical composition as described herein and may include additional drug/pharmaceuticals where appropriate.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Figure 1. Plasmid constructs for ChTN228 antibody expression. VL and VH of murine TN228 were constructed as mini-exons flanked by XbaI sites. The VL sequence was incorporated into the expression vector pVκ and the VH sequence was incorporated into the expression vector pVg2M3.

Figure 2. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the light chain of ChTN228 in the mini-exons. The signal peptide sequences are in italics. The CDRs are underlined. The mature light chain begins with an aspartic acid residue (bold letter). Untranslated and intron sequences are in lower case. (SEQ ID NOS: 1 and 2).

Figure 3. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the heavy chain variable regions of ChTN228 in the mini-exons. The signal peptide sequences are in italics. The CDRs are underlined. The mature heavy chain begins with a glutamine residue (bold letter). Untranslated and intron sequences are in lower case. (SEQ ID NOS: 3 and 4).

Figure 4. Competition experiment. P815/CD28⁺ cells were incubated with 25 ng of MuTN228-FITC and two-fold serial dilutions of either ChTN228 or MuTN228 as described. P815/CD28⁺ cells were also incubated with MuTN228-FITC alone, without any competitor. The mean channel fluorescence for each sample was plotted against the concentration of competitor.

Figure 5. Inhibition effect of TN228-IgG2m3 on human primary MLR(1). Percentage inhibition of primary MLR from four individuals were shown separately.

Figure 6. Inhibition effect of TN228-IgG2m3 on human primary MLR(2). Percentage inhibition of primary MLR from four individuals were shown separately.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Figure 7. The effect of TN228-IgG2m3 on secondary MLR.

The data from two volunteers were shown separately.

[³H]-thymidine uptake in 2nd MLR were presented as percentage of dpm of Raji stimulation alone in 1st MLR as 100. TN228-IgG2m3:0.1ng/ml

5 **Figure 8.** Plasmid constructs for HuTN228 antibody expression. VL and VH of humanized TN228 were constructed as mini-exons flanked by XbaI sites. The VL sequence was incorporated into the expression vector pV_L and the VH sequence was incorporated into the expression vector pV_H2M3

Figure 9. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the heavy chain variable regions of HuTN228 in the mini-exons. The signal peptide sequences are in italics. The CDRs are underlined. The mature heavy chain begins with a glutamine residue (bold letter). (SEQ ID NOS: 5 and 6)

Figure 10. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the light chain variable regions of HuTN228 in the mini-exons. The signal peptide sequences are in italics. The CDRs are underlined. The mature light chain begins with an aspartic acid residue (bold letter). (SEQ ID NOS:7 and 8)

15 **Figure 11.** FACS competition assay. The binding of FITC-labeled MuTN228 to P815/CD28⁺ cells in the presence of various amounts of competitor MuTN228 or HuTN228 antibody was analyzed in a flow cytometry competition experiment as described in the examples.

Figure 12. ELISA competition assay. The binding of biotinylated MuTN228 to sCD28-Fc in the presence of various amounts of competitor MuTN228 or HuTN228 antibody was analyzed in an ELISA competition experiment as described in the examples.

20 **Figure 13.** I-125 competition assay. The binding of ¹²⁵I labeled MuTN228 to P815/CD28⁺ cells in the presence of various amounts of competitor MuTN228 or HuTN228 antibody was analyzed in an ¹²⁵I labeled antibody competition experiment as described in the examples.

Figure 14. Plasmid constructs for PV1-IgG3 antibody expression. V_L and V_H of PV1 were constructed as mini-exons flanked by XbaI sites. The V_L sequence was incorporated into the expression vector pMVk.rg.dE, and the V_H sequence into the expression vector pMVg3.D.Tt. The two plasmids were then recombined to generate a single plasmid co-expressing the heavy and light chains of PV1-IgG3.

25 **Figure 15A.** Sequences of cDNA and deduced amino acid sequences of the light chain and heavy chain in the mini-exons. The CDRs are underlined. The mature light chain begins with an aspartic acid residue (double underlined) at position 20. (SEQ ID NOS:9 and 10).

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Figure 15B. Sequences of cDNA and deduced amino acid sequences of variable regions of PV1 in the mini-exons. The CDRs are underlined. The mature heavy chain with glutamine (double underlined) at position 20. (SEQ ID NOS:11 and 12).

5 **Figure 16.** Analysis of PV-1-IgG3 by size exclusion chromatography using HPLC as described in *Methods*. The protein was monitored by its absorbance at 280 nM.

Figure 17. SDS-PAGE analysis of mouse IgG3 isotype control (lane 1), PV1 (lane 2), and PV1-IgG3 (lane 3). Proteins in Panel A were run under nonreducing conditions, and in Panel B reducing conditions. MW represents molecular weight markers. The numbers are MW standards in kD.

10 **Figure 18.** EL4 cells stained with PV1 (A), 37.51 (B), or PV1-IgG3 (C), and analyzed by flow cytometry. Secondary antibodies used were: FITC-conjugated donkey anti-Armenian hamster IgG (H+L) for PV1, FITC-conjugated donkey anti-Syrian hamster IgG for 37.51, and FITC-conjugated goat anti-mouse kappa for PV1-IgG3. The solid line profiles represent cells stained with secondary antibodies only. The broken line profiles represent cells stained with both primary and secondary antibodies as described in *Methods*. Mouse IgG3 isotype control did not stain EL4 cells (data not shown).

15 **Figure 19.** (A). Excess PV1, or PV1-IgG3 competes with R-PE-conjugated PV1 for binding to EL4 cells. Thin solid line (black) in flow cytometry histogram represents cells without any staining, thick solid line (dark blue) cells stained with R-PE-PV1 alone, thin broken line (magenta) cells stained with R-PE-PV1 and excess unconjugated PV1, and thin double broken line (light blue) cells stained with R-PE-PV1 and excess unconjugated PV1-IgG3. Excess mouse IgG3 isotype control had no effect on R-PE-PV1's binding to EL4 cells (data not shown). (B). Excess 145.2C11, or 145.2C11-IgG3 compete with R-PE-conjugated 145.2C11 for binding to EL4. Thin solid line (black) represents cells without any staining, thick solid line (dark blue) cells stained with R-PE-145.2C11 alone, thin broken line (magenta) cells stained with R-PE-145.2C11 and excess unconjugated 145.2C11, and thin double broken line (light blue) cells stained with R-PE-145.2C11 and excess unconjugated 145.2C11-IgG3. (C). Excess PV1 competes with PV1-IgG3 for binding to EL4 cells. EL4 cells were stained with PV1-IgG3 with or without excess PV1. Cells were washed and stained with mouse IgG3-specific, FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L). Thin solid line (black) represents cells stained with secondary antibodies only, thick solid line (dark blue) cells stained with PV1-IgG3 and secondary antibodies, and thin broken line (magenta) cells stained with PV1-IgG3 and excess PV1, and secondary antibodies.

20 **Figure 20.** Mouse splenic cells stained with PV1-IgG3 and 145.2C11. Cells were stained with mouse IgG3 isotype control (A) or PV1-IgG3 (B), counter-stained with R-PE-conjugated goat anti-mouse IgG3 and

WO 02/47721

PCT/US01/47955

with FITC-conjugated 145.2C11, and analyzed by two-color flow cytometry as described in *Materials and Methods*. Only cells in the lymphocyte gate were analyzed. PV1-IgG3-positive cells are in the upper quadrants and CD3-positive cells are in the right side quadrants. The number in each quadrant represents percentage of the cells in that particular quadrant.

5

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In the context of this invention, the term "silenced anti-CD28 antibody" means any anti-CD28 antibody defective of mitogenic activity. More specifically, it is an antibody which binds specifically to the antigen CD28 receptor on the surface of the T cell and does not promote the growth or activation of T cells by combined stimulation with an anti-CD3 antibody.

10

A silenced anti-CD28 antibody can be constructed on the basis of an anti-CD28 antibody or an anti-CD28 antibody-producing hybridoma by mutating or modifying an agonistic anti-CD28 antibody by a genetic engineering technique or by chemical modification. Taking the use of genetic engineering technology as an example, the binding affinity of the anti-CD28 antibody for the Fc receptors can be reduced or eliminated by introducing a mutation into the amino acid sequence of the Fc domain of the antibody. For example, a silenced anti-CD28 antibody can be obtained by isolating cDNA from hybridoma cells capable of producing an anti-CD28 monoclonal antibody and introducing a mutation(s) into the region of the sequence corresponding to the Fc domain which plays an important role in the binding to the Fc receptor (WO 88/07089). The site of mutation is not particularly restricted inasmuch as the binding to the Fc receptors may be inhibited. Thus, in the case of a Class IgG antibody, for instance, the H-chain amino acid residues 234, 235, 236, 237, 318, 320 and 322 are preferred and a silenced anti-CD28 antibody can be constructed by replacing at least one of these amino acids with a different amino acid.

15

20

The source of such a silenced anti-CD28 antibody can be judiciously selected according to the target animal in which the antibody is used. For example, nonhuman monoclonal antibodies contain amino acid sequences showing antigenicity in humans over a fairly broad range. Many studies have shown that the immune response of a patient to a foreign antibody following injection of the antibody is remarkably intense and the very administration of the antibody may bring the patient into a perilous condition or deprive the antibody of the therapeutic utility. Therefore, it is recommendable to replace the Fc region so as to make the antibody relatively more homologous to the therapeutic target animal, replace the framework portions of the variable regions, or use the antibody obtained from a transgenic animal into which the antibody gene of the target animal has been

25

30

WO 02/47721

PCT/US01/47955

introduced. For example, when the antibody is to be administered to a human, a chimeric antibody (EP125023) available on replacement of the Fc region, a humanized antibody with the framework portion replaced (EP0239400, EP045126) or a human antibody (EP546073, WO 97/07671) obtained from a transgenic animal into which the human antibody gene has been introduced. By introducing mutations in these antibodies by genetic engineering techniques such as those described above or by chemical modification, the mitogenic activity of the antibodies can be reduced or eliminated.

As specific examples of the anti-CD28 antibody having a silenced Fc region, there can be mentioned not only the antibodies described hereinafter in the Examples section but also the antibodies synthetically prepared using the constant region gene of the therapeutic target animal and the variable region polynucleotides based on the amino acid sequences of variable regions shown in SEQ ID NO:2 and NO:4 or SEQ ID NO:6 and NO:8. Examples of such polynucleotides are SEQ ID NOS:1, 3, 5, and 7.

More specific examples of this invention are HuTN228 and MuTN228 and Fab fragments thereof F(ab)'2 fragments thereof, derivatives thereof and etc..

As appreciated by those skilled in the art, because of third base degeneracy, almost every amino acid can be represented by more than one triplet codon in a coding nucleotide sequence. Further, minor base pair changes may result in variation (conservative substitution) in the amino acid sequence encoded, are not expected to substantially alter the biological activity of the gene product. Thus, a nucleic acid sequencing encoding a protein or peptide as disclosed herein, may be modified slightly in sequence (e.g., substitution of a nucleotide in a triplet codon), and yet still encode its respective gene product of the same amino acid sequence.

The term "expression vector" refers to a polynucleotide which encodes the peptide of the invention and provides the sequences necessary for its expression in the selected host cell. Expression vectors will generally include a transcriptional promoter and terminator, or will provide for incorporation adjacent to an endogenous promoter. Expression vectors will usually be plasmids, further comprising an origin of replication and one or more selectable markers. However, expression vectors may alternatively be viral recombinants designed to infect the host, or integrating vectors designed to integrate at a preferred site within the host's genome. Examples of expression vectors are disclosed in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Sambrook, Fritsch, and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Suitable host cells for expression of the silenced anti-CD28 antibody include prokaryotes, yeast, archae, and other eukaryotic cells. Appropriate cloning and expression vectors for use with bacterial, fungal, yeast, and mammalian cellular hosts are well known in the art, e.g., Pouwels *et al.* Cloning Vectors: A

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985). Preferably, the cells are mammalian cells. The vector may be a plasmid vector, a single or double-stranded phage vector, or a single or double-stranded RNA or DNA viral vector. Such vectors may be introduced into cells as polynucleotides, preferably DNA, by well known techniques for introducing DNA and RNA into cells. The vectors, in the case of phage and viral vectors also may be and preferably are introduced into cells as packaged or encapsulated virus by well known techniques for infection and transduction. Viral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case viral propagation generally will occur only in complementing host cells. Cell-free translation systems could also be employed to produce the proteins using RNAs derived from the present DNA constructs.

The silenced anti-CD28 antibodies/proteins can be purified by isolation/purification methods for proteins generally known in the field of protein chemistry. More particularly, there can be mentioned, for example, extraction, recrystallization, salting out with ammonium sulfate, sodium sulfate, etc., centrifugation, dialysis, ultrafiltration, adsorption chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, normal phase chromatography, reversed-phase chromatography, gel filtration method, gel permeation chromatography, affinity chromatography, electrophoresis, countercurrent distribution, etc. and combinations of these.

According to the present invention, purified antibodies may be produced by the recombinant expression systems described above. The method comprises culturing a host cell transformed with an expression vector comprising a DNA sequence that encodes the protein under conditions sufficient to promote expression of the protein. The protein is then recovered from culture medium or cell extracts, depending upon the expression system employed. As is known to the skilled artisan, procedures for purifying a recombinant protein will vary according to such factors as the type of host cells employed and whether or not the recombinant protein is secreted into the culture medium.

The silenced anti-CD28 antibody when formulated into a pharmaceutical composition can be used in (a) transplant rejections following the transplantation of organs or tissues, such as heart, kidney, liver, bone marrow, skin, cornea, lung, pancreas, small intestine, muscle, nerve, etc.; (b) graft-versus-host reactions in the transplantation of bone marrow; (c) autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, myasthenia gravis, type I diabetes, etc.; and (d) immune diseases such as asthma, atopic dermatitis, etc.

While the silenced anti-CD28 antibody by itself can be expected to suppress immune reactions and transplant rejections and induce immunotolerance, it can also be used in combination with other drugs. Among

WO 02/47721

PCT/US01/47955

such other drugs which are useful for combining with the silenced anti-CD28 antibody are various immunosuppressants such as rapamycin, deoxyspergaulin, anti-CD40 antibody, anti-CD40L antibody, prograf, cyclosporin A, anti-IL-2 antibody, anti-IL-2 receptor antibody, anti-IL-12 antibody, anti-IL12 receptor antibody and MMF. Rapamycin, in particular, inhibits transduction of the signal related to growth of T cells among signals from the IL2 receptor but does not inhibit transduction of the apoptosis-related signal, so that its use in combination with a specific inhibitor of the CD28 signal is expected to be useful.

The silenced anti-CD28 antibody of this invention can be administered orally or parenterally, preferably by the intravenous, intramuscular or subcutaneous route.

The silenced anti-CD28 antibody of this invention can be prepared in the form of a solution or a lyophilized powder and, where necessary, may be formulated with various pharmaceutically acceptable additives such as an excipient, diluent, stabilizer, isotonicizing agent and buffer. The preferred additives include a sugar such as maltose, a surfactant such as polysorbate, an amino acid such as glycine, a protein such as human serum albumin, and a salt such as sodium chloride.

Also, the dosage form such as injectable preparations (solutions, suspensions, emulsions, solids to be dissolved when used, etc.), tablets, capsules, granules, powders, liquids, liposome inclusions, ointments, gels, external powders, sprays, inhalating powders, eye drops, eye ointments, suppositories, pessaries, and the like can be selected appropriately depending on the administration method, and the peptide of the present invention can be accordingly formulated. Formulation in general is described in Chapter 25.2 of Comprehensive Medicinal Chemistry, Volume 5, Editor Hansch et al, Pergamon Press 1990.

The dosage of the pharmaceutical composition of this invention is dependent on the specific composition, the type of disease as the target of therapy or prophylaxis, the method of administration, the patient's age and condition and the duration of treatment, among other variables. However, in the case of intravenous, intramuscular or subcutaneous administration, 0.01-100 mg/kg, preferably 0.1-10 mg/kg, per day per adult can be administered.

When the silenced anti-CD28 antibody of this invention is used for suppression of transplant rejection or induction of immunotolerance in an organ or tissue transplantation, the composition can be administered in a dose of about 1 mg/kg/day immediately before transplantation, immediately after transplantation, and 3, 7, 12, 18, 25, 35, 45 and 60 days after transplantation, by intravenous, intramuscular or subcutaneous injection. The administration frequency and dosage may be judiciously increased or decreased while the course of rejection reaction after transplantation is monitored.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

While the administration interval depends on the method of administration used and the patient's condition, among other factors, not only continuous administration but also intermittent administration is feasible. Thus, since the silenced anti-CD28 antibody of this invention is an antibody, it provides a sustained effect so that intermittent dosing may be rewarded with the expected efficacy. As to the period of treatment, once a tolerant state is established, this tolerance can be maintained even if the use of the silenced anti-CD28 antibody is discontinued. In this respect, this silenced anti-CD28 antibody is undoubtedly superior to other immunosuppressants the immunosuppressive effect of which declines after discontinuation.

EXAMPLES

Having generally described this invention, a further understanding can be obtained by reference to certain specific examples which are provided herein for purposes of illustration only, and are not intended to be limiting unless otherwise specified. The examples below are carried out using standard techniques, that are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail.

Example 1. Amino acid sequencing of the mouse anti-human CD28 antibody

The hybridoma producing anti-human CD28 antibody (clone:TN228, mouse IgG1 kappa) was generously provided by Dr. Yagita (Juntendo University School of Medicine, Japan). Approximately 0.2 mg of purified anti-human CD28 antibody (TN228) was reduced in 0.64 M guanidine-HCl, 0.28 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.055 M DTT for 90' at 60 C (under argon), carboxymethylated by addition of iodoacetic acid to 0.13 M for 45' at room temperature (in the dark), followed by addition of DTr to 0.32 M (to terminate the carboxymethylation reaction), and immediately buffer-exchanged in 0.1 M sodium phosphate, 0.002 M EDTA, pH 8.0 using a PD-10 column (catalog #17-0851-01, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The eluate was adjusted to 0.005 M DTT, 0.02 % glycerol, and one third of the solution (about 0.35 ml) was transferred to a separate tube for N-terminal deblocking of the heavy chain. The sample was digested with 1800 µU of pyroglutamate aminopeptidase (catalog # 7334, Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan) for 24 hours at 45 C. The N-terminal sequences of the light and heavy chains from the deblocked sample were determined by 20 cycles of automated Edman degradation and PTH analysis on a Model 241 Protein Sequencer (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). The PTH derivatives were analyzed on a Hypersil ODS C18 column. The sequencer and HPLC were operated according to the manufacturer's instructions using reagents, solvents, and columns obtained from Hewlett Packard.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

N-terminal sequencing results for TN228 deblocked with pyroglutamate aminopeptidase were as follows:

residue no.	amino acid	residueno	amino acid	residueno	amino acid	residue no.	amino acid
1	D, Q	6	Q, E	11	L	16	G, Q
2	I, v	7	s	12	A, V	17	Q, S
3	V, Q	8	P, G	13	V, A	18	R, L
4	L	9	A, P	14	S, P	19	A, S
5	T, K	10	S, G	15	L, S	20	T, I

5 Example 2. Cloning of variable region cDNAs

The V region cDNAs for the light and heavy chains of TN228 were cloned from the hybridoma cells by an anchored polymerase chain reaction (PCR) method described by Co et al. (Co, M.S., N.M. Avadalo, P.C. Caron, M.V. Avadalo, D.A. Scheinberg, and C. Queen. 1992. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen. *J. Immunol.* 148: 1149-1154.). Amplification was performed on cDNA using 3' primers that anneal respectively to the mouse kappa and gamma chain C regions, and a 5' primer that anneals to the added G-tail of the cDNA. For VL PCR, the 3' primer has the sequence (SEQ ID NO:13):

5' TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC 3'

15 with residues 17-46 hybridizing to the mouse C_γ region. For VH PCR, the 3' primers have the degenerate sequences (SEQ ID NOS:14, 15 and 16):

5' TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTGGC 3'

A G T
 T

20 with residues 17-50 hybridizing to mouse IgG C_{H1}. The non-hybridizing sequences in the two primer sets contain restriction sites used for cloning. The VL and VH cDNAs were subcloned into a TOPOII Bunt vector (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) for sequence determination.

Several light and heavy chain clones were sequenced from two independent PCR reactions. For the 25 light chain, two unique sequences homologous to mouse light chain variable regions were identified. One VL

WO 02/47721

PCT/US01/47955

sequence was non-functional due to a frame shift mutation and was identified as the non-productive allele. The other VL sequence was typical of a functional mouse kappa chain variable region. For the heavy chain, a unique sequence homologous to a typical mouse heavy chain variable region was identified. Their nucleotide sequences and their deduced amino acid sequences of variable region are described in Fig. 2 and Fig. 3.

5

Example 3. Construction and expression of chimeric TN228-IgG2M3

(Methods)

TN228 V_L and V_H were converted by PCR into mini-exon segments flanked by XbaI sites as described by He et al. (He, X.Y., Z. Xu, J. Melrose, A. Mallowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M.S. Co, and E.L. Berg. 1998. Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin. *J. Immunol.* 160: 1029-1035) and were subcloned into the light chain and heavy chain expression plasmids (Fig. 1). Each mini-exon contains a signal peptide sequence, a mature variable region sequence and a splicing donor sequence derived from the most homologous mouse J chain gene. Such splicing donor sequences are used to splice the V region exon to the human antibody constant region. Each mini-exon was sequenced after it had been cloned into the expression vector to ensure the correct sequence was obtained and that no PCR errors were generated. The constant region exons of the light and heavy chain expression plasmids were also confirmed by sequencing.

In this specification, ChTN228 refers to a chimeric antibody containing the mouse TN228 VL and VH variable regions, a human IgG2M3 constant region for the heavy chain, and a human kappa constant region for the light chain. The heavy chain constant region was modified (Cole, M.S., C. Anasetti, and J.Y. Tso. 1997. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. *J. Immunol.* 159: 3613-3621) from the germline human κ 2 genomic fragment, and the light chain was derived from the germline human K genomic fragment. Both the heavy and light chain genes are driven by the human cytomegalovirus major immediate early promoter and enhancer. The heavy chain gene is followed by the transcription terminator derived from the human complement gene C2 (Ashfield, R., P. Enriquez-Harris, and N.J. Proudfoot. 1991. Transcriptional termination between the closely linked human complement genes C2 and factor B: common termination factor for C2 and c-myc? *EMBO J.* 10: 4197-4207). The light chain selection marker gpt gene (Mulligan, R.C., and P. Berg. 1981. Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072-2076) and the heavy chain selection marker *dhfr* gene (Simonsen, C.C., and A.D. Levinson. 1983. Isolation and expression of an altered mouse

30

WO 02/47721

PCT/US01/47955

dihydrofolate reductase cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495-2499) are both driven by the SV40 early promoter. For expression of chimeric TN228, transient transfection into COS-7 cells (monkey kidney cell line) was done using lipofectamine (catalog # 10964-013, GIBCO BRL). Spent media from transient transfectants were analyzed for human IgG2M3 antibody production by ELISA, using goat anti-human IgG gamma chain specific antibody as capturing reagent and HRP-conjugated goat anti-human kappa chain antibody as developing reagent. The spent media was also tested for the ability of ChTN228 to bind to P815/CD28⁺ cells (stably transfected cell with CD28 into P815 (mouse mastocytoma)) by indirect immunofluorescent staining and analyzed by flow cytometry. For stable cell line production, the chimeric expression plasmids were transfected into murine myeloma cell line Sp2/0 by electroporation and the transfectants were selected for *gpt* expression.

10 The spent media from stable transfectants were analyzed by ELISA as for the transient transfection.

Results

The cloned V_L and V_H genes were converted into mini-exons by PCR (Fig. 2 and 3) and subcloned into the light and heavy chain expression vectors as described above and shown in Fig. 1.

15 Transient transfection of COS-7 cells: The chimeric expression vectors were transiently transfected into monkey kidney cell line COS-7 to produce the chimeric TN228⁺ antibody. Spent medium from the transfected cells was tested by ELISA for the production of chimeric IgG2M3 antibodies and by flow cytometry for binding to P815/CD28⁺ cells. Spent medium was positive in both assays. The yield of chimeric antibody from transient transfection was ~0.9 µg/ml. The ChTN228 antibody from transient supernatant bound to P815/CD28⁺ cells in a concentration dependent manner (data not shown).

20 Stable transfection of Sp2/0 cells: The chimeric expression vectors were transfected into Sp2/0 cells for the production of a stable cell line. Spent media from several transfectants were tested for the production of chimeric TN228 antibody and for binding to P815/CD28⁺ cells as with the transient transfectants. Most transfectants were positive for both assays. One transfectant was chosen for its higher antibody productivity and expanded to grow in 5 L of serum free medium. ChTN228 was purified from 5 L of spent medium by affinity chromatography. The yield of purified antibody was ~25 mg.

Example 4 Protein purification of chimeric antibody ChTN228

30 One of the high ChTN228 expressing transfectants from the stable transfection (Clone 7H) was grown in 5 L of GIBCO hybridoma serum-free medium (catalog # 12045-076, GIBCO BRL). Spent culture

WO 02/47721

PCT/US01/47955

supernatant was harvested when cell viability reached 10 % or below, concentrated to 500 ml, and loaded onto a 5 ml protein-A Sepharose column using a Pharmacia P1 pump (2-3 ml/min). The column was washed with PBS before the antibody was eluted with 0.1 M Glycine, 0.1 M NaCl, pH 2.7. The eluted protein was dialyzed against 3 changes of 2 L PBS and then desalted onto a PD-10 column equilibrated with PBS containing an additional 0.1 M NaCl. The desalted protein solution was filtered through a 0.2 µm filter prior to storage at 4 C.

Example 5 Purity determination by size exclusion HPLC and SDS-PAGE

Size exclusion HPLC was performed using a Perkin Elmer HPLC system consisting of a PE ISS 200 Advanced LC Sample Processor, a PE Series 410 Bio LC Pump, a PE 235C Diode Array Detector, and a PE Nelson 600 Series LINK. Perkin Elmer Turbochrom Navigator Version 4.1 software was used to control the autosampler, pump, and detector, and to acquire, store, and process the data. Separation was achieved using two TosohHaas TSK-GEL G3000SWXL size exclusion HPLC columns, 7.8 mm x 300 mm, 5 µm particle size, 250 Å pore size (catalog # 08541, TosohHaas, Montgomeryville, MD) connected in series. The mobile phase was 200 mM potassium phosphate/150 mM potassium chloride at pH 6.9, and the flow rate was 1.00 mL/minute. The column eluate was monitored spectrophotometrically at both 220 nm and 280 nm. The injection volume was 50 µL (50 µg) of the ChTN228 sample.

SDS-PAGE was performed according to standard procedures on a 4-20% gradient gel (catalog # EC6025, Novex, San Diego, CA).

The purity of the isolated ChTN228 was analyzed by size exclusion HPLC and SDS-PAGE. Based on this analysis, the protein is 96.5 % monomer and has the mobility corresponding to a protein of molecular weight ~160 kD. SDS-PAGE analysis of MuTN228, isotype control MuFd79 (mouse IgG1), ChTN228, and isotype control HuEP5C7 (human IgG2M3) under nonreducing conditions also indicated that all four antibodies have a molecular weight of about 150-160 kD. Analysis of the same four proteins under reducing conditions indicated all four antibodies were comprised of a heavy chain with a molecular weight of about 50 kD and a light chain with a molecular weight of about 25 kD.

Example 6 Competition experiment

Methods

A titration experiment was done using serial two-fold dilutions of MuTN228-FITC antibody beginning at 250 ng/est. P815/CD28⁺ cells (5x10⁵ cells/test) were incubated with FITC-labeled antibody for 1 hour on ice,

WO 02/47721

PCT/US01/47955

washed with PBS and analyzed by flow cytometry. For the competition experiments, 25 ng of MuTN228-FITC and serial two-fold dilutions of competing ChTN228 or MuTN228 antibodies beginning at 800 ng/test were added to P815/CD28⁺ cells (5x 10⁵ cells/test). As a control, P815/CD28⁺ cells (5x10⁵ cells/test) were incubated with 25 ng of MuTN228-FITC alone (i.e. without any competitor). HuEP5C7 and MuFd79 isotype control antibodies (800ng/test) were also tested as competitors. Cells were incubated with the antibody mixture in a final volume of 150 µl for one hour on ice (in the dark), then washed and analyzed by flow cytometry.

Results

The binding specificity of the MuTN228 and ChTN228 antibodies was compared in a flow cytometry competition experiment as described in the Methods. Various amounts of unlabeled MuTN228 or ChTN228 were mixed with 25 ng of FITC-labeled MuTN228 antibody and incubated with P815/CD28⁺ cells. Both MuTN228 and ChTN228 competed with MuTN228-FITC in a concentration dependent manner, indicating that binding of both antibodies is specific for the CD28 antigen (Fig. 4). The isotype control antibodies MuFd79 and HuEP5C7 did not compete with MuTN228-FITC, indicating that the MuTN228 and ChTN228 antibodies recognize the CD28 antigen through V-region specific interactions.

Example 7 Chimeric anti-human CD28 antibody which has reduced affinity to human F. R. inhibits primary mixed lymphocyte reaction.

Cell preparation

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared from normal healthy volunteers by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque plus (Amersham Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan). Human blood were diluted with equal volume of RPMI1640 and overlaid on Ficoll-Paque plus. After centrifugation for 30 min. at room temperature, PBMCs were collected and washed with RPMI1640. Thereafter, PBMCs were suspended with the medium(RPMI1640 containing 2.5% human type AB serum, 2-mercaptoethanol, and antibiotics) and applied to a nylon fiber column(Wako junyaku, Osaka, Japan). After 1 hr incubation at 37 C in 5 % CO₂, T cells were eluted with warm medium.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Human B cell lines (Raji and JY) were used as stimulator cells in the mixed lymphocyte reaction. These cells were X-ray irradiated (2000R) before use.

Primary mixed lymphocyte reaction (1st MLR)

5 Purified human T cells (1×10^5 cells/well) and irradiated Raji (1×10^5 cells/well) were plated in 96well flat bottom micro plate. Antibodies were added to the culture medium and cells were incubated for 7 days. All cultures were labeled for final 6 hours with 10 kBq/well [3 H]thymidine (Amersham Pharmacia biotech). Cells were harvested and incorporated radioactivity was measured by liquid scintillation counter.

10 The effect of TN228-IgG2m3 (ChTN228) on primary MLR was shown on Fig.5 and 6. The original anti-human CD28 antibody TN228 (MuTN228) did not inhibit primary MLR, however, chimeric antibody TN228-IgG2m3 inhibited in a dose dependent manner. Therefore, conversion of Fc region of anti-human CD28 antibody to one with reduced affinity to human Fc R makes the antibody antagonistic to T cell proliferation.

Chimeric anti-human CD28 antibody which has reduced affinity to human Fc R reduced T cell low responsiveness in secondary mixed lymphocyte reaction.

15

Secondary mixed lymphocyte reaction (2nd MLR)

16 Purified human T cells (1×10^5 cells/well) and irradiated Raji cells (1×10^5 cells/well) were plated in 96-well flat bottom micro plates. Antibodies were added to the culture medium and cells were incubated. After 5 days, cells were collected, washed with fresh medium. Cells were, suspended with fresh medium and cultured for 8 days. Cells were restimulated with irradiated Raji or JY cells. After additional 7 days culture, cells were incubated with 10 kBq/well [3 H]thymidine for 6 hours. Cells were harvested and radioactivity was measured by liquid scintillation counter.

17 TN228-IgG2m3 inhibited primary MLR (Fig. 5 and 6). Next, we analyzed the effect of this antibody on secondary MLR. The antibody was applied to primary MLR culture, then antibody was removed from culture supernatant. After culturing in the medium without antibodies, cells were re-stimulated with the same stimulator cells(Raji) or third party stimulator(JY). The proliferation of cells treated with TN228-IgG2m3 through primary MLR was reduced compared to that of none-treated cells. However, both cells proliferated to almost the same extent with third party stimulator (JY) (Fig. 7). This result indicates that anti-human CD28 antibody with reduced affinity to human Fc R may induce T-cell energy through alo-antigen stimulation.

18 Example 8. Design of humanized TN228 variable regions

WO 02/47721

PCT/US01/47955

The V-region sequences of MuTN228 were analyzed by computer modeling. Based on a sequence homology search against the Kabat antibody sequence database (S. Johnson, G., and T.T. Wu. 2000. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res.* 28: 214-218), IC4 (Manheimer-Lory, A., J.B. Katz, M. Pillinger, C. Ghossein, A. Smith, B. Diamond. 1991. Molecular characteristics of antibodies bearing an anti-DNA-associated idiotype. *J. Exp. Med.* 174: 1639-1652) was selected to provide the framework for both the humanized TN228 heavy chain and light chain variable regions. The humanized TN228 heavy chain variable domain has 65 residues out of 85 framework residues that are identical to those of the mouse TN228 heavy chain framework, or 76% sequence identity. The humanized TN228 light chain variable domain has 56 residues out of 80 framework residues that are identical to those of the mouse TN228 light chain framework, or 70% sequence identity.

The computer programs ABMOD and ENCAD (Levitt, M. 1983. Molecular dynamics of native protein. I. Computer simulations of trajectories. *J. Mol. Biol.* 168: 595-620) were used to construct a molecular model of the TN228 variable domain, which was used to locate the amino acids in the mouse TN228 framework that are close enough to the CDRs to potentially interact with them. To design the humanized TN228 heavy and light chain variable regions, the CDRs from the mouse TN228 heavy chain were grafted into the framework regions of the human IC4 heavy chain and the CDRs from the mouse TN228 light chain were grafted into the framework regions of the human IC4 light chain. At framework positions where the computer model suggested significant contact with the CDRs, the amino acids from the mouse antibody were substituted for the original human framework amino acids. For humanized TN228, this was done at residues 27, 29, 30, 48, 67, 71 and 78 of the heavy chain. For the light chain, no substitutions were made (i.e., a straight grafting of the MuTN228 CDRs into the IC4 framework region was done). Furthermore, framework residues that occurred only rarely at their positions in the database of human antibodies were replaced by human consensus amino acids at those positions. For humanized TN228 this was done at residues 23, 40, 73, 83 and 85 of the heavy chain and at residues 69 and 77 of the light chain. The amino acid sequences of the humanized TN228 antibody heavy and light chain variable regions are shown Figure 9 and 10.

Example 9. Construction and expression of humanized TN228-IgG2M1

Methods

Once the humanized variable region amino acid sequences had been designed as described above, genes were constructed to encode them, including signal peptides, splice donor signals and appropriate

WO 02/47721

PCT/US01/47955

restriction enzyme sites (Figure 8). The heavy and light chain variable region genes were constructed and amplified using eight overlapping synthetic oligonucleotides ranging in length from approximately 65 to 80 bases (He, X.Y, Z. Xu, J. Melrose, A. Muldowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M.S. Co, and B.L. Berg. 1998. Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin. *J. Immunol.* 160: 1029-1035). The oligonucleotides were annealed pairwise and extended with the Klenow fragment of DNA polymerase I, yielding four double-stranded fragments. The resulting fragments were denatured, annealed pairwise, and extended with Klenow, yielding two fragments. These fragments were denatured, annealed pairwise, and extended once again, yielding a full-length gene. The resulting product was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using Taq polymerase, gel-purified, digested with XbaI, gel-purified again, and subcloned into the XbaI site of pVg2M3 for the expression of heavy chain, and pVk for the expression of light chain. The pVg2M3 vector for human gamma 2 heavy chain expression (Cole, M.S., C. Anasetti, and J.Y. Tso. 1997. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. *J. Immunol.* 159: 3613-3621), and the pVk vector for human kappa light chain expression (CO, M.S., N.M. AvadaloVIC, P.C. Caron, M.V. AvadaloVIC, D.A. Scheinberg, and C. Queen. 1992. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen. *J. Immunol.* 148:1149-1154) have been previously described.

The sequences of the V-regions and constant region exons of the heavy and light chain final plasmids were verified by nucleotide sequencing. The gross structures of the final plasmids were verified by restriction mapping. All DNA manipulations were performed by standard methods.

In this specification, HuTN228 refers to a humanized antibody containing the humanized TN228 V_H and V_L variable regions, a human IgG2M3 constant region for the heavy chain, and a human kappa constant region for the light chain. The heavy chain constant region was modified (Cole, M.S., C. Anasetti, and J.Y. Tso. 1997. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. *J. Immunol.* 159: 3613-3621) from the germline human 2 genomic fragment, and the light chain was derived from the germline human K genomic fragment. The human cytomegalovirus major immediate early promoter and enhancer drive both the heavy and light chain genes. The heavy chain gene is followed by the transcription terminator derived from the human complement gene C2 (Ashfield, R., P. Enriquez-Harris, and N.J. Proudfoot. 1991. Transcriptional termination between the closely linked human complement genes C2 and factor B: common termination factor for C2 and c-myc? *EMBO J.* 10: 4197-4207). The light chain selection marker *gpt* gene (Mulligan, R.C., and P. Berg. 1981. Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072-2076) and the heavy chain selection marker

WO 02/47721

PCT/US01/47955

dhhfr gene (Simonsen, C.C., and A.D. Levinson, 1983. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495-2499) are both driven by the SV40 early promoter.

5 For expression of HuTN228, transient transfection into COS-7 cells (monkey kidney cell line) was done using Lipofectamine 2000 (catalog # 11668-027, Life Technologies). Spent media from transient transfectants were analyzed for human IgG2M3 antibody production by ELISA, using goat anti-human IgG gamma chain specific antibody as capturing reagent and HRP-conjugated goat anti-human kappa chain antibody as developing reagent. The spent media were also tested for the ability of HuTN228 to bind to P815/CD28⁺ cells by indirect immunofluorescent staining and analyzed by flow cytometry (data not shown). For stable cell 10 line production, the humanized expression plasmids were transfected into murine myeloma cell line Sp2/0 by electroporation and the transfectants were selected for gpt expression. The spent media from stable transfectants were analyzed by ELISA as for the transient transfection.

Results

15 Based on the humanized V-region amino acid sequence design, heavy and light chain V-genes (Figure 9 and 10) were constructed as described in the Methods. The heavy and light chain V-genes were cloned into the pVg2M3 and pVk vectors, respectively, as shown in Figure 8. Several clones were analyzed by nucleotide sequencing and correct clones of both the heavy chain and light chain expression vectors were used for the transfection. The constant regions of both the heavy and light chain expression vectors were also confirmed by 20 sequencing.

Example 10. Expression of HuTN228.

Transient transfection of COS-7 cells: The expression vectors were transiently transfected into monkey kidney cell line COS-7 to produce the HuTN228 antibody. Spent medium from the transfected cells was tested by ELISA for the production of humanized gG2M3 antibodies and by flow cytometry for binding to 25 P815/CD28⁺ cells (data not shown). Spent medium was positive in both assays. The yield of humanized antibody from transient transfection was ~3.7 g/ml. The HuTN228 antibody from transient supernatant bound to P815/CD28⁺ cells in a concentration dependent manner (data not shown).

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Stable transfection of Sp2/0 cells: The humanized expression vectors were transfected into Sp2/0 cells for the production of a stable cell line. Spent media from several transfectants were tested for the production of HuTN228 antibody as with the transient transfectants. One transfectant (clone 4) was chosen for its higher antibody productivity and expanded in GIBCO hybridoma serum free medium. HuTN228 antibody was purified from 570 ml of spent medium by affinity chromatography. The yield of purified antibody was ~7 mg.

Example 11. Protein purification.

One of the high HuTN228 expressing transfectants from the stable transfection (Clone 4) was grown in 570 ml of GIBCO hybridoma serum-free medium (catalog # 12045076, Life Technologies). Spent culture supernatant was harvested when cell viability reached 10% or below and loaded onto a 2 ml protein-A Sepharose column. The column was washed with PBS before the antibody was eluted with 0.1 M Glycine, 0.1 M NaCl, pH 2.5. The eluted protein was dialyzed against 3 changes of 2 L PBS and then desalted onto a PD-10 column equilibrated with PBS containing an additional 0.1 M NaCl. The desalted protein solution was filtered through a 0.2 µm filter prior to storage at 4°C.

Example 11. Purity determination by size exclusion HPLC and SDS-PAGE

Methods

Size exclusion HPLC was performed using a Perkin Elmer HPLC system consisting of a PE ISS 200 Advanced LC Sample Processor, a PE Series 410 Bio LC Pump, a PE 235C Diode Array Detector, and a PE Nelson 600 Series LINK. Perkin Elmer Turbochrom Navigator Version 4.1 software was used to control the autosampler, pump, and detector, and to acquire, store, and process the data. Separation was achieved using two TosohHaas TSK-GEL G3000SWXL size exclusion HPLC columns (7.8 mm x 300 mm, 5 µm particle size, 250 µm pore size; catalog # 08541, TosohHaas, Montgomeryville, MD) connected in series. The mobile phase was 200 mM potassium phosphate/150 mM potassium chloride at pH 6.9, and the flow rate was 1.00 mL/minute. The column eluate was monitored spectrophotometrically at both 220 nm and 280 nm. The injection volume was 60 µl (60 µg) of the HuTN228 sample.

SDS-PAGE was performed according to standard procedures on a 4-20% gradient gel (catalog # BC6025, Novex, San Diego, CA).

The isotype of the purified antibody was confirmed using the Human IgG Subclass Profile ELISA Kit (catalog # 99-1000, Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) following the manufacturer's recommendations. (Results)

WO 02/47721

PCT/US01/47955

The purity of the isolated HuTN228 antibody was analyzed by size exclusion HPLC and SDS-PAGE. The HPLC elution profile of HuTN228 is not shown. Based on this analysis, the protein is ~98% monomer and has the mobility corresponding to a protein of molecular weight ~160 kD.

5 SDS-PAGE analysis of MuTN228, isotype control MuFd79 (mouse IgG1), HuTN228, and isotype control HuEP5C7 (human IgG2M3) under nonreducing conditions also indicated that all four antibodies have a molecular weight of about 150-160 kD. Analysis of the same four proteins under reducing conditions indicated that all four antibodies were comprised of a heavy chain with a molecular weight of about 50 kD and a light chain with a molecular weight of about 25 kD.

10 The isotype test indicated that the isotype of the HuTN228 antibody was consistent with the expected IgG2 isotype (data not shown).

Example 12. FACS competition experiment.

Methods

15 A titration experiment was done using serial two-fold dilutions of MuTN228-FITC antibody beginning at 250 ng/test. P815/CD28⁺ cells (3x10⁵ cells/test) were incubated with FITC-labeled antibody for 1 hour on ice in 100 μ l of FACS Staining Buffer (FSB = PBS, 2% FBS, 3% normal mouse serum, 0.1% NaN₃) washed with 2 ml of FSB, and analyzed by flow cytometry (data not shown).

For the competition experiments, MuTN228-FITC (50 ng/test) in 25 μ l of FSB was combined with three-fold serial dilutions of competing HuTN228 or MuTN228 antibodies (beginning at 200 μ g/ml) in 25 μ l of FSB, and added to P815/CD28⁺ cells (3x10⁵ cells/test) in 50 μ l of FSB. As a control, P815/CD28⁺ cells were incubated with MuTN228-FITC alone (50 ng/test in 50 μ l of FSB). HuEP5C7 (human IgG2M3) and MuFd79 (mouse IgG1) isotype control antibodies (200 μ g/ml) in 25 μ l of FSB were also tested as nonspecific competitors. Cells were incubated with the antibody mixture in a final volume of 100 μ l for one hour on ice (in the dark), then washed with 2 ml of FSB, and analyzed by flow cytometry. This experiment was repeated three times.

Results

25 The binding specificity of the MuTN228 and HuTN228 antibodies to CD28 molecules on P815/CD28⁺ cells was compared in a flow cytometry competition experiment as described in the Methods. A representative result is shown in Figure 5. Both MuTN228 and HuTN228 competed with MuTN228-FITC in a concentration dependent manner, indicating that binding of both antibodies is specific for the CD28 antigen. The relative binding of HuTN228 was a few fold less than that of MuTN228. The isotype control antibodies MuFd79 and

30

WO 02/47721

PCT/US01/47955

HuEP5C7 did not compete with MuTN228-FITC, indicating that the MuTN228 and HuTN228 antibodies recognize the CD28 antigen through V-region specific interactions.

Example 13. ELISA competition experiment.

5 Methods

A 96 well ELISA plate (Nunc-Immuno plate, catalog # 439454, NalgeNunc, Naperville, IL) was coated with 100 μ l/well of sCD28-Fc (0.5 μ g/ml in PBS) (sCD28-Fc means the fused protein, in which the extracellular domains of CD28 were combined with the CH2 and CH3 domains of IgG1) overnight at 4 C. The plate was blocked for 30 minutes with 300 μ l/well of Superblock Blocking Buffer in TBS (catalog # 27535, Pierce, Rockford, IL), and washed with 300 μ l/well of ELISA Wash Buffer (EWB = PBS, 0.1% Tween-20). A mixture of MuTN228-biotin (0.5 μ g/ml) in 100 μ l of ELISA Buffer (EB = PBS, 1% BSA, 0.1% Tween-20) and three-fold serially diluted HuTN228 or MuTN228 competitor antibodies (starting at 100 μ g/ml) in 100 μ l of EB was added in triplicate in a final volume of 200 μ l/well. Isotype control antibodies HuEP5C7 and MuFd79 (100 μ g/ml) in 100 μ l of EB were also tested as non-specific competitors. As a 'no competitor' control, 100 μ l of EB was added to 100 μ l of MuTN228-biotin (0.5 μ g/ml). As a blank, 200 μ l of EB was added to the remaining wells (containing no MuTN228-biotin). The plate was incubated at room temperature for 1.5 hours with shaking. After washing the wells 4 times with 300 μ l/well of EWB, 100 μ l/well of Streptavidin-HRP (1 μ g/ml, catalog # 21124, Pierce) was added to all the wells. The plate was incubated at room temperature for 1 hour with shaking. After washing the wells as above, 100 μ l/well of ABTS substrate (catalog #507602 & 506502, KPL, Gaithersburg, MD) was added to all the wells. The plate was incubated at room temperature for 5-7 minutes and the optical density was read at 415 nm. This experiment was repeated three times.

Results

The binding specificity of the HuTN228 and MuTN228 antibodies to sCD28-Fc was compared in an ELISA competition experiment as described in the Methods. A representative result is shown in Figure 12. Both MuTN228 and HuTN228 competed with MuTN228-biotin in a concentration dependent manner. The isotype control antibodies MuFd79 and HuEP5C7 did not compete with MuTN228-biotin, indicating that the MuTN228 and HuTN228 antibodies recognize the CD28 antigen through V-region specific interactions. The IC_{50} values of MuTN228 and HuTN228 for all three experiments are shown in Table 2. The relative binding of HuTN228 was on average 2.6 fold less than that of MuTN228.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Table 2. ELISA competition summary

Competitor	IC ₅₀ (g/ml)			Average	Std. Dev.
	Expt 1	Expt 2	Expt 3		
MuTN228	0.21	0.20	0.15	0.19	0.03
HuTN228	0.37	0.64	0.48	0.50	0.14

Example 14. ¹²⁵I-labeled antibody competition experiment5 Methods

The relative binding affinities of the MuTN228 and HuTN228 antibodies were determined following the method of Queen et al. (Queen, C., W.P. Schneider, H.E. Selick, P.W. Payne, N.F. Landolfi, J.F. Duncan, N.M. Avdalovic, M. Levitt, R.P. Junghans, T.A. Waldmann. 1989. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:10029-10033). Briefly, ~10 ng of ¹²⁵I-labeled MuTN228 in 50 l of Binding Buffer (BB = PBS, 2% FBS, 1 g/ml mouse IgG, 0.1% NaN₃) was combined in triplicate with three-fold serial dilutions of MuTN228 or HuTN228 competitor antibodies (beginning at 400 g/ml) in 50 l of BB, added to 100 l of P815/CD28⁺ cells (2.5 x 10⁵ cells/test) in incubation tubes (Skatron Macrowell Tube Strips, catalog # 15773, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), and incubated for 90 minutes at 4 C with gentle shaking. Isotype control antibodies HuEP5C7 and MuFd79 (400 g/ml) in 50 l of BB were also tested as nonspecific competitors. Following the incubation, the cell-antibody mixture was transferred to centrifuge tubes (Sarstedt Micro Tubes, catalog # 72.702, Sarstedt, Newton, NC) containing 0.1 ml 80% dibutyl phthalate-20% olive oil, the incubation tubes were washed once with 50 l of BB, and bound and free counts were separated by centrifugation as described (Kuziel, W.A., S.J. Morgan, T.C. Dawson, S. Griffin, O. Smithies, K. Ley, N. Maeda. 1997. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:12053-12058). This experiment was repeated three times.

20 Results

The relative binding affinities of the MuTN228 and HuTN228 antibodies were compared in an ¹²⁵I-labeled antibody competition experiment as described in the Method. A representative result is shown in Figure 13. Both MuTN228 and HuTN228 competed with ¹²⁵I-labeled MuTN228 in a concentration dependent manner. The isotype control antibody MuFd79 showed weak but repeatable competition at high concentrations, but the isotype control antibody HuEP5C7 did not compete with ¹²⁵I-labeled MuTN228, indicating that the HuTN228 antibody recognizes the CD28 antigen through V-region specific interactions. The IC₅₀ values of

WO 02/47721

PCT/US01/47955

MuTN228 and HuTN228 for all three experiments are shown in Table 3. The apparent binding affinity of HuTN228 was approximately 2.4 fold less than that of the MuTN228 antibody.

Table 3. I-125 competition summary

Competitor	IC ₅₀ (nM)			Average	St. Dev.
	Expt 1	Expt 2	Expt 3		
MuTN228	0.93	1.05	1.02	1.00	0.06
HuTN228	2.65	2.43	2.13	2.40	0.26

Example 15 Amino acid sequencing of the hamster anti-murine CD28 antibody

Method

10 **Hybridoma and antibodies.** The Armenian hamster anti-murine CD28 hybridoma PV1 was obtained from ATCC (ATCC HB-12352). Purified PV1, R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated PV1 were purchased from Southern Biotechnology (Birmingham, AL). The Syrian hamster anti-CD28 antibody 37.51 was from PhadMingen (San Diego, CA). Secondary antibodies fluorescein (FITC)-conjugated donkey anti-Armenian hamster IgG (H+L), FITC-conjugated donkey anti-Syrian hamster IgG (H+L), FITC-conjugated donkey anti-
 15 mouse IgG (H+L), R-PE-F(ab')₂ donkey anti-mouse IgG (H+L) were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA); and FITC-conjugated goat anti-mouse kappa, R-PE-conjugated goat anti-mouse IgG3, and horse radish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse kappa were from Southern Biotechnology. Goat anti-mouse IgG3, and mouse IgG3 isotype control FLOPC 22 were from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). The Armenian hamster anti-murine CD3 antibody 145.2C11 and its hamster/mouse chimeric version 145.2C11-IgG3
 20 were generated in our laboratory. FITC-conjugated 145.2C11 was from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN).

Cloning of variable region cDNAs. The V region cDNAs for the light and heavy chains of PV1 were cloned from the hybridoma cells by an anchored polymerase chain reaction (PCR) method described by Co et al. (Co, M.S., N.M. Avadalovic, P.C. Caron, M.V. Avadalovic, D.A. Scheinberg, and C. Queen. 1992. *J. Immunol.* 148:1149-1154.). Amplification was performed on cDNA using 3' primers that anneal respectively to the hamster kappa and gamma chain C regions, and a 5' primer that anneals to the added G-tail of the cDNA. For
 25

WO 02/47721

PCT/US01/47955

V_L PCR, the 3' primer has the sequence of 5' TATAGAGCTCCACTTCCAGTGCCC (SEQ ID NO: 20), with residues 11-24 hybridizing to the hamster C_κ region. For V_H PCR, the 3' primers has the degenerated sequences of (SEQ ID NOS:17, 18 and 19):

5' TATAGAGCTCAGCTTCCAGTGGATAG^ACCGATGGGGCTGTG^{G T}TTTGGC,
T

with residues 19 - 50 hybridizing to most rodent IgG C_{H1}. The non-hybridizing sequences in the two primer sets contain restriction sites used for cloning. The V_L and V_H cDNAs were subcloned into a pUC19 vector for sequence determination. To avoid PCR-generated errors, five independent clones for each cDNA were sequenced, and only the clones whose sequence agreed with the consensus sequence were chosen to express the chimeric PV1.

Results

15 Cloning of PV1 V region cDNAs. The PV1 light and heavy chain V region cDNAs were cloned from the hybridoma cells as described in Methods. For the V_L PCR, only 3' primer corresponding to the hamster C_κ region could yield V_L cDNA product from PV1. A 3' primer from the hamster C_γ region, on the other hand, did not yield any PCR product. These results indicated that the hybridoma PV1 uses kappa for its light chain. Several light and heavy chain clones were sequenced and were found to contain the same V_L and V_H respectively. Limited C_{H1} and C_γ sequence data indicated that the cloned heavy and light chains are not murine in origin.

Example 16 Construction and expression of chimeric PV1-IgG3.

25 Method
PV1 V_L and V_H were made by PCR into mini-exon segments flanked by XbaI sites as described (He, X.Y., Z. Xu, J. Melrose, A. Mullooney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klinghail, M.S. Co, and E.L. Berg. 1998. *J. Immunol.* 160:1029-1035.) and they were separately introduced to the light chain and heavy chain expression plasmids (Fig. 14). Each mini-exon contains a signal peptide sequence, a mature variable region sequence and a 5' splicing donor sequence derived from the most homologous mouse J chain gene. Such splicing donor is used to splice the V region exon to the mouse antibody constant region. Each mini-exon was sequenced again after it

WO 02/47721

PCT/US01/47955

had been cloned into the expression vector to ensure the correct splicing signal was introduced, and no PCR errors were generated.

A vector was constructed to express both the heavy and light chain genes of the chimeric PV1-IgG3 from a single plasmid. In this report, PV1-IgG3 refers to a chimeric antibody containing the hamster PV1 V_L and V_H variable regions, a mouse IgG3 constant region for the heavy chain, and a mouse kappa constant region for the light chain. The expression vector pV1.g3.rg.dE (Fig. 14) was obtained by a two-step cloning process similar to that described by Cole et. al. (Cole, M.S., C. Anasetti, and J.Y. Tso. 1997. *J. Immunol.* 159:3613-3621.). The heavy chain constant region was derived from the mouse γ 3 genomic fragment, and the light chain from the κ fragment. Both the heavy and light chain genes are driven by the human cytomegalovirus major immediate early promoter and enhancer, and they are separated by the transcription terminator derived from the human complement gene C2 (Ashfield, R., P. Enriquez-Harris, and N.J. Proudfoot. 1991. *EMBO J.* 10:4197-4207.). The selection marker *gpt* gene (Mulligan, R.C., and P. Berg. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072-2076) is driven by a modified SV40 early promoter. For expression of the chimeric PV1-IgG3, the single plasmid vector was transfected into the murine myeloma cell line NS0, and the transfectants were selected for *gpt* expression. Spent media from transfectants were analyzed for mouse IgG3 antibody production by ELISA, using goat anti-mouse IgG3 as capturing reagent and HRP-conjugated goat anti-mouse kappa chain as developing reagent. The assay is specific for mouse IgG3; other mouse IgG isotypes are negative in this analysis.

20

Results

Expression of the chimeric PV1-IgG3. The cloned V_L and V_H were made into mini-exons (Fig. 15) and incorporated into an expression vector as described in *Materials and Methods* and Fig. 15. The expression vector was then transfected into a murine myeloma cell line NS0 to produce the chimeric PV1-IgG3. Spent media from several transfectants were assayed by ELISA for the production of mouse IgG3 antibodies and by FACSscan for binding to EL4 cells. Most transfectants were positive in both assays. One transfectant was chosen for its high antibody productivity and expanded to grow in 1 L of serum-free medium. PV1-IgG3 was purified from the 1 L spent medium by affinity chromatography. The yield was >10 mg/L.

30

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Example 17 Characterization of the purified chimeric PV1-IgG3 by HPLC and SDS-PAGEMethods

Protein Purification. One of the high IgG3-expressing transfectants (Clone #1) was grown in 1 L of Gibco Serum-free Hybridoma medium. Spent culture supernatant was harvested when cell viability reached 30 % or below, concentrated to 200 ml, and loaded onto a 5 ml protein-A Sepharose column using a Pharmacia P1 pump (2-3 ml/min). The column was then washed with PBS containing an additional 0.1 M NaCl (final concentration of NaCl was 0.25 M) before the antibody was eluted with 3.5 M MgCl₂. The eluted protein was then desalted onto a PD10 column equilibrated with PBS containing an additional 0.1 M NaCl. The desalted protein solution was filtered through a 0.2 µm filter prior to storage at 4 °C. Like all mouse IgG3, PV1-IgG3 at high concentrations (>1 mg/mL) precipitates in the cold but returns to solution by warming at 37° C. The antibody stays in solution at room temperature. Repeated cycles of cold precipitation do not seem to affect the antigen binding activity of the antibody.

Purity Determination by size exclusion HPLC and SDS-PAGE: Size exclusion HPLC was performed using a Perkin Elmer HPLC system consisting of a PE ISS 200 Advanced LC Sample Processor, a PE Series 410 Bio LC Pump, a PE 235C Diode Array Detector, and a PE Nelson 600 Series LINK. Perkin Elmer Turbochrom Navigator Version 4.1 software was used to control the autosampler, pump, and detector, and to acquire, store, and process the data. Separation was achieved using two Tosoh TSK-GEL G3000SWXL size exclusion HPLC columns (Tosoh, catalog # 08541, 7.8 mm x 300 mm, 5 µm particle size, 250 Å pore size) connected in series. The mobile phase was 200 mM potassium phosphate/150 mM potassium chloride at pH 6.9, and the flow rate was 1.00 mL/minute. The column eluate was monitored spectrophotometrically at both 220 nm and 280 nm. The injection volume was 50 µL (63.5 µg) of the undiluted PV1-IgG3 sample. SDS-PAGE was performed according to standard procedures.

25

Results

The purity of the isolated PV1-IgG3 was analyzed by size exclusion HPLC and SDS-PAGE. The HPLC elution profile of PV1-IgG3 is shown in Fig. 16. Based on this analysis, the protein is 99% monomer and has the mobility corresponding to the molecular weight of 150 kD. SDS-PAGE analysis of PV1, PV1-IgG3 and isotype control under nonreducing conditions also indicated all three antibodies have the molecular weight of

30

WO 02/47721

PCT/US01/47955

about 150 kD (Fig. 17A). The minor bands seen in Fig. 17A were artifacts due to boiling of the samples in SDS without reduction. They reflected the number of incomplete inter-chain disulfide bonds in the antibodies. Analysis of the same three proteins under reducing conditions (Fig. 17B), however, indicated that PV1, but not PV1-IgG3 or the isotype control, has a heavy chain with molecular weight slightly higher than the 50 kD molecular weight usually seen with IgG. The hamster antibody PV1 thus either has heavy glycosylation at Asn297 in C_H3, or it has an extra glycosylation site elsewhere in the heavy chain. As discussed later, this unusual glycosylation pattern may contribute to PV1's nonspecific binding to EL4 cells, perhaps by lectin/carbohydrate interaction.

10 Example 18

Methods

Flow cytometry. Murine T cell line EL4 cells (2.5×10^5 cells/0.2 ml) were stained with 1 μ g/ml of PV1, 37.51 or PVI-IgG3 at 4° C for 30 min, washed with 2 ml of cold PBS, and stained with 20 μ l of specific fluorochrome-conjugated secondary antibodies (10 μ g/ml). After 20 min of incubation at 4° C in the dark, the cells were washed with PBS and analyzed by FACScan (Becton Dickinson, Milpitas, CA).

In the competition experiment, EL4 cells (2.5×10^5 cells/0.2 ml) were stained with 1 μ g/ml of R-PE-PV1 and 25 μ g/ml of PV1, PVI-IgG3, or IgG3 isotype control at 4° C for 30 min in the dark, washed with PBS and analyzed by FACScan. Similar competition experiment was also conducted using various versions of 145.2C11.

In the reverse competition experiment, EL4 cells (2.5×10^5 cells/0.2 ml) were stained with 1 μ g/ml of PVI-IgG3 and 25 μ g/ml of PV1 at 4° C for 30 min, washed 2 times with PBS, stained with FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L), washed, and analyzed by FACScan. To control for nonspecific binding of the secondary antibodies to PVI, EL4 cells were stained with excess PVI without PVI-IgG3 and analyzed.

For mouse T cell staining, BALB/c mouse splenic cells (2.5×10^5 cells/0.2 ml) were stained with 1 μ g/ml of mouse IgG3 isotype control (ELOPC 21) or PVI-IgG3 at 4° C for 30 min, washed with 2 ml of cold PBS, and stained with 20 μ l of FITC-conjugated 145.2C11 (10 μ g/ml) and 20 μ l of R-PE-conjugated goat anti-mouse

WO 02/47721

PCT/US01/47955

IgG3 (10 µg/ml). After 20 min of incubation at 4° C in the dark, the cells were washed with PBS and analyzed by FACScan.

5 **Results**

Characterization of PV1 and PV1-IgG3 by flow cytometry. PV1 was used to stain CD28-positive T cell line EL4 and analyzed by FACScan. The pattern of staining indicated that PV1 binds EL4 cells at two different sites (Fig. 17A). In addition, PV1 as well as several Armenian hamster anti-murine T cell antibodies (145.2C11, anti-CD3; H57-597, anti-TCR; and UC10-4F10-11, anti-CTLA4) also bind nonspecifically to CD28-negative myeloma cell line NS0 (data not shown). The Syrian hamster anti-CD28 antibody 37.51, on the other hand, binds specifically to only one site on EL4 cells (Fig. 17B). It appears that, in addition to CD28 binding, PV1 also binds nonspecifically to other sites, possibly through the carbohydrate/lectin type of interaction. As shown in Fig. 17C, the chimeric PV1-IgG3 does not contain this nonspecific binding activity. The antibody binds EL4 cells in a pattern similar to that of 37.51, and it does not bind to CD28-negative NS0 cells (data not shown). Thus, the nonspecific binding property of PV1 lies in the heavy chain constant region of this particular antibody and it is eliminated upon chimerization.

To demonstrate that PV1-IgG3 contains the CD28-specific binding activity, we used the FACScan competition assay. In these experiments, R-PE-conjugated PV1 was mixed with excess (25-fold) unlabeled PV1, PV1-IgG3 or mouse IgG3 control, and the mixture was used to stain EL4 cells. As shown in Fig. 18A, both PV1 and PV1-IgG3, but not isotype control, prevented R-PE-conjugated PV1 from binding to EL4 cells. The inhibition by PV1-IgG3 was less than that by PV1, and we interpreted these data as PV1-IgG3 competed with R-PE-conjugated PV1 for the CD28 sites but not for the nonspecific sites. Similarly, both 145.2C11 (Armenian hamster anti-murine CD3) and the chimeric 145.2C11-IgG3 prevented R-PE-conjugated 145.2C11 from binding to EL4 cells (Fig. 18B), but the chimeric antibody is less efficient due to its inability to eliminate R-PE-145.2C11's nonspecific binding to cells.

We also did the reverse competition experiment using excess (25-fold) PV1 to compete with PV1-IgG3 for binding to EL4 cells. Although PV1-IgG3 was not labeled in this case, it was specifically recognized by the FITC-conjugated donkey anti-mouse antibodies. The results in Fig. 18C showed that the inhibition of PV1-

WO 02/47721

PCT/US01/47955

IgG3's binding to EL4 cells by excess PV1 was almost complete, demonstrating that PV1 and PV1-IgG3 bind to the same epitope.

5 Finally, PV1-IgG3 was used to stain mouse splenic cells. PV1-IgG3-coated splenic cells were specifically recognized by the secondary antibodies R-PE-conjugated goat anti-mouse IgG3. Simultaneously, FITC-conjugated 145.2C11 was also added to splenic cells to label CD3-positive cells. In the two-color flow cytometry analysis, PV1-IgG3 specifically stained CD3-positive cells, but not CD3-negative cells (Fig. 19B). Mouse IgG3 isotype control, on the other hand, did not stain the CD3-positive cells (Fig. 19A). Thus, the chimeric PV1-IgG3 recognizes an antigen that is expressed on murine T cells, an antigen binding activity that is
10 consistent with an anti-CD28 antibody.

Example 19 Induction of Collagen Induced Arthritis

Methods

15 Mice were immunized intradermally at the base of the tail with 125 µg of bovine CII (Collagen Gijutsu Kenkyukai, Japan) emulsified with an equal volume of CFA (Wako, Japan). Mice were boosted by intradermal injection with 125µg of bovine CII in CFA on day 21. Mice were treated anti-CD28 antibody (PV1-IgG3) at the dose of 1mg/kg/day continuous infusion via osmotic pump for 7days after the initial immunization. Arthritis development was checked by inspection of four paws on day 11 after the second immunization, and the inflammation of four paws was graded from 0 to 3 as described previously (Tada, Y., A. Ho, D.-R. Koh, T. W. Mak. 1996. J. Immunol. 156:4520, Tada, Y., A. Ho, T. Matsuyama, T. W. Mak. 1997. J. Exp. Med. 185:231).
20 Each paw was graded and the four scores were added such that the maximal score per mouse was 12. The arthritis index was calculated by dividing the total score of the experimental mice by the number of the total number of mice.

25

Results

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Mice were immunized with bovine CII, and observed for development of arthritis. At day 11 after the second immunization, arthritis index was significantly reduced in mice treated with anti-CD28 antibody (0.63 ± 0.50) ($P < 0.01$) versus control (7.50 ± 0.66).

5

Example 20MethodsMice; Animals

10 Female BALB/c and C3H mice were obtained from Charles River Japan, Inc. (Yokohama, Japan). Animals were all housed in a specific pathogen-free facility in microisolator cages with filtered air and free access to food and water. All mice were 6-8 wk of age when experiments were initiated.

Antibodies;

15 Anti-mouse silent CD28 (PV1-IgG3) has identical specificity to that of PV-1 clone but it does not have strong agonistic activity in vitro (Fc \rightarrow IgG3). Anti-mouse CD154 (TRAP1, IgG1) was purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). CTLA4-Ig (CTLA-4/Fc Chimera) was purchased from Genzyme (Cambridge, MA).

Tail-Skin transplantation;

20 Full thickness skin grafts (0.5 cm²) from tail of donor mice (BALB/c-H-2d) were transplanted on the dorsal thorax of recipient mice (C3H:H-2b) and secured with a band-aid for 7 days. Graft survival was then followed by daily visual inspection. Rejection was defined as the >80% loss of viable epidermal graft tissue. Statistical analyses were performed using a Dunnett's Multiple Comparison test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

25

Treatment protocols;

Skin graft recipients were treated with 10, 50, 250 μ g of anti-mouse silent CD28, 250 μ g of anti-mouse CD154 and 100 μ g of CTLA4-Ig administered i.p. on the day of transplantation (day 0) and on postoperative days 3, and 6.

30

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Results;

Simultaneous blockade of the CD40 and CD28 T cell costimulatory pathways by administration of anti-mouse silent CD28 and anti-mouse CD154 effectively promotes skin allograft survival in C3H mice. Control animals rejected their grafts at 9 days. Anti-CD40L mAb alone modestly prolonged allograft survival (MST 10 days), but was seen to dramatically improve survival when combined with CD28 extending median survival time- (MST-) beyond 33 days. This strategy is markedly less effective in administration of CTLA4-Ig and anti-mouse CD40L mAb, with MST of 12 days.

Example 21 Preparation of Fab and F(ab')₂ fragment and of anti-CD28 antibody

10

Preparation of Fab fragment of anti-CD28 antibody

Anti-human CD28 antibody (HuTN228) was digested with immobilized-Ficin (Pierce, USA). Immobilized ficin was activated with 50mM Tris-HCl pH 6.8 buffer containing 5mM EDTA and 11.5mM cysteine·HCl and packed to a column. Antibody solution was added to the column, and incubated at 37°C for 2 or 3 days. The column was washed with PBS and the digest was concentrated by ultrafiltration. The concentrated digest was applied to the gel-filtration column (TSKgel-3000SWxl, Tosoh, Japan) and appropriate fractions were collected and concentrated by ultrafiltration. Protein concentration was determined by absorbance at 280nm (Abs₂₈₀ = 1.4 for 1mg/mL) and the fragment size was confirmed by SDS-PAGE.

15

Preparation of F(ab')₂ fragment of anti-CD28 antibody

Anti-human CD28 antibody was prepared with the same method as that of Fab fragment except for the concentration of cysteine (1.15mM) and the period of incubation (one over night).

20

25

Obviously, numerous modifications and variations of the present invention are possible in light of the above teachings. It is therefore to be understood that within the scope of the appended claims, the invention may be practiced otherwise than as specifically described herein.

All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety.

30

WO 02/47721

PCT/US01/47955

What is claimed is:

1. A silenced anti-CD28 antibody.
2. The antibody of Claim 1 which is a chimeric antibody.
- 5 3. The antibody of Claim 1 which is a humanized antibody.
4. The antibody of Claim 1 which has a variable region comprising the amino acid sequence in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4.
- 10 5. The antibody of Claim 1 which has a variable region comprising the amino acid sequence in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.
6. The antibody of Claim 1 which has a variable region comprising the amino acid sequence in SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8.
- 15 7. The antibody of Claim 1 which has a variable region comprising the amino acid sequence in SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8.
- 20 8. A polynucleotide encoding the antibody of Claim 1.
9. The polynucleotide of Claim 8 which comprises at least one polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:4.
- 25 10. An expression vector comprising the polynucleotides of Claim 8.
11. A host cell comprising the polynucleotide of Claim 8.
12. A host cell comprising the expression vector of Claim 10.
- 30 13. A method of producing a silenced anti-CD28 antibody comprising

WO 02/47721

PCT/US01/47955

culturing the host cell of Claim 11 under conditions suitable for expression of the antibody and recovering the expressed antibody from said culture.

14. A method of producing a silenced anti-CD28 antibody comprising
5 culturing the host cell of Claim 12 under conditions suitable for expression of the antibody and recovering the expressed antibody from said culture.

15. A method of producing a silenced anti-CD28 antibody comprising
introducing the polynucleotide of Claim 8 into a host cell;
10 culturing the host cell under conditions suitable for expression of the antibody; and recovering the expressed antibody from said culture.

16. The method of Claim 15 wherein said polynucleotide comprises at least one polynucleotide
selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, and SEQ ID NO:4.
15

17. A method of producing a silenced anti-CD28 antibody comprising
introducing the expression vector of Claim 10 into a host cell;
culturing the host cell under conditions suitable for expression of the antibody; and recovering the
expressed antibody from said culture.
20

18. A pharmaceutical composition comprising the silenced anti-CD28 antibody of Claim 1 and a
pharmaceutically acceptable ingredient.

19. A method of inducing T-cell tolerance in a patient comprising administering an effective amount
25 of the antibody of Claim 1 to induce T-cell tolerance to said patient.

20. The method of Claim 19, wherein said administering further comprises administering another
immunosuppressant.

30 21. A method of providing immunosuppression in a patient comprising administering an effective
amount of the antibody of Claim 1 to provide immunosuppression to said patient.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

22. The method of Claim 21, wherein said administering further comprises administering another immunosuppressant.

23. A method of treating organ or tissue transplant rejection in a patient comprising administering an effective amount of the antibody to treat organ or tissue transplant rejection in said patient.

24. The method of Claim 23, wherein said administering further comprises administering another immunosuppressant.

25. An antibody selected from the group consisting of HuTN228 and MuTN228 and Fab fragments thereof and F(ab)'2 fragments thereof.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

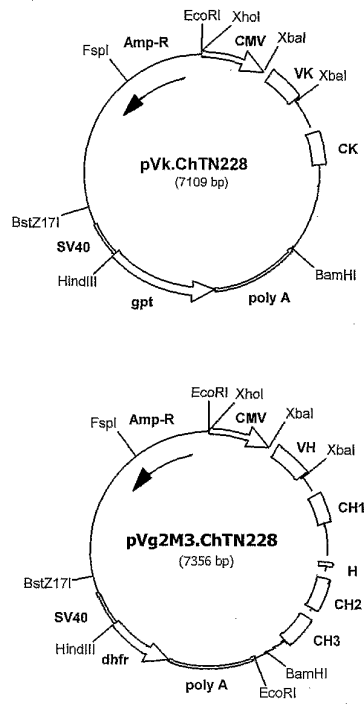


Figure 1.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

```

          30                               60
tctagaccaccATGGAGTCAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCAG
      M E S D T L L L W V L L L W V P

          90                               120
GCTCCACTGGTGACATTGTGCTACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTCTCTGGGGC
G S T G D I V L T Q S P A S L A V S L G

          150                              180
AGAGAGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGTAAAAGTGTGAATATTATGTCACAAGTTAA
Q R A T I S C R A S E S V E Y Y V T S L

          210                              240
TGCAGTGGTACCAACAGAAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCA
M Q W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S

          270                              300
ACGTAGATTCTGGGTCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGCTG66ACAGACTCAGCC
N V D S G V P A R F S G S G S G T D F S

          330                              360
TCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGATGATATTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGA
L N I H P V E E D D I A M Y F C Q Q S R

          390                              420
AGGTTCCATTACAGTTCCGCTCCGGGACAAAAGTTGAAATAAAACgtaagtagacttttg
K V P F T F G S G T K L E I K

```

cctaga

Figure 2.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

```

          30                      60
tctagaccaccATGGCTGTCCTGGTGTCTCTCTGCTGCTGGTTCATTTCCAAGCTGTG
      M A V L V L F L C L V A F P S C

          90                      120
TCTGTCCAGGTGCAGCTGAAGGACTCAGGACCTGGCTGGCGCCCTCACAGAGCC
V L S Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S

          150                      180
TGTCCATCACTTGCACGTCTCTGGATTTCATTAACCAGCTATGGTGTACACTGGGTT
L S I T C T V S G F S L T S Y G V H W V

          210                      240
GCCAGCCTCCAGGAAAGGTCTGGAATGGCTGGGAGTCATATGGCCTGGTGGAGGCACAA
R Q P P G K G L E W L G V I W P G G G T

          270                      300
ATTTTAATTCGGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCGAAGACAACCTCCAAGCCAAG
N F N S A L M S R L S I S E D N S K S Q

          330                      360
TTTTCTAAAAATGAACACTCTGCAAACTGATGACACAGCCATATATTATTGTGCCAGAG
V F L K M N T L Q T D D T A I Y Y C A R

          390                      420
ATCGGGCGTATGGTAACTACCTCTATGCCATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA
D R A Y G N Y L Y A M D Y W G Q G T S V

          450
CGTCTCCTCAGgtaagaatggcctctaga
T V S S

```

Figure 3.

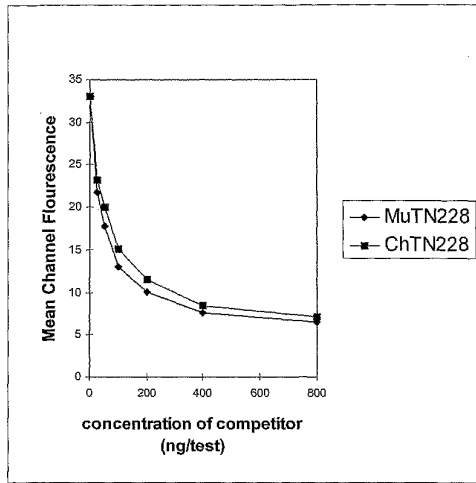


Figure 4.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

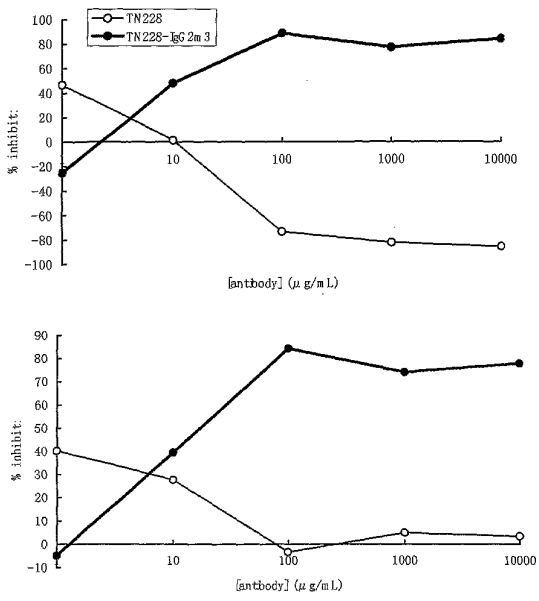


Figure 5

WO 02/47721

PCT/US01/47955

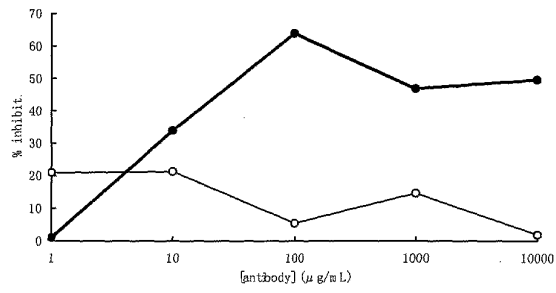
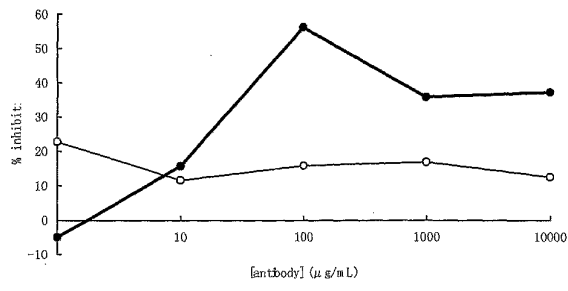
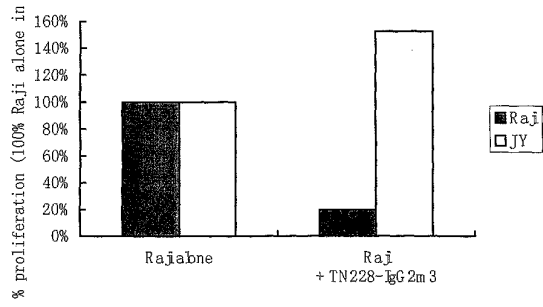


Figure 6

WO 02/47721

PCT/US01/47955

Volunteer: A



Volunteer: B

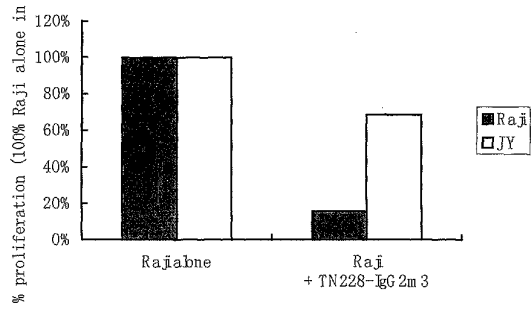


Figure 7

WO 02/47721

PCT/US01/47955

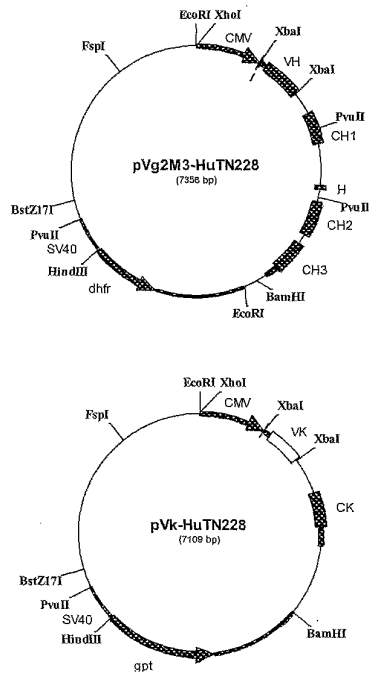


Figure 8.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

tctagaccaccATGGCTGTCCTGGTGTCTTCCTCTGCCTGGTGGCAITTCOAAGCTGTG
 M A V L V L F L C L V A F P S C

90 120
 TCCTGTCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGAAGCCCTCAGAGACCC
 V L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T

150 180
 TGTCCCTCACTGCCCTGTCTCTGGATTTTCATTAACCAGCTATGGTGTACACTGGATTC
 L S L T C A V S G F S L T S Y G V H W I

210 240
 GCCAGCCTCCAGGAAAGGCTCTGGAATGGCTGGGAGTCATATGGCCTGGTGGAGGCACAA
 R Q P P G K G L E W L G V I W P G G G T

270 300
 ATTTTAATTCGGCTCTCATGTCCAGACTGACCATCAGCGAAGACACCTCCAAGAACCAAG
 N F N S A L M S R L T I S E D T S K N Q

330 360
 TTTCCTAAAATGAGCTCTGTGACAGCTGCTGACACAGCCGTATATTATTGTGCCAGAG
 V S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R

390 420
 ATCGGGCGTATGGTAACTACCTCTATGCGATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTTAGTCA
 D R A Y G N Y L Y A M D Y W G Q G T L V

450
 CCGTCTCCTCAGgtaagaatggcctctaga
 T V S S

Figure 9

WO 02/47721

PCT/US01/47955

```

          30                               60
tctagaccaccATGGAGTCAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCAG
      M E S D T L L L W V L L L W V P

          90                               120
GCTCCACTGGTGACATTCAGATGACCAATCTCCATCTTCTTTGTCTGGTCTGIGGGGG
G S T G D I Q M T Q S P S S L S A S V G

          150                               180
ACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGTGAAGTGTGAATATTATGTCACAAGTTAA
D R V T I T C R A S E S V E Y Y V T S L

          210                               240
TGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGAAAGGCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCA
M Q W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S

          270                               300
ACGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCC
N V D S G V P S R F S G S G S G T D F T

          330                               360
TCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATATTGCAACGTATTACTGTCAGAAAGTAGGA
L T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q S R

          390                               420
AGGTTCCATTACGTTCCGGGGGGGACAAAGGTGGAAATAAAACgtaagtagacttttg
K V P F T F G G G T K V E I K

```

ctctaga

Figure 10

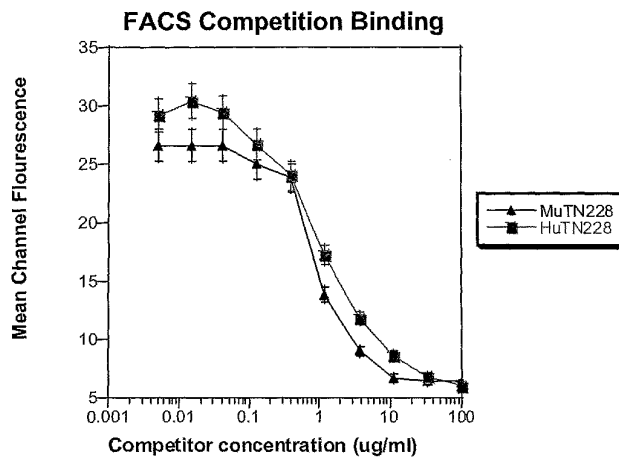


Figure 11.

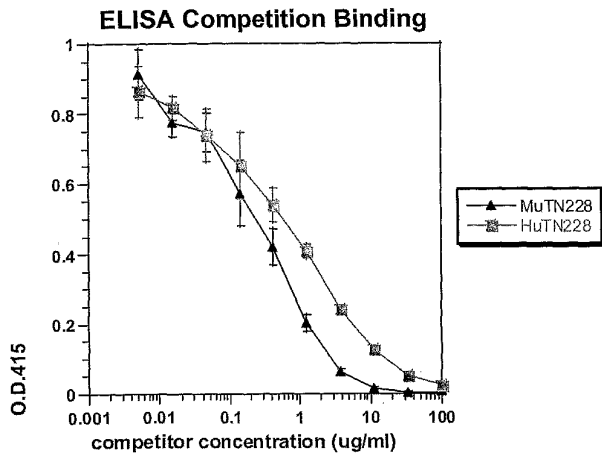


Figure 12.

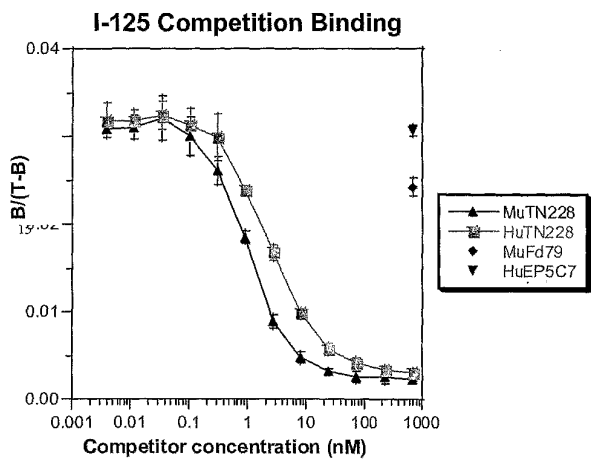


Figure 13.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

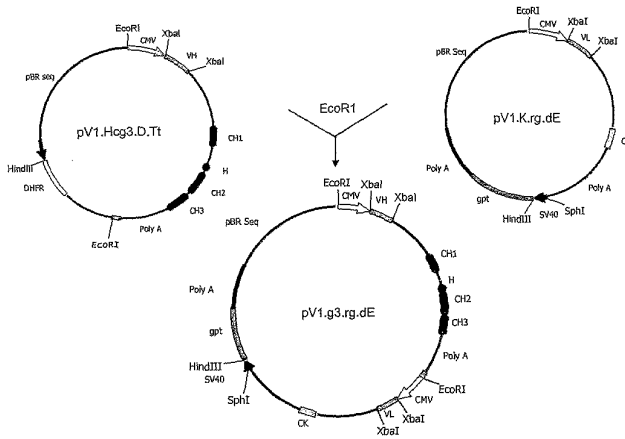


Figure 14.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

XbaI
tctagacagtggggaacaat ATG GAT TCA CAG ATC CAG GTC CTC ATG TCC
M D S Q I Q V L M S

CTG CTC CTC TGG ATG TCT GGT GCC TGT GGA GAT ATT GTG ATG ACC
L L L W M S G A C G D I V M T

CAG TCT CCA TAT TCC CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC ACC
Q S P Y S L A V S A G E K V T

ATG AGT TGC AGG TCC AGT CAG AGC CTC TAT TAC AGT GGA ATC AAA
M S C R S S Q S L Y Y S G I K

AAG AAC CTC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCG
K N L L A W Y Q Q K P G Q S P

AAA CTG CTG ATC TAC TTT ACA TCT ACT CGG TTA CCT GGG GTA CCG
K L L I Y F T S T R L P G V P

GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TAC ACT CTC ACC
D R F T G S G S G T D Y T L T

ATC ACC AGT GTC CAG GCT GAA GAC ATG GGG CAT TAT TTC TGT CAG
I T S V Q A E D M G H Y F C Q

CAG GGT ATA AGC ACT CCG CTC ACG TTC GGT GAT GGC ACC AAG CTG
Q G I S T P L T F G D G T K

GAG ATA AGA Cgtaagtagaatccaaagtctctaga
E I R XbaI

Figure 15A

WO 02/47721

PCT/US01/47955

B

XbaI
tctagagtcttcacc ATG GTA TGG GGC TTG ATC ATC ATC TTC CTG GTC
M V W G L I I I F L V

ACA GCA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAG TTG AAG CAG TCT
T A A T G V H S Q V Q L K Q S

GGG GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGA GCC TCA GTG AAG ATA TCC TGC
G A E L V K P G A S V K I S C

AAA ACT TCA GGC TAT ACC TTC ACT GAT GGC TAC ATG AAC TGG GTT
K T S G Y T F T D G Y M N W V

GAG CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGA ATT GAT
E Q K P G Q G L E W I G R I D

CCT GAT AGT GGT AAT ACT CGG TAC AAT CAG AAA TTC CAG GGC AAG
P D S G N T R Y N Q K F Q G K

GCC ACA CTG ACT AGA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GTC TAC ATG GAC
A T L T R D K S S S T V Y M D

CTC AGG AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCT GTC TAT TAC TGT GCG
L R S L T S E D S A V Y Y C A

AGA GAT GGG ACC TTC TAC GGT ACC TAC GGC TAC TGG TAC TTC GAT
R D G T F Y G T Y G Y W Y F D

TTC TGG GGC CAG GGG ACC CAG GTC ACC GTC TCC TCA G gtagtctt
F W G Q G T Q V T V S S

taaaacctctaga
XbaI

Figure 15.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

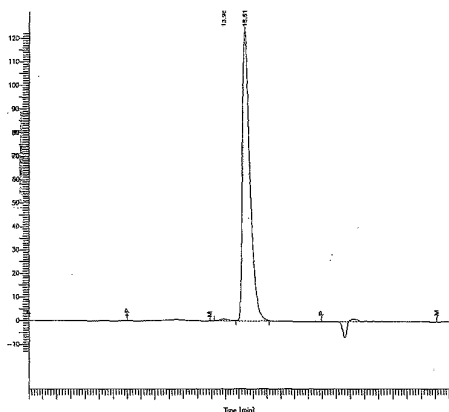


Figure 16

WO 02/47721

PCT/US01/47955

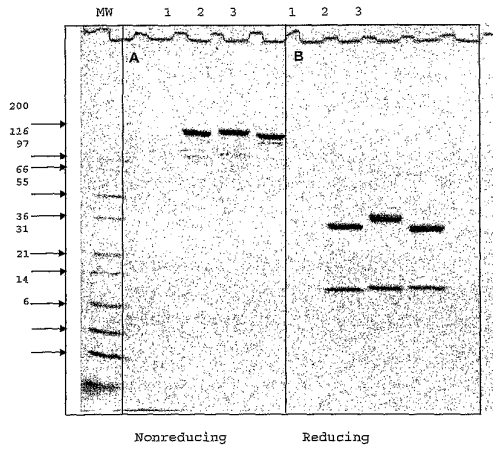


Figure 17.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

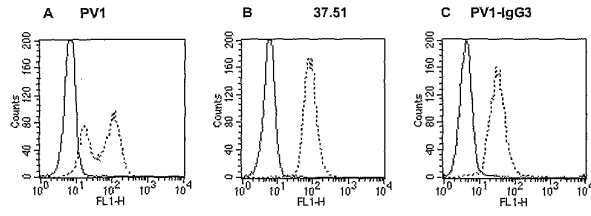


Figure 18.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

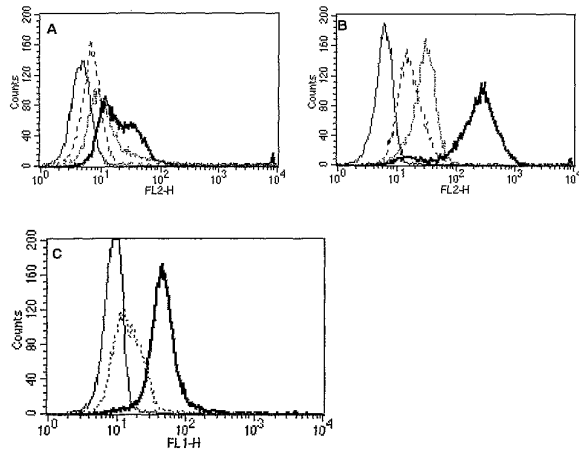


Figure 19.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

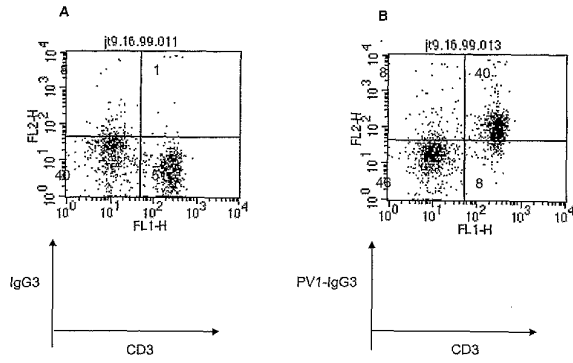


Figure 20.

WO 02/47721

PCT/US01/47955

SEQUENCE LISTING

<110> VASQUEZ, Maximiliano
 HINTON, Paul
 TAMURA, Kouichi
 HIGASHI, Yauyuki
 SEKI, Nobuo
 UEDA, Hirotsugu
 TSO, J. Yun

<120> SILENCED ANTI-CD28 ANTIBODIES AND USE THEREOF

<130> 200071US0PROV

<150> US 60/255,155

<151> 2000-12-14

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 427

<212> DNA

<213> hybrid

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(404)

<223>

<400> 1
 tctagaccac c atg gag tca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctc 50
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu
 1 5 10
 tgg gtt cca ggc tcc act ggt gac att gtg ctc acc caa tct cca gct 98
 Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 15 20 25
 tct ttg gct gtg tct ctg ggg cag aga gcc acc atc tcc tgc aga gcc 146
 Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
 30 35 40 45
 agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa 194
 Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
 50 55 60
 cag aaa cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac 242
 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn
 65 70 75
 gta gat tct ggg gtc cct gcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca 290
 Val Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 80 85 90

WO 02/47721

PCT/US01/47955

gac ttc agc ctc aac atc cat cct gtg gag gag gat gat att gca atg 338
 Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
 95 100 105

tat ttc tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc tgg ggg 386
 Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly
 110 115 120 125

aca aag ttg gaa ata aaa cgtaagtaga cttttgctct aga 427
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 130

<210> 2
 <211> 131
 <212> FRT
 <213> hybrid

<400> 2

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys
 130

<210> 3

WO 02/47721

PCT/US01/47955

<211> 877
 <212> DNA
 <213> hybrid

<220>
 <221> CDS
 <222> (12)..(431)
 <223>

```

<400> 3
tctagaccac c atg gag tca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctg 50
          Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu
          1          5          10

tgg gtt cca ggc tcc act ggt gac att gtg ctc acc caa tet cca got 98
Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
15          20          25

tct ttg gct gtg tct ctg ggg cag aga gcc acc atc tcc tgc aga gcc 146
Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala
30          35          40          45

agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa 194
Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
50          55          60

cag aaa cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac 242
Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn
65          70          75

gta gat tct ggg gtc cct gcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca 290
Val Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
80          85          90

gac ttc agc ctc aac atc cat cct gtg gag gag gat gat att gca atg 338
Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met
95          100          105

tat ttc tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc tog ggg 386
Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly
110          115          120          125

aca aag ttg gaa ata aaa cgt aag tag act ttt got cta gat cta 431
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Lys Thr Phe Ala Leu Asp Leu
130          135

gaccacoatg gctgtcctgg tgotgttccct ctgctgggtt gcatttccaa gctgtgtcct 491

gtcccaggty cagctgaagg agtcaggacc tggcctggty gcgcocctcac agagocctgtc 551

catcaacttg cactgtctctg gatttttcatt aaccagctat ggtgtacaact gggttcgcca 611

gcctccagga aagggtcttg aatggctggg agtcatatgg cctggtggag gcacaaatatt 671

taattcggct ctcagtcca gactgagcat cagcgaagac aactccaaga gcccaagtttt 731

```

WO 02/47721

PCT/US01/47955

cttaaaaatg aacctctgc aaactgatga cacagccata tattattgtg ccagagatcg 791
 ggcgtatggt aactacctct atgccatgga ctactggggc caaggaacct cagtcaccgt 851
 ctctcaggt aagaatggcc tctaga 877

<210> 4
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> hybrid

<400> 4

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Lys
 130

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> hybrid

<400> 5

WO 02/47721

PCT/US01/47955

```

Thr Phe Ala Leu Asp Leu
1           5

<210> 6
<211> 450
<212> DNA
<213> hybrid

<220>
<221> CDS
<222> (12)..(431)
<223>

<400> 6
tctagaccac c atg gct gtc ctg gtc ctg ttc ctc tgc ctg gtt gca ttt      50
          Met Ala Val Leu Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe
          1           5           10

cca agc tgt gtc ctg tcc cag gtc cag ctg cag gag tca gga cct ggc      98
Pro Ser Cys Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
          15           20           25

ctg gtc aag ccc tca gag acc ctg tcc ctc act tgc gct gtc tct gga      146
Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly
          30           35           40           45

ttt tca tta acc agc tat ggt gta cac tgg att cgc cag cct cca gga      194
Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
          50           55           60

aag ggt ctg gaa tgg ctg gga gtc ata tgg cct ggt gga ggc aca aat      242
Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn
          65           70           75

ttt aat tcg gct ctc atg tcc aga ctg acc atc agc gaa gac acc tcc      290
Phe Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser
          80           85           90

aag aac caa gtt tcc tta aaa ttg agc tct gtc aca gct gct gac aca      338
Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
          95           100           105

gcc gta tat tat tgt gcc aga gat cgg gcg tat ggt aac tac ctc tat      386
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Leu Tyr
          110           115           120

gcg atg gac tac tgg ggt caa gga acc tta gtc acc gtc tcc tca      431
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          130           135           140

ggtaagaatg gccctctaga      450

<210> 7
<211> 140

```

WO 02/47721

PCT/US01/47955

<212> PRT
 <213> hybrid

<400> 7

Met Ala Val Leu Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Leu Tyr Ala Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 8
 <211> 427
 <212> DNA
 <213> hybrid

<220>
 <221> CDS
 <222> (12)..(404)
 <223>

<400> 8
 tctagaccac c atg gag tca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctc 50
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu
 1 5 10

WO 02/47721

PCT/US01/47955

tgg gtt cca ggc tcc act ggt'gac att cag atg acc caa tct cca tct 98
 Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 15 20 25

tct ttg tct gcg tct gtg ggg gac agg gtc acc atc aca tgc aga gcc 146
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
 30 35 40 45

agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa 194
 Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
 50 55 60

cag aaa cca gga aag gca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac 242
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn
 65 70 75

gta gat tct ggg gtc cct tcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca 290
 Val Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 80 85 90

gac ttc acc ctc acc atc tct' tct ctg cag ccg gag gat att gca acg 338
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr
 95 100 105

tat tac tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc ggg ggg 366
 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
 110 115 120 125

aca aag gtg gaa ata aaa cgtaagtaga cttttgctct aga 427
 Thr Lys Val Glu Ile Lys
 130

<210> 9
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> hybrid

<400> 9
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45

Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser

WO 02/47721

PCT/US01/47955

```

65          70          75          80
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
      85          90
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
      100        105        110
Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
      115        120        125
Glu Ile Lys
      130
<210> 10
<211> 445
<212> DNA
<213> hybrid
<220>
<221> CDS
<222> (21)..(419)
<223>
<400> 10
tctagacagt ggggaacaat atg gat tca cag atc cag gtc ctc atg tcc ctg      53
      Met Asp Ser Gln Ile Gln Val Leu Met Ser Leu
      1          5          10
ctc ctc tgg atg tct ggt gcc tgt gga gat att gtg atg acc cag tct      101
Leu Leu Trp Met Ser Gly Ala Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
      15          20          25
cca tat tcc ctg gct gtg tca gca gga gag aag gtc acc atg agt tgc      149
Pro Tyr Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
      30          35          40
agg tcc agt cag agc ctc tat tac agt gga atc aaa aag aac ctc ttg      197
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser Gly Ile Lys Lys Asn Leu Leu
      45          50          55
gcc tgg tac cag cag aaa cca ggc cag tct ccg aaa ctg ctg atc tac      245
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
      60          65          70          75
ttt aca tct act cgg tta cct ggg gta ccg gat cgc ttc aca ggc agt      293
Phe Thr Ser Thr Arg Leu Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
      80          85          90
gga tct ggg aca gat tac act ctc acc atc acc agt gtc cag gct gaa      341
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu

```

WO 02/47721

PCT/US01/47955

```

          95          100          105
gac atg ggg cat tat ttc tgt cag cag ggt ata agc act ccg ctc acg   389
Asp Met Gly His Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ile Ser Thr Pro Leu Thr
      110          115          120

ttc ggt gat ggc acc aag ctg gag ata aga cgtaagtaga atccaaagtc   439
Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
      125          130

tctaga   445

<210> 11
<211> 133
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 11
Met Asp Ser Gln Ile Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Met Ser
1          5          10          15

Gly Ala Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Tyr Ser Leu Ala
20          25          30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35          40          45

Leu Tyr Tyr Ser Gly Ile Lys Lys Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50          55          60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Thr Arg
65          70          75          80

Leu Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85          90          95

Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Met Gly His Tyr
100         105         110

Phe Cys Gln Gln Gly Ile Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr
115         120         125

Lys Leu Glu Ile Arg
130

<210> 12

```

WO 02/47721

PCT/US01/47955

```

<211> 467
<212> DNA
<213> hybrid

<220>
<221> CDS
<222> (16)..(444)
<223>

<400> 12
tctagagtct tcacc atg gta tgg ggc ttg atc atc atc ttc ctg gtc aca      51
          Met Val Trp Gly Leu Ile Ile Ile Phe Leu Val Thr
          1          5          10

gca gct aca ggt gtc cac tcc cag gtc cag ttg aag cag tct ggg gct      99
Ala Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala
  15          20          25

gag ctt gtg aag cct gga gcc tca gtg aag ata tcc tgc aaa act tca      147
Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser
  30          35          40

ggc tat acc ttc act gat ggc tac atg aac tgg gtt gag cag aag cct      195
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Gly Tyr Met Asn Trp Val Glu Gln Lys Pro
  45          50          55          60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga aga att gat cct gat agt ggt aat      243
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asn
  65          70          75

act cgg tac aat cag aaa ttc cag ggc aag gcc aca ctg act aga gac      291
Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp
  80          85          90

aaa tcc tcc agc aca gtc tac atg gac ctc agg agc ctg aca tct gag      339
Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu
  95          100          105

gac tct gct gtc tat tac tgt gcg aga gat ggg acc ttc tac ggt acc      387
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Thr Phe Tyr Gly Thr
  110          115          120

tac ggc tac tgg tac ttc gat ttc tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc      435
Tyr Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
  125          130          135          140

gtc tcc tca ggtgagtcct taaaaacctct aga      467
Val Ser Ser

<210> 13
<211> 143
<212> FRT
<213> hybrid

```

WO 02/47721

PCT/US01/47955

<400> 13

Met Val Trp Gly Leu Ile Ile Ile Phe Leu Val Thr Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Gly Tyr Met Asn Trp Val Glu Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Val Tyr Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Thr Phe Tyr Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp
 115 120 125

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 14

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 14

tataagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc

46

<210> 15

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA

WO 02/47721

PCT/US01/47955

<400> 15
tatagagctc aagcttcag tggatagacc gatggggctg tegttttggc 50

<210> 16
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 16
tatagagctc aagcttcag tggatagaca gatggggctg ttgttttggc 50

<210> 17
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 17
tatagagctc aagcttcag tggatagacc gtggggctg tegttttggc 50

<210> 18
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 18
tatagagctc aagcttcag tggatagacc gatggggctg tegttttggc 50

<210> 19
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 19
tatagagctc aagcttcag tggatagacc gatggggctg ttgttttggc 50

<210> 20
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 02/47721

PCT/US01/47955

<220>
<223> synthetic DNA
<400> 20
tatagagctc aagcttccag tggatagtcc gatggggctg tegttttggc 50

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic DNA
<400> 21
tatagagctc cacttccagt gcc 24

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/47855
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 89/395; C07K 18/28; C12N 5/10, 15/00, 15/12, 15/13 US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet. Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Genseq, GenEMBL, West, Dialog, Biosis, Embase, CA, Medline SEQ ID NOS: 1-8, tn288, cd28, antibody?, toleran?, inhibit?, suppress?, anorg?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,580,756 A (LINSLEY ET AL.) 03 December 1996, seen entire document, including columns 10-11, overlapping paragraph).	1-3, 8, 10-15, 17-24
Y	TAN et al., "Humanization of an Anti-CD28 Antibody Using Germline Human Antibody Sequences", Blood Vol. 96, no. 11 Part 1, 16 November 2000, page 31A, see Abstract # 122.	1-3, 8, 10-15, 17-24
Y	KRUMMEL et al., "Superantigen Responses and Co-Stimulation: CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on T Cell Expansion In Vitro and In Vivo", International Immunology, Vol. 8, No. 4, 1996, pages 519-523, see entire document.	1-3, 8, 10-15, 17-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 MARCH 2002		Date of mailing of the international search report 08 APR 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 805-8230		Authorized officer PHILLIP GAMBEL Telephone No. (703) 808-0196
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/47966

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

484/150.1, 153.1, 141.1, 145.1, 149.1, 151.1, 154.1, 173.1; 455/68.0, 252., 320.1, 455; 630/387.1, 387.3, 388.1, 388.9,
388.25, 388.7, 388.73, 388.75; 536/25.1, 25.2, 25.53

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched
Classification System: U.S.

484/150.1, 153.1, 141.1, 145.1, 149.1, 151.1, 154.1, 173.1; 455/68.0, 252., 320.1, 455; 630/387.1, 387.3, 388.1, 388.9,
388.25, 388.7, 388.73, 388.75; 536/25.1, 25.2, 25.53

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 41/00	A 6 1 P 37/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 16/28	A 6 1 P 41/00	
C 0 7 K 16/46	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 1/21	
	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 バスケス・マクシミリアノ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 パロ・アルト ルイス・ロード 3 8 1 3 番地

(72) 発明者 田村 康一

大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内

(72) 発明者 東 康之

大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内

(72) 発明者 関 信男

大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内

(72) 発明者 上田 博嗣

大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA04 CA07 DA02 EA04 GA11

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA92Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA25 CA44

4C084 AA19 MA02 NA14 ZB022 ZB081 ZB082 ZC412 ZC751

4C085 AA13 AA14 AA16 BB17 BB18 CC02 CC03 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA22 FA72 FA74

专利名称(译)	沉默的抗CD28抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2004515243A	公开(公告)日	2004-05-27
申请号	JP2002549291	申请日	2001-12-14
申请(专利权)人(译)	藤泽制药有限公司		
[标]发明人	ツオージェイヤン ヒントンポール バスキスマクシミリアノ 田村康一 東康之 関信男 上田博嗣		
发明人	ツオー・ジェイ・ヤン ヒントン・ポール バスキス・マクシミリアノ 田村 康一 東 康之 関 信男 上田 博嗣		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P41/00 A61P43/00 C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P37/00 A61P37/06 A61P41/00 A61P43/00 C07K16/2818 C07K2317/24 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.G A61K39/395.J A61K39/395.U A61K45/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P41/00 A61P43/00.121 C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA92Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB022 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZC412 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085/CC02 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/255155 2000-12-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了有丝分裂活性有缺陷的抗CD28抗体（沉默的抗CD28抗体），生产方法，包含该抗体的组合物和免疫抑制，诱导T细胞耐受性以及治疗器官和/或组织移植排斥的方法。

(51) Int. Cl. ⁷		F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395	G	4 B O 6 4
A 6 1 K	45/00	A 6 1 K	39/395	J	4 B O 6 5
A 6 1 P	37/00	A 6 1 K	39/395	U	4 C O 8 4
A 6 1 P	37/06	A 6 1 K	45/00		4 C O 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	有 (全 134 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2002-549291 (P2002-549291)	(71) 出願人	000005245 勝沢薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号		
(86) (22) 出願日	平成13年12月14日 (2001.12.14)	(74) 代理人	100109542 弁理士 田伏 英治		
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月13日 (2003.6.13)	(72) 発明者	ツォー・ジェイ・ヤン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 2 5 メンロ・パーク オーク・ブロー ブアベニュー # 1 6 4 4 5 番地		
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/047955	(72) 発明者	ヒントン・ポール アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 5 サニーバール ダンスミュー テ ル # 4 3 2 1 番地		
(87) 国際公開番号	W02002/047721				
(87) 国際公開日	平成14年6月20日 (2002.6.20)				
(31) 優先権主張番号	60/255,155				
(32) 優先日	平成12年12月14日 (2000.12.14)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
最終頁に続く					