(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2010-513529
(P2010-513529A)
(43)公表日　平成22年4月30日(2010.4.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24	ZNA	4B024
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4B064
A61P 29/00	(2006.01)	A61K	39/395	N	4C085
A61P 19/02	(2006.01)	A61P	29/00	101	4H045
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	19/02		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 135 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-542947 (P2009-542947)
(86)(22)出願日　平成19年12月21日 (2007.12.21)
(85)翻訳文提出日　平成21年8月10日 (2009.8.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/026212
(87)国際公開番号　WO2008/079359
(87)国際公開日　平成20年7月3日 (2008.7.3)
(31)優先権主張番号　11/645,287
(32)優先日　平成18年12月22日 (2006.12.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　502104228
アボット　ゲーエムベーハー　ウント　カンパニー　カーゲー
ドイツ連邦共和国　６５２０５　ヴィースバーデン、マックス－プランク－リング　２
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(74)代理人　100119253
弁理士　金山　賢教

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトＩＬ－１２を結合するヒト抗体及び製造方法

(57)【要約】
ヒトインターロイキン－１２（ｈＩＬ－１２）に特異的に結合するヒト抗体、好ましくは組換えヒト抗体が開示されている。好ましい抗体は、ｈＩＬ－１２に対して高い親和性を有し、インビトロ及びインビボにおいてｈＩＬ－１２活性を中和する。本発明の抗体は、完全長抗体又はその抗原結合部分であり得る。本発明の抗体又は抗体の一部は、例えばｈＩＬ－１２活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象中において、ｈＩＬ－１２を検出し、ｈＩＬ－１２活性を阻害するのに有用である。本発明の組換えヒト抗体を発現するための核酸、ベクター及び宿主細胞並びに組換えヒト抗体を合成するための方法も、本発明によって包含される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合することができ、及びＩＬ－１２の前記ｐ４０サブユニットの立体構造を変化させることができる単離された抗体又はその抗原結合部分。
【請求項２】
表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、1×10^{-10}Ｍ若しくはそれ以下のK_dで、又は$1\times10^{-3}s^{-1}$若しくはそれ以下のk_{off}速度定数で、ヒトＩＬ－１２のｐ４０サブユニットから解離する、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合部分。
【請求項３】
中和抗体である、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合部分。
【請求項４】
インビトロＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球増殖を阻害し、又は1×10^{-10}Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でヒトＩＦＮγ産生を阻害する、請求項３に記載の単離された抗体又はその抗原結合部分。
【請求項５】
ヒト抗体である、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合部分。
【請求項６】
請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分と及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項７】
ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットが検出されるように、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットを請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分と接触させることと含む、インターロイキンのｐ４０サブユニットを検出する方法。
【請求項８】
インターロイキンのｐ４０サブユニットが検出されるように、インターロイキンのｐ４０サブユニットを請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分と接触させることとを含む、インターロイキンのｐ４０サブユニットを検出する方法。
【請求項９】
インターロイキンのｐ４０サブユニットがインビトロで検出される、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
インターロイキンのｐ４０サブユニットが診断用の生物試料中において検出される、請求項７に記載の方法。
【請求項１１】
ｐ４０サブユニットを含むインターロイキンの活性が阻害されるように、請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分と前記インターロイキンを接触させることを含む、前記活性を阻害する方法。
【請求項１２】
ヒト対象中のｐ４０サブユニットを含むインターロイキンの活性が阻害されるように、前記活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象に請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分を投与することを含む、前記活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象中のｐ４０サブユニットを含むインターロイキンの活性を阻害する方法。
【請求項１３】
前記インターロイキンがＩＬ－１２である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
前記インターロイキンがｐ４０サブユニット及びｐ１９サブユニットを含む、請求項１１に記載の方法。

【請求項１５】
前記インターロイキンがＩＬ－２３である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
疾患が、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症（ｄｅｒｍａｔｉｔｉｓｓｃｌｅｒｏｄｅｒｍａ）、甲状腺炎、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に伴う急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、結節性多発動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的脈管炎、慢性活動性肝炎、シェーグレン症候群、ぶどう膜炎、敗血症、敗血性ショック、敗血症症候群、成人呼吸促迫症候群、悪液質、感染性疾患、寄生虫症、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、重症筋無力症、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、線維性肺疾患、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全及び心筋梗塞からなる群から選択される、請求項１２に記載の方法。
【請求項１７】
疾患が乾癬である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１８】
疾患が関節リウマチである、請求項１２に記載の方法。
【請求項１９】
ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるのに有効な量の、前記サブユニットに結合することができ及び前記サブユニットの立体構造を変変化させることができる抗体又はその抗原結合断片を、前記サブユニットと接触させ、これにより、前記サブユニットの立体構造を変化させることを含む、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させる方法。
【請求項２０】
ｐ４０サブユニットを含むインターロイキンの立体構造を変化させるのに有効な量の、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合することができ及び前記インターロイキンの立体構造を変化させることができる抗体又はその抗原結合断片を、前記インターロイキンと接触させ、これにより、前記インターロイキンの活性を阻害することを含む、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキンの活性を阻害する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、２０００年３月２４日に出願された米国特許出願第０９／５３４，７１７号（２００５年７月５日に米国特許第６，９１４，１２８号として発行され、１９９９年３月２５日に出願された米国仮特許出願第６０／１２６，６０３号の優先権を主張する。）の一部継続出願である２００６年１２月２２日に出願された米国特許出願第１１／６４５，２８７号の優先権を主張する。先述の出願の内容全体が、参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
ヒトインターロイキン１２（ＩＬ－１２）は、特有の構造及び多面的な効果を有するサイトカインとして最近特徴付けられた（Ｋｏｂａｙａｓｈｉ，ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｊ．Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１７０：８２７－８４５；Ｓｅｄｅｒ，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９０：１０１８８－１０１９２；Ｌｉｎｇ，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｊ． Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１５４：１１６－１２７；Ｐｏｄｌａｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２９４：

２３０－２３７）。ＩＬ－１２は、免疫性応答及び炎症性応答を伴う幾つかの疾患と関連する病変において重要な役割を果たしている。ＩＬ－１２、その生物活性及び疾病におけるその役割の総説は、Ｇａｔｅｌｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６：４９５－５２１に見出すことができる。

【０００３】

構造的には、ＩＬ－１２は、ジスルフィド架橋によって相互に結合した３５ｋＤａサブユニット（ｐ３５）及び４０ｋＤａサブユニット（ｐ４０）を含むヘテロ二量体タンパク質（「ｐ７０サブユニット」と称される）である。ヘテロ二量体タンパク質は、主として、単球、マクロファージ及び樹状細胞などの抗原提示細胞によって産生される。これらの細胞種は、ｐ７０サブユニットに比べて、ｐ４０サブユニットの過剰も分泌する。ｐ４０及びｐ３５サブユニットは遺伝的には無関係であり、何れも生物活性を持たないことが報告されているが、ｐ４０ホモ二量体はＩＬ－１２アンタゴニストとして機能し得る。

【０００４】

機能的には、ＩＬ－１２は、抗原特異的Ｔヘルパー１型（Ｔｈ１）及び２型（Ｔｈ２）リンパ球の間のバランスを制御する上で中心的な役割を果たしている。Ｔｈ１及びＴｈ２細胞は、自己免疫疾患の開始及び進行を支配しており、ＩＬ－１２はＴｈ１－リンパ球の分化及び成熟の制御に極めて重要である。Ｔｈ１細胞によって放出されるサイトカインは炎症性であり、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、ＩＬ－２及びリンホトキシン（ＬＴ）が含まれる。Ｔｈ２細胞は、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０及びＩＬ－１３を分泌し、液性免疫、アレルギー性反応及び免疫抑制を助長する。

【０００５】

自己免疫性疾患においてＴｈ１応答が優勢であること及びＩＦＮγの炎症促進活性と合致して、ＩＬ－１２は関節リウマチ（ＲＡ）、多発性硬化症（ＭＳ）及びクローン病などの多くの自己免疫性疾患及び炎症性疾患と関連する病理に大きな役割を果たし得る。

【０００６】

ＭＳを有するヒト患者は、急性ＭＳプラーク中のｐ４０ｍＲＮＡ濃度によって報告されているように、ＩＬ－１２発現の増加を示した。（Ｗｉｎｄｈａｇｅｎ　ｅｔ　ａｌ，（１９９５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８２：１９８５－１９９６）。さらに、ＭＳ患者から得たＣＤ４０Ｌ発現Ｔ細胞で抗原提示細胞のエキソビボ刺激すると、対照Ｔ細胞と比べて、増加したＩＬ－１２産生をもたらし、ＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ相互作用がＩＬ－１２の強力な誘導物質であるという見解と一致した。

【０００７】

健康な対照と比べて、ＲＡ患者の滑液中にＩＬ－１２ｐ７０の増加した濃度が検出されている（Ｍｏｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ（１９９８）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　ａｎｄ　Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ．４１：３０６－３１４）。ＲＡ滑液中のサイトカインメッセンジャーリボ核酸（ｍＲＮＡ）発現の特徴は、主としてＴｈ１サイトカインであることがわかった。（Ｂｕｃｈｔ　ｅｔ　ａｌ，（１９９６）Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０３：３４７－３６７）。ＩＬ－１２は、クローン病（ＣＤ）を伴う病理においても重大な役割を果たしているようである。ＩＮＦγ及びＩＬ－１２の増加した発現は、この疾病を有する患者の腸粘膜中に観察されている（Ｆａｉｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｊ．ＩｎｔｅｒｆｅｒｏｎＲｅｓ．１４：２３５－２３８；Ｐａｒｒｏｎｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ，（１９９７）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．１５０：８２３－８３２；Ｍｏｎｔｅｌｅｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ，（１９９７）Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ．１１２：１１６９－１１７８，ａｎｄ　Ｂｅｒｒｅｂｉ　ｅｔ　ａｌ，（１９９８）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ１５２：６６７－６７２）。ＣＤ患者の固有板由来のＴ細胞のサイトカイン分泌特性は、大幅に増加したＩＦＮγ濃度など、主としてＴｈ１応答の特徴を示す（Ｆｕｓｓ，ｅｔ　ａｌ，（１９９６）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：１２６１－１２７０）。さらに、ＣＤ患者に由来する大腸組織切片は、大量のＩＬ－１２発現マクロファージ及びＩＦＮγ発現Ｔ細胞を示す（Ｐａｒｒｏｎｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ（１９９７）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．１５０：８２３－８３２）。

【０００８】
様々なヒト疾患におけるヒトＩＬ－１２の役割により、ＩＬ－１２活性を阻害し、又は抑制するように治療戦略が設計されてきた。特に、ＩＬ－１２に結合し、これを中和する抗体が、ＩＬ－１２活性を阻害するための手段として求められてきた。最も初期の抗体の幾つかは、ＩＬ－１２で免疫されたマウスのリンパ球から調製されたハイブリドーマによって分泌されるマウスモノクローナル抗体（ｍＡｂ）であった（例えば、Ｓｔｒｏｂｅｒ他によるＷＯ９７／１５３２７；Ｎｅｕｒａｔｈ ｅｔ ａｌ（１９９５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８２：１２８１－１２９０；Ｄｕｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２６：９３４－９３８参照）。短い血清半減期、ある種のヒトエフェクター機能の引き金を引けないこと、及びヒト中のマウス抗体に対する望ましくない免疫応答の惹起（「ヒト抗マウス抗体」（ＨＡＭＡ）反応）など、マウス抗体のヒトへの投与に伴う問題のために、これらのマウスＩＬ－１２抗体のインビボでの使用は限定される。

【０００９】
一般に、ヒトにおける完全マウス抗体の使用に伴う問題を克服するための試みには、抗体をより「ヒト様」に遺伝子操作することが含まれる。例えば、抗体鎖の可変領域がマウスに由来し、抗体鎖の定常領域がヒトに由来するキメラ抗体が調製されてきた（Ｊｕｎｇｈａｎｓ，ｅｔ ａｌ（１９９０）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５０：１４９５－１５０２；Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８８：２６６３－２６６７；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．４：７７３－７８３）。しかしながら、これらのキメラ抗体及びヒト化抗体は、幾つかのマウス配列をなお保持しているので、とりわけ、長期間にわたって投与されたときに、望ましくない免疫反応（ヒト抗キメラ抗体（ＨＡＣＡ）反応）をなお惹起し得る。

【００１０】
完全なヒト抗ＩＬ－１２抗体は、期間にわたって使用した場合でさえ、ＨＡＭＡ反応を惹起するはずはないので、マウス抗体又はその誘導体（例えば、キメラ抗体又はヒト化抗体）に比べて好ましいＩＬ－１２阻害剤は、完全なヒト抗ＩＬ－１２抗体である。しかしながら、このような抗体は本分野において記載されておらず、従って、なお必要とされている。

【先行技術文献】
【特許文献】
【００１１】
【特許文献１】国際公開第９７／１５３２７号
【非特許文献】
【００１２】
【非特許文献１】Ｋｏｂａｙａｓｈｉら、Ｊ．ＥｘｐＭｅｄ．１７０、１９８９年、ｐｐ．８２７－８４５
【非特許文献２】Ｓｅｄｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９０、１９９３年、ｐｐ．１０１８８－１０１９２
【非特許文献３】Ｌｉｎｇら、Ｊ． Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１５４、１９９５年、ｐｐ．１１６－１２７
【非特許文献４】Ｐｏｄｌａｓｋｉら、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２９４、１９９２年、ｐｐ．２３０－２３７
【非特許文献５】Ｇａｔｅｌｙら、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６、１９９８年、ｐｐ．４９５－５２１
【非特許文献６】Ｗｉｎｄｈａｇｅｎら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８２、１９９５年、ｐｐ．１９８５－１９９６
【非特許文献７】Ｍｏｒｉｔａら、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ａｎｄ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ．４１、１９９８年、ｐｐ．３０６－３１４
【非特許文献８】Ｂｕｃｈｔら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０３、１９９６

年、ｐｐ．３４７－３６７
【非特許文献９】Ｆａｉｓら、Ｊ．ＩｎｔｅｒｆｅｒｏｎＲｅｓ．１４、１９９４年、ｐｐ．２３５－２３８
【非特許文献１０】Ｐａｒｒｏｎｃｈｉら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．１５０、１９９７年、ｐｐ．８２３－８３２
【非特許文献１１】Ｍｏｎｔｅｌｅｏｎｅら、Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ．１１２、１９９７年、ｐｐ．１１６９－１１７８
【非特許文献１２】Ｂｅｒｒｅｂｉら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ１５２、１９９８年、ｐｐ．６６７－６７２
【非特許文献１３】Ｆｕｓｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７、１９９６年、ｐｐ．１２６１－１２７０
【非特許文献１４】Ｐａｒｒｏｎｃｈｉら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．１５０、１９９７年、ｐｐ．８２３－８３２
【非特許文献１５】Ｎｅｕｒａｔｈら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８２、１９９５年、ｐｐ．１２８１－１２９０
【非特許文献１６】Ｄｕｃｈｍａｎｎら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２６、１９９６年、ｐｐ．９３４－９３８
【非特許文献１７】Ｊｕｎｇｈａｎｓら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５０、１９９０年、ｐｐ．１４９５－１５０２
【非特許文献１８】Ｂｒｏｗｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８８、１９９１年、ｐｐ．２６６３－２６６７
【非特許文献１９】Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．４、１９９１年、ｐｐ．７７３－７８３

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１３】
本発明は、ヒトＩＬ－１２を結合するヒト抗体を提供する。本発明は、本発明のヒト抗ＩＬ－１２抗体を用いて、その病理がＩＬ－１２と関与する急性又は慢性の疾病又は症状を治療又は予防することにも関する。
【課題を解決するための手段】
【００１４】
一態様において、本発明は、ヒトＩＬ－１２に結合する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。
【００１５】
一実施形態において、本発明は、ヒトＩＬ－１２に結合するように、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置において、活性増強アミノ酸残基で選択的に変異されたヒト抗体又はその抗原結合部分を含む、選択的に変異されたヒトＩＬ－１２抗体を提供する。
【００１６】
好ましい実施形態において、本発明は、ヒトＩＬ－１２に結合するように、好ましい選択的突然変異誘発位置において、活性増強アミノ酸残基で選択的に変異されたヒト抗体又はその抗原結合部分を含む、選択的に変異されたヒトＩＬ－１２抗体を提供する。
【００１７】
別の好ましい実施形態において、選択的に変異されたヒトＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分は、２以上の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置において、活性増強アミノ酸残基で選択的に変異される。別の好ましい実施形態において、選択的に変異されたヒトＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分は、３以下の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置において選択的に変異される。別の好ましい実施形態において、選択的に変異されたヒトＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分は、２以下の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置において選択的に変異さ

れる。さらに別の好ましい実施形態において、目標の特異性親和性濃度が達成され、ファージディスプレイ技術を用いて同一の抗原に対する抗体に対して選択した場合に達成可能な目標濃度と比べて前記目標濃度が改善されるように、選択的に変異されたヒトＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分が選択的に変異される。別の好ましい実施形態において、選択的に変異されたヒトＩＬ－１２抗体は、少なくとも１つの望ましい特性又は特徴（例えば、他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、エピトープ認識の保持、生殖系列免疫グロブリン配列と類似する抗体の産生）をさらに保持する。

【００１８】

別の実施形態において、本発明は、ヒトＩＬ－１２に結合し、及び表面プラズモン共鳴によって測定された場合に０．１s^{-1}又はそれ以下のK_{off}速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。より好ましくは、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-2}$$s^{-1}$又はそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-7}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。より好ましくは、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$s^{-3}$$s^{-1}$又はそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-8}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。より好ましくは、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-4}$$s^{-1}$又はそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。より好ましくは、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-5}$$s^{-1}$又はそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-10}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。さらにより好ましくは、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-5}$$s^{-1}$又はそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-11}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。

【００１９】

別の実施形態において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００２０】

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、

ｂ）配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び

ｃ）配列番号２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する。

【００２１】

好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２を有し、及び配列番号４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を有し、及び配列番号６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変ＣＤＲ１を有し、及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ＣＤＲ１を有する。

【００２２】

別の実施形態において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００２３】

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}

でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、
ｂ）配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び
ｃ）配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する。
【００２４】
好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２を有し、及び配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を有し、及び配列番号１４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有し、及び配列番号１６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。
【００２５】
別の実施形態において、本発明は、
ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、
ｂ）配列番号１７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び
ｃ）配列番号１８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する、
単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。
【００２６】
好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＡ及びＩｇＥ定常領域又はＫａｂａｔ他（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２）（参照により、本明細書に含まれる。）に論述されているこれらのあらゆる対立遺伝子変異からなる群から選択される重鎖定常領域を含む。より好ましい実施形態において、抗体重鎖定常領域はＩｇＧ１である。別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体はＦａｂ断片又はＦ（ａｂ’）$_2$断片又は一本鎖Ｆｖ断片である。
【００２７】
別の実施形態において、本発明は、
ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、
ｂ）配列番号４０４から配列番号４６９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び
ｃ）配列番号５３４から配列番号５７９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する
単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。
【００２８】
好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号３３５から配列番号４０３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号５０６から配列番号５３３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２８８から配列番号３３４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重

鎖ＣＤＲ１及び配列番号４７０から配列番号５０５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体は、重鎖定常領域又は上記のようなＦａｂ断片又はＦ（ａｂ’）$_2$断片又は一本鎖Ｆｖ断片を含む。

【００２９】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、

ｂ）配列番号２５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び

ｃ）配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００３０】

好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１及び配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体は、重鎖定常領域又は上記のようなＦａｂ断片又はＦ（ａｂ’）$_2$断片又は一本鎖Ｆｖ断片を含む。

【００３１】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害し、

ｂ）配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１又は接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含み、並びに

ｃ）配列番号２のアミノ酸配列を含む軽い鎖ＣＤＲ３、配列番号４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１又は接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含む、

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００３２】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害し、

ｂ）配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号１３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１又は接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号１３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含み、並びに

ｃ）配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽い鎖ＣＤＲ３、配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号１４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号１４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いｋｏｆｆ速度を有する。）を含む、
単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００３３】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害し、

ｂ）配列番号１７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号１７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含み、並びに

ｃ）配列番号１８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号１８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含む、
単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００３４】

本発明は、本発明の抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸分子も提供する。好ましい単離された核酸は、配列番号１７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３をコードする。単離された核酸は、抗体重鎖可変領域をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号１９のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域のＣＤＲ２をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２１のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域のＣＤＲ１をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２３のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号１８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３をコードする。単離された核酸は、抗体軽鎖可変領域をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２０のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域のＣＤＲ２をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２２のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域のＣＤＲ１をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２４のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする。

【００３５】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害し、

ｂ）配列番号２５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号２５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２９のアミノ酸

配列を含む重鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いｋ$_{off}$速度を有する。）を含み、並びに

ｃ）配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いｋ$_{off}$速度を有する。）を含む、

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００３６】

好ましい単離された核酸は、配列番号２５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３をコードする。単離された核酸は、抗体重鎖可変領域をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２７のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域のＣＤＲ２をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２９のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域のＣＤＲ１をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号３１のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３をコードする。単離された核酸は、抗体軽鎖可変領域をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号２８のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域のＣＤＲ２をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号３０のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域のＣＤＲ１をコードする。別の実施形態において、単離された核酸は配列番号３２のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする。

【００３７】

別の態様において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００３８】

ａ）ヒトＩＬ－１２に結合し、及び表面プラズモン共鳴によって測定した場合に０．１ｓ$^{-1}$又はそれ以下のＫ$_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。

【００３９】

ｂ）Ｖ$_{H}$３生殖系列ファミリーの一員から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（該重鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高突然変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

【００４０】

ｃ）Ｖ$_{\lambda}$１生殖系列ファミリーの一員から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（該軽鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置又は高突然変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

【００４１】

別の実施形態において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００４２】

ａ）ヒトＩＬ－１２に結合し、及び表面プラズモン共鳴によって測定した場合に０．１ｓ$^{-1}$又はそれ以下のＫ$_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。

【００４３】

ｂ）配列番号５９５から６６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（該重鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置又は高突然変異位

置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。
【００４４】
ｃ）配列番号６６９から６７５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（該軽鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置又は高突然変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。
【００４５】
別の実施形態において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。
【００４６】
ａ）ヒトＩＬ－１２に結合し、及び表面プラズモン共鳴によって測定した場合に０．１ｓ$^{-1}$又はそれ以下のK_{off}速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。
【００４７】
ｂ）ＣＯＳ－３生殖系列アミノ酸配列を含む重鎖可変領域（該重鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高突然変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。
【００４８】
ｃ）ＤＰＬ８生殖系列アミノ酸配列を含む軽い鎖可変領域（該軽鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高突然変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。
【００４９】
別の実施形態において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。
【００５０】
ａ）ヒトＩＬ－１２に結合し、及び表面プラズモン共鳴によって測定した場合に０．１ｓ$^{-1}$又はそれ以下のK_{off}速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。
【００５１】
ｂ）V_H３生殖系列ファミリーの一員から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（前記重鎖可変領域は、他のV_H３生殖系列ファミリーの一員から得られるＣＤＲ２と構造的に類似するＣＤＲ２及び他のV_H３生殖系列ファミリーの一員から得られるＣＤＲ１と構造的に類似するＣＤＲ１を含み、並びに前記重鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。
【００５２】
ｃ）V_λ１生殖系列ファミリーの一員から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（前記軽鎖可変領域は、他のV_λ１生殖系列ファミリーの一員から得られるＣＤＲ２と構造的に類似するＣＤＲ２及び他のV_λ１生殖系列ファミリーの一員から得られるＣＤＲ１と構造的に類似するＣＤＲ１を含み、並びに前記軽鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。
【００５３】
好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は重鎖ＣＤＲ３中に変異を有する。別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は軽鎖ＣＤＲ３中に変異を有する。別の実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は重鎖ＣＤＲ２中に変異を有する。別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は軽鎖ＣＤＲ２中に変異を有する。別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は重鎖ＣＤＲ１中に変異

を有する。別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は軽鎖ＣＤＲ１中に変異を有する。

【００５４】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体をコードする核酸を担持する組換え発現ベクターを提供し、このようなベクターがその中に導入されている宿主細胞、本発明の宿主細胞を培養することによって本発明の抗体を作製する方法も本発明によって包含される。

【００５５】

別の態様において、本発明は、ヒトＩＬ－１２並びにヒヒＩＬ－１２、マーモセットＩＬ－１２、チンパンジーＩＬ－１２、カニクザルＩＬ－１２及びアカゲザルＩＬ－１２からなる群から選択される少なくとも１つのさらなる霊長類ＩＬ－１２の活性を中和するが、マウスＩＬ－１２の活性を中和しない単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【００５６】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体又はその抗原結合部分及び医薬として許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【００５７】

別の態様において、本発明は、前記抗体又はその抗原結合部分及びさらなる薬剤、例えば治療剤含む組成物を提供する。

【００５８】

別の態様において、本発明は、ヒトＩＬ－１２活性が阻害されるように、ヒトＩＬ－１２を本発明の抗体、例えばＪ６９５と接触させることを含む、ヒトＩＬ－１２活性を阻害する方法を提供する。

【００５９】

別の態様において、本発明は、ＩＬ－１２活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象に、ヒト対象中のヒトＩＬ－１２活性が阻害されるように、本発明の抗体、例えばＪ６９５を投与することを含む、ＩＬ－１２活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象中のヒトＩＬ－１２活性を阻害する方法を提供する。疾患は、例えば、クローン病、多発性硬化症又は関節リウマチであり得る。

【００６０】

別の態様において、本発明は、

ａ）親抗体、その抗原結合部分を準備すること；

ｂ）Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から選択される好ましい選択的突然変異誘発位置を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の第一の群を作製するために、選択された好ましい選択的突然変異誘発位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；

ｄ）単一の選択的突然変異誘発位置の変異が所定の目標活性又は部分的目標活性を有する抗体又はその抗原結合部分を与えるかどうかを決定するために、変異された抗体又はその抗原結合部分の第一の群の活性を評価すること；

ｅ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された各変異を、段階的に、親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；

ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分が所定の目標活性又は部分的目標活性を有するかどうかを決定するために、組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること；

ｇ）段階ｄ）又はｆ）が所定の目標活性を有する抗体若しくはその抗原結合部分をもたらさず、部分活性を有するに過ぎない抗体をもたらした場合には、変異された抗体又はその抗原結合部分の第二の群を作製するために、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、９８、Ｌ３０Ａ及びＬ９６からなる群から選択されるさらなるアミノ

酸残基を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ変異させること、
ｈ）Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、９８、Ｌ３０Ａ及びＬ９６からなる群から選択される単一のアミノ酸残基の変異が所定の目標活性又は部分活性を有する抗体又はその抗原結合部分をもたらすかどうかを決定するために、変異された抗体又はその抗原結合部分の第二の群の活性を評価すること；
ｉ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された段階ｇ）の各変異を、段階的に、親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；
ｊ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分が所定の目標活性又は部分的目標活性を有するかどうかを決定するために、組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること；
ｋ）段階ｈ）又はｊ）が所定の目標活性を有する抗体若しくはその抗原結合部分をもたらさず、部分活性を有するに過ぎない抗体をもたらした場合には、変異された抗体又はその抗原結合部分の第三の群を作製するために、Ｈ３３Ｂ、Ｈ５２Ｂ及びＬ３１Ａからなる群から選択されるさらなるアミノ酸残基を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ変異させること、
ｌ）Ｈ３３Ｂ、Ｈ５２Ｂ及びＬ３１Ａからなる群から選択される単一のアミノ酸残基変異が所定の目標活性又は部分活性を有する抗体又はその抗原結合部分をもたらすかどうかを決定するために、変異された抗体又はその抗原結合部分の第三の群の活性を評価すること；
ｍ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された段階ｋ）の各変異を、段階的に、親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；
ｎ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分が所定の目標活性又は部分的目標活性を有するかどうかを決定するために、組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価し、これにより、所定の目標活性を有する抗体又はその抗原結合部分を作製すること、
を含む、所定の目標活性を達成するために、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を特徴とする。

【００６１】

別の態様において、本発明は、
ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を特定すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価すること；
ｅ）少なくとも１つの他の接触又は高頻度変異位置に対して、段階ｂ）からｄ）を反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された各変異を親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善させる方法を提供する。

【００６２】

一実施形態において、本発明は、
ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディス

プレイ系中での突然変異誘発によって、その活性がさらに改善されていない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された接触又は高頻度変異位置を特定すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価すること；
ｅ）少なくとも１つの他の接触又は高頻度変異位置に対して、段階ｂ）からｄ）を反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された各変異を親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００６３】

好ましい実施形態において、接触位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択される。別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択される。さらに好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択される。より好ましい実施形態において、接触位置は、Ｌ５０及びＬ９４からなる群から選択される。

【００６４】

別の実施形態において、本発明は、
ａ）組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された接触又は高頻度変異位置を特定すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び適切な発現系中で前記パネルを発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴（該特性又は特徴は、保持される必要がある特性又は特徴である。）に関して、親抗体又はその抗原結合部分に対して変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００６５】

好ましい実施形態において、接触位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、

Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉活性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。より好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択され、並びに他の特徴が１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。より好ましい実施形態において、接触位置はＬ５０及びＬ９４からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【００６６】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を特定すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴（該特性又は特徴は保持される必要がある特性又は特徴である。）に関して、親抗体又はその抗原結合部分に対して変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、

ｆ）少なくとも１つの他の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して、段階ａ）からｅ）を反復すること；

ｇ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有することが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；並びに

ｈ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００６７】

好ましい実施形態において、接触位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置がＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。より好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３，Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択され、並びに他の特徴が１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。より好ましい実施形態において、接触位置はＬ５０及びＬ９４からなる群から選択され、及び他の特徴は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【００６８】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された接触又は高頻度変異位置を特定すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴（該特性又は特徴は保持される必要がある特性又は特徴である。）に関して、親抗体又はその抗原結合部分に対して変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００６９】
好ましい実施形態において、接触位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択され、及び他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。より好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。より好ましい実施形態において、接触位置はＬ５０及びＬ９４からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【００７０】
別の実施形態において、本発明は、
ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を特定すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴（該特性又は特徴は保持される必要がある特性又は特徴である。）に関して、親抗体又はその抗原結合部分に対して変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、
ｆ）少なくとも１つの他の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して、工程ａ）からｅ）を反復すること；
ｇ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性及び少な

くとも１つの保持された他の特徴を有することが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；並びに
ｈ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００７１】

好ましい実施形態において、接触位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。より好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。より好ましい実施形態において、接触位置はＬ５０及びＬ９４からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【００７２】

別の実施形態において、本発明は、
ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｈ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、

を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００７３】

好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【００７４】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）ｂ）の下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６の位置でもない少なくとも１つの他のＣＤＲ位置に対して、段階ｂ）からｄ）を反復すること；

ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；並びに

ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、

を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００７５】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、

を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００７６】
好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。
【００７７】
別の実施形態において、本発明は、
ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）ｂ）の下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４の位置でもないＣＤＲ内の少なくとも１つの他の位置に対して、段階ｂ）からｄ）を反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性及び他の特性又は特徴を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。
【００７８】
好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。
【００７９】
別の実施形態において、本発明は、
ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合

部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原部分に対して変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること；
ｆ）ｂ）の下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６の位置でもない少なくとも１つの他のＣＤＲ位置に対して、段階ｂ）からｅ）を反復すること；
ｇ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有し及び少なくとも１つの他の特性又は特徴に影響を与えないことが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに
ｈ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性及び少なくとも１つの他の特徴又は特性の保持を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００８０】

別の実施形態において、本発明は、
ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特徴又は特性の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の親和性を改善する方法を提供する。

【００８１】

別の実施形態において、本発明は、
ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の位置の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること；

ｆ）ｂ）の下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６の位置でもない少なくとも１つの他のＣＤＲ位置に対して、段階ｂ）からｅ）を反復すること；

ｇ）少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有するが、少なくとも１つの他の特性又は特徴には影響を与えないことが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；並びに

ｈ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性及び少なくとも１つの特性又は特徴の保持を評価すること、

を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００８２】

好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【００８３】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び保持された他の特徴又は特性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、

を含む、他の特徴に影響を与えずに、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００８４】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系

中で発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性及び少なくとも１つの他の特徴又は特性の保持を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）ｂの下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６の位置でもない少なくとも１つの他のＣＤＲ位置に対して、段階ｂ）からｄ）を反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有し及び少なくとも１つの他の特徴又は特性に影響を与えないことが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの他の保持された特徴又は特性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性及び少なくとも１つの他の特徴又は特性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【００８５】
好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【００８６】
さらに別の態様において、本発明は、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニット（例えば、ヒトＩＬ－１２のｐ４０サブユニット）に結合することができ及びＩＬ－１２の前記ｐ４０サブユニットの立体構造を変化させることができる単離された抗体（例えば、ヒト抗体）又はその抗原結合部分を提供する。

【００８７】
関連する態様において、本発明は、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニット（例えば、ヒトＩＬ－１２のｐ４０サブユニット）に結合することができ及びインターロイキン、例えば、インターロイキンのｐ４０サブユニットの立体構造を変化させることができる単離された抗体（例えば、ヒト抗体）又はその抗原結合部分を提供する。一実施形態において、インターロイキンはＩＬ－１２である。別の実施形態において、インターロイキンはｐ４０サブユニット及びｐ１９サブユニットを含み、例えば、インターロイキンはＩＬ－２３である。さらに別の実施形態において、インターロイキンはヒトＩＬ－１２又はヒトＩＬ－２３などのヒトインターロイキンである。

【００８８】
一実施形態において、抗体はＹ６１又はＪ６９５である。別の実施形態において、抗体はＹ６１又はＪ６９５でない。

【００８９】
別の実施形態において、単離された抗体又はその抗原結合部分は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）によるインターロイキン相互作用分子への結合が調節されるように、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させる。

【００９０】
さらに別の実施形態において、インターロイキン相互作用分子は、インターロイキン受容体（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３受容体）である。

【００９１】
さらなる実施形態において、単離された抗体又はその抗原結合部分は、第二の抗体によ

るインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）への結合が阻害されるように、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させる。

【００９２】

一実施形態において、インターロイキンはＩＬ－１２であり、及び第二の抗体は、１Ｄ４．７，Ｃ８．６．２及びＣ３４０からなる群から選択される抗体が結合するＩＬ－１２のｐ４０サブユニットのエピトープに結合する。

【００９３】

別の実施形態において、インターロイキンはＩＬ－１２であり、及び第二の抗体は１Ｄ４．７、Ｃ８．６．２及びＣ３４０からなる群から選択される。

【００９４】

別の実施形態において、本発明は、１Ｄ４．７，Ｃ８．６．２、Ｃ３４０及び７Ｇ３からなる群から選択される抗体が結合しないＩＬ－１２のｐ４０のエピトープに結合する単離された抗体（例えば、ヒト抗体）又はその抗原結合部分を提供する。

【００９５】

一実施形態において、抗体はＹ６１又はＪ６９５である。別の実施形態において、抗体はＹ６１又はＪ６９５でない。

【００９６】

別の実施形態において、単離された抗体又はその抗原結合部分は、Ｙ６１及びＪ６９５からなる群から選択される抗体が結合するＩＬ－１２のｐ４０サブユニットのエピトープに結合する。

【００９７】

一実施形態において、抗体はＹ６１又はＪ６９５でない。

【００９８】

さらなる実施形態において、単離された抗体又はその抗原結合部分は第二の抗体によるＩＬ－１２への結合を阻害する。

【００９９】

さらなる実施形態において、第二の抗体は、１Ｄ４．７、Ｃ８．６．２、Ｃ３４０からなる群から選択される抗体が結合するＩＬ－１２のエピトープに結合する。

【０１００】

一実施形態において、第二の抗体は１Ｄ４．７、Ｃ８．６．２及びＣ３４０からなる群から選択される。

【０１０１】

一実施形態において、単離された抗体又はその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に1×10^{-10}Ｍ若しくはそれ以下のK_dで、又は1×10^{-3} s^{-1}若しくはそれ以下のk_{off}速度定数で、ヒトＩＬ－１２のｐ４０サブユニットから解離する。

【０１０２】

別の実施形態において、単離された抗体又はその抗原結合部分は中和抗体である。

【０１０３】

さらなる実施形態において、単離された抗体又はその抗原結合部分は、インビトロＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球増殖を阻害し、又は1×10^{-10}Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でヒトＩＦＮγ産生を阻害する。

【０１０４】

一実施形態において、単離された抗体又はその抗原結合部分はヒト抗体である。

【０１０５】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体又はその抗原結合部分と及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は、さらなる治療剤、例えば、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチラート、６－メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リポ

キシゲナーゼ阻害剤、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化剤、トロンボキサン阻害剤、ＩＬ－１受容体アンタゴニスト、抗ＩＬ－１βモノクローナル抗体、抗ＩＬ－６モノクローナル抗体、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル－イミダゾール化合物、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ及びＰＤＧＦの抗体又はアゴニスト、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ９０の抗体又はこれらのリガンド、メトトレキサート、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、イブプロフェン、コルチコテロイド、プロドニソロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８、ＭＡＰキナーゼ阻害剤、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤、ＴＮＦα変換酵素阻害剤、Ｔ細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体、可溶性ｐ５５ＴＮＦ受容体、可溶性ｐ７５ＴＮＦ受容体、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ、抗炎症性サイトカイン、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３及びＴＧＦβからなる群から選択される治療剤をさらに含み得る。≪<0>

別の実施形態において、治療剤は抗ＴＮＦ抗体及びその抗体断片、ＴＮＦＲ－Ｉｇ構築物、ＴＡＣＥ阻害剤、ＰＤＥ４阻害剤、コルチコステロイド、ブデノシド、デキサメタゾン、スルファサラジン、５－アミノサリチル酸、オルサラジン、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤、ＩＬ－１ｒａ、チロシンキナーゼ阻害剤、６－メルカプトプリン及びＩＬ－１１からなる群から選択される。

【０１０６】

さらに別の実施形態において、治療剤は、コルチコステロイド、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、４－アミノピリジン、チザニジン、インターフェロン－β１ａ、インターフェロン－β１ｂ、コポリマー１、高圧酸素、静脈内免疫グロブリン、クラブリビン、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦの抗体又はアゴニスト、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ８０、ＣＤ８６，ＣＤ９０に対する抗体又はこれらのリガンド、メトトレキサート、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、イブプロフェン、コルチコテロイド、プロドニソロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８又はＭＡＰキナーゼ阻害剤、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤、ＴＡＣＥ阻害剤、Ｔ細胞シグナル伝達阻害剤、キナーゼ阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体、可溶性ｐ５５ＴＮＦ受容体、可溶性ｐ７５ＴＮＦ受容体、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ、ｓＩＬ－１３Ｒ、抗－Ｐ７、ｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド（ＰＳＧＬ）、抗炎症性サイトカイン、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３及びＴＧＦβからなる群から選択される。

【０１０７】

別の態様において、本発明は、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合することができ、及びｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させることができる抗体（例えば、ヒト抗体）又はその抗原結合部分を、インターロイキンの立体構造を変化させるのに有効な量で含む組成物を提供する。一実施形態において、インターロイキンはＩＬ－１２である。別の実施形態において、インターロイキンはｐ４０サブユニット及びｐｉ９サブユニットを含み、例えば、インターロイキンはＩＬ－２３である。

【０１０８】

一実施形態において、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２）のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるのに有効な抗体の量は、約０．１と２５００μｇ／ｍＬの間、好ましくは約１．０と２５０μｇ／ｍＬの間、より好ましくは約２．０と１２５μｇ／ｍＬの間、より好ましくは、約４．０と６５μｇ／ｍＬの間、さらに好ましくは約６．０と５０μｇ／ｍＬの間、好ましくは約８．０と４０μｇ／ｍＬの間、最も好ましくは約１０と２５μｇ／ｍＬの間である。様々な実施形態において、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２）のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるのに有効な抗体の量は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４５、５０、５５、６０μｇ／ｍＬ又はそれ以上である。上記量の中間の範囲、例えば、約５．０と５５μｇ／ｍＬの間、約９．０と３５μｇ／ｍＬの間、及び約１５と２０μｇ／ｍＬの間も、本発明の一部であることが意図される。例えば、上限及び／又は下限として、上記値の何れかの組み合わせを使用する値の範囲が含まれることが意図される。さらに、上記量の何れかの中間にある不連続な量、例えば、１０．５、１１．５及び１２．５μｇ／ｍＬも、本発明の一部であることが予定される。

【０１０９】

別の態様において、本発明は、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるのに使用するための指示書ともに包装され又は宣伝された、前記ｐ４０サブユニットに結合し、及び前記ｐ４０サブユニットの立体構造を変化させることができる抗体（例えば、ヒト抗体）又はその抗原結合部分を含む組成物を提供する。

【０１１０】

関連する態様において、本発明は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させるのに使用するための指示書ともに包装され又は宣伝された、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合し、及びｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させることができる抗体（例えば、ヒト抗体）又はその抗原結合部分を含む組成物を提供する。

【０１１１】

一実施形態において、組成物は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造が変化を受けているかどうかを測定するための手段をさらに含む。

【０１１２】

一実施形態において、インターロイキンはＩＬ－１２であり、及び抗体又はその抗原結合断片は、１Ｄ４．７，Ｃ８．６．２、Ｃ３４０及び７Ｇ３からなる群から選択される抗体が結合しないＩＬ－１２のｐ４０サブユニットのエピトープに結合する。

【０１１３】

別の実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、Ｙ６１及びＪ６９５からなる群から選択される抗体が結合するエピトープを結合する。

【０１１４】

さらに別の実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、Ｙ６１又はＪ６９５でない。

【０１１５】

さらなる実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に1×10^{-10}Ｍ若しくはそれ以下のK_dで、又は$1\times10^{-3}s^{-1}$若しくはそれ以下のk_{off}速度定数で、ヒトＩＬ－１２のｐ４０サブユニットから解離する。

【０１１６】

一実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は中和抗体である。

【０１１７】

一実施形態において、抗体又はその抗原結合部分はヒト抗体である。

【０１１８】

さらに別の態様において、本発明は、複数の抗体又はその抗原結合部分を含み、前記複数の抗体の各抗体がＩＬ－１２のｐ４０サブユニットの異なるエピトープに結合する、組成物を提供する。

【０１１９】

一実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分は、Ｙ６１及びＪ６９５からなる群から選択される抗体が結合するＩＬ－１２のｐ４０サブユニットのエピトープに結合する。

【０１２０】

別の実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分は、１Ｄ４．７、Ｃ８．６．２、Ｃ３４０及び７Ｇ３からなる群から選択される抗体が結合しないＩＬ－１２のｐ４０サブユニットのエピトープに結合する。

【０１２１】

一実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に1×10^{-10}Ｍ若しくはそれ以下のK_dで、又は$1\times10^{-3}s^{-1}$若しくはそれ以下のk_{off}速度定数で、ヒトＩＬ－１２のｐ４０サブユニットから解離する。

【０１２２】

別の実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分は中和抗体である。

【０１２３】

さらに別の実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分は、インビトロＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球増殖を阻害し、又は1×10^{-10}Ｍ若しくはそれ以下でヒトＩＦＮγ産生を阻害する。

【０１２４】

さらなる実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分はヒト抗体である。

【０１２５】

一実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３及び配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する。

【０１２６】

別の実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２をさらに有する。

【０１２７】

さらに別の実施形態において、少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１及び配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１をさらに有する。

【０１２８】

一態様において、本発明は、ｐ４０サブユニットが検出されるように、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットを本発明の抗体又はその抗原結合部分と接触させることを含む、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットを検出する方法を提供する。

【０１２９】

関連する態様において、本発明は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットが検出されるように、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットを本発明の抗体又はその抗原結合部分と接触させることを含む、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットを検出する方法を提供する。

【０１３０】
一実施形態において、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットは、インビトロで検出される。別の実施形態において、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットは、診断用の生物試料中で検出される。
【０１３１】
別の態様において、本発明は、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキンの活性が阻害されるように、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）を本発明の抗体又はその抗原結合部分と接触させることを含む、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害する方法を提供する。
【０１３２】
関連する態様において、本発明は、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－３０）の活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象に、前記ヒト対象中のインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性が阻害されるように、本発明の抗体又はその抗原結合部分を投与することを含む、前記ヒト対象中の、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－３０）の活性を阻害する方法を提供する。
【０１３３】
一実施形態において、インターロイキンはＩＬ－１２である。別の実施形態において、インターロイキンはｐ４０サブユニット及びｐ１９サブユニットを含み、例えば、インターロイキンはＩＬ－２３である。
【０１３４】
一実施形態において、疾患は、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症（ｄｅｒｍａｔｉｔｉｓｓｃｌｅｒｏｄｅｒｍａ）、甲状腺炎、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に伴う急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、結節性多発動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、シェーグレン症候群、ぶどう膜炎、敗血症、敗血性ショック、敗血症症候群、成人呼吸促迫症候群、悪液質、感染性疾患、寄生虫症、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、重症筋無力症、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、線維性肺疾患、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全及び心筋梗塞からなる群から選択される。
【０１３５】
一実施形態において、疾患は関節リウマチである。
【０１３６】
一実施形態において、疾患はクローン病である。
【０１３７】
一実施形態において、疾患は多発性硬化症である。
【０１３８】
一実施形態において、疾患は乾癬である。
【０１３９】
さらに別の態様において、本発明は、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットを結合することができ及び前記サブユニットの立体構造を変えることができる抗体又はその抗原結合断片を、前記サブユニットの立体構造を変化させるのに有効な量で、前記サブユニットと接触させ、これにより、前記サブユニットの立体構造を変化させることを含む、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させる方法を提供する。
【０１４０】

関連する態様において、本発明は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させるのに有効な量で、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合することができ及びインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させることができる抗体又はその抗原結合断片と、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）を接触させ、これにより、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させることを含む、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させる方法を提供する。

【０１４１】

別の態様において、本発明は、ｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるのに有効な量で、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合することができ及び前記サブユニットの立体構造を変化させることができる抗体又はその抗原結合部分とインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）を接触させ、これにより、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害することを含む、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害する方法を提供する。

【０１４２】

関連する態様において、本発明は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させるのに有効な量で、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合することができ及びインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させることができる抗体又はその抗原結合部分とインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）を接触させ、これにより、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害することを含む、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害する方法を提供する。

【０１４３】

別の態様において、本発明は、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるのに有効な量で、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合することができ及び前記サブユニットの立体構造を変化させることができる抗体又はその抗原結合部分を、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象に投与し、これにより、前記ヒト対象中のインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の前記活性を阻害することを含む、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象中のｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害する方法を提供する。

【０１４４】

関連する態様において、本発明は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させるのに有効な量で、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットに結合することができ及びインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させることができる抗体又はその抗原結合部分をヒト対象に投与し、これにより、前記ヒト対象中のインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害することを含む、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象中のｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害する方法を提供する。

【０１４５】

一実施形態において、インターロイキンはＩＬ－１２である。別の実施形態において、インターロイキンはｐ４０サブユニット及びｐ１９サブユニットを含み、例えば、インターロイキンはＩＬ－２３である。

【０１４６】

一実施形態において、疾患は、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、甲

状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、甲状腺炎、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に伴う急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、結節性多発動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、シェーグレン症候群、ぶどう膜炎、敗血症、敗血性ショック、敗血症症候群、成人呼吸促迫症候群、悪液質、感染性疾患、寄生虫症、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、重症筋無力症、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、線維性肺疾患、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全及び心筋梗塞からなる群から選択される。

【０１４７】

一実施形態において、疾患は関節リウマチである。

【０１４８】

一実施形態において、疾患はクローン病である。

【０１４９】

一実施形態において、疾患は多発性硬化症である。

【０１５０】

一実施形態において、疾患は乾癬である。

【０１５１】

一実施形態において、抗体はＹ６１又はＪ６９５でない。

【０１５２】

別の実施形態において、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２）のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるのに有効な抗体の量は、約０．１と２５００μｇ／ｍＬの間、好ましくは約１．０と２５０μｇ／ｍＬの間、より好ましくは約２．０と１２５μｇ／ｍＬの間、より好ましくは、約４．０と６５μｇ／ｍＬの間、さらに好ましくは約６．０と５０μｇ／ｍＬの間、好ましくは約８．０と４０μｇ／ｍＬの間、最も好ましくは約１０と２５μｇ／ｍＬの間である。様々な実施形態において、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２）のｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるのに有効な抗体の量は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４５、５０、５５、６０μｇ／ｍＬ又はそれ以上である。上記量の中間の範囲、例えば、約５．０と５５μｇ／ｍＬの間、約９．０と３５μｇ／ｍＬの間、及び約１５と２０μｇ／ｍＬの間も、本発明の一部であることが意図される。例えば、上限及び／又は下限として、上記値の何れかの組み合わせを使用する値の範囲が、含まれることが意図される。さらに、上記量の何れかの中間にある不連続な量、例えば、１０．５、１１．５及び１２．５μｇ／ｍＬも、本発明の一部であることが予定される。

【０１５３】

一実施形態において、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２）のｐ４０サブユニットは、約１０秒、３０秒、１分、２分、３分、４分、５分、６分、７分、８分、９分、１０分、１１分、１２分、１３分、１４分、１５分、２０分、２５分、３０分、１時間、２時間、５時間又はそれより長い時間、抗体又はその抗原結合部分と接触される。好ましい実施形態において、インターロイキンのｐ４０サブユニットは、５分と１０分の間の時間、例えば、５、６、７、８、９又は１０分間、抗体又はその抗原結合部分と接触される。上記時間の中間の時間、例えば、２．５分、３．５分、４．５分、５．５分も本発明の一部であることが意図される。

【０１５４】

別の態様において、本発明は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニット又はその一部を抗体又はその抗原結合部分と接触させること、及び前記抗体又はその抗原結合部分が前記ｐ４０サブユニットの立体構造を変化させるかどうかを測定し、これにより、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ

－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害するのに適した抗体又はその抗原結合部分を同定することを含む、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害するのに適した抗体又はその抗原結合部分を同定する方法を提供する。

【０１５５】

関連する態様において、本発明は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニット又はその一部を抗体又はその抗原結合部分と接触させること、及び前記抗体又はその抗原結合部分がインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の立体構造を変化させるかどうかを測定し、これにより、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害するのに適した抗体又はその抗原結合部分を同定することを含む、ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害するのに適した抗体又はその抗原結合部分を同定する方法を提供する。

【０１５６】

一実施形態において、抗体又はその抗原結合断片は、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性が有害である疾患に罹患しているヒト対象中のインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の活性を阻害するのに適している。

【０１５７】

別の実施形態において、前記方法は、インターロイキン相互作用分子へのインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）による結合が調節されているかどうかを測定することをさらに含む。

【０１５８】

一実施形態において、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）と相互作用する分子は、インターロイキン受容体（例えば、ＩＬ－１２受容体又はＩＬ－２３受容体）である。

【０１５９】

一実施形態において、前記方法は、第二の抗体によるインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）への結合が阻害されているかどうかを測定することをさらに含む。

【０１６０】

一実施形態において、インターロイキンはＩＬ－１２であり、及び第二の抗体は、１Ｄ４．７，Ｃ８．６．２及びＣ３４０からなる群から選択される抗体が結合するＩＬ－１２のｐ４０サブユニットのエピトープに結合する。

【０１６１】

一実施形態において、第二の抗体は１Ｄ４．７、Ｃ８．６．２及びＣ３４０からなる群から選択される。

【図面の簡単な説明】

【０１６２】

【図１Ａ】生殖系列配列Ｃｏｓ－３／ＪＨ３及びＤｐｌ１８Ｌｖ１０４２と比較した、ヒトＩＬ－１２を結合する一連のヒト抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列の並置を示す。アミノ酸の位置を特定するために、Ｋａｂａｔ付番が使用されている。Ｊｏｅ９野生型に関しては、完全な配列を示す。他の抗体に関しては、Ｊｏｅ９野生型と異なるアミノ酸位置のみを示す。

【図１Ｂ】生殖系列配列Ｃｏｓ－３／ＪＨ３及びＤｐｌ１８Ｌｖ１０４２と比較した、ヒトＩＬ－１２を結合する一連のヒト抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列の並置を示す。アミノ酸の位置を特定するために、Ｋａｂａｔ付番が使用されている。Ｊｏｅ９野生型に関しては、完全な配列を示す。他の抗体に関しては、Ｊｏｅ９野生型と異なるアミノ酸位置のみを示す。

【図１Ｃ】ヒトＩＬ－１２を結合する一連のヒト抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列の並置を示す。アミノ酸の位置を特定するために、Ｋａｂａｔ付番が使用されている。Ｊｏｅ９

野生型に関しては、完全な配列を示す。他の抗体に関しては、Ｊｏｅ９野生型と異なるアミノ酸位置のみを示す。
【図１Ｄ】ヒトＩＬ－１２を結合する一連のヒト抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列の並置を示す。アミノ酸の位置を特定するために、Ｋａｂａｔ付番が使用されている。Ｊｏｅ９野生型に関しては、完全な配列を示す。他の抗体に関しては、Ｊｏｅ９野生型と異なるアミノ酸位置のみを示す。
【図２Ａ】部位特異的突然変異誘発によって変異を受けたＹ６１抗体の重鎖中のＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換を示す。図の右側のグラフは、変異を受けていないＹ６１（白いバー）と比べた置換された抗体（黒いバー）に対するｏｆｆ速度を示す。
【図２Ｂ】部位特異的突然変異誘発によって変異を受けたＹ６１抗体の重鎖中のＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換を示す。図の右側のグラフは、変異を受けていないＹ６１（白いバー）と比べた置換された抗体（黒いバー）に対するｏｆｆ速度を示す。
【図２Ｃ】部位特異的突然変異誘発によって変異を受けたＹ６１抗体の重鎖中のＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換を示す。図の右側のグラフは、変異を受けていないＹ６１（白いバー）と比べた置換された抗体（黒いバー）に対するｏｆｆ速度を示す。
【図２Ｄ】部位特異的突然変異誘発によって変異を受けたＹ６１抗体の重鎖中のＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換を示す。図の右側のグラフは、変異を受けていないＹ６１（白いバー）と比べた置換された抗体（黒いバー）に対するｏｆｆ速度を示す。
【図２Ｅ】部位特異的突然変異誘発によって変異を受けたＹ６１抗体の重鎖中のＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換を示す。図の右側のグラフは、変異を受けていないＹ６１（白いバー）と比べた置換された抗体（黒いバー）に対するｏｆｆ速度を示す。
【図２Ｆ】部位特異的突然変異誘発によって変異を受けたＹ６１抗体の軽鎖中のＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換を示す。図の右側のグラフは、変異を受けていないＹ６１（白いバー）と比べた置換された抗体（黒いバー）に対するｏｆｆ速度を示す。
【図２Ｇ】部位特異的突然変異誘発によって変異を受けたＹ６１抗体の軽鎖中のＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換を示す。図の右側のグラフは、変異を受けていないＹ６１（白いバー）と比べた置換された抗体（黒いバー）に対するｏｆｆ速度を示す。
【図２Ｈ】部位特異的突然変異誘発によって変異を受けたＹ６１抗体の軽鎖中のＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換を示す。図の右側のグラフは、変異を受けていないＹ６１（白いバー）と比べた置換された抗体（黒いバー）に対するｏｆｆ速度を示す。
【図３】カニクイザル中の血漿ネオプテリン濃度に対するヒト抗ＩＬ－１２抗体Ｊ６９５のインビボでの効力を示す。
【図４】コラーゲンでのマウスの免疫後の日数に対する平均関節炎スコアのグラフを示しており、Ｃ１７．１５での処置が、ラットＩｇＧでの処置に比べて、関節炎関連症候を著しく減少させることを示す。
【発明を実施するための形態】
【０１６３】
本発明をさらに容易に理解できるようにするために、まず、幾つかの用語を定義する。
【０１６４】
「活性増強アミノ酸残基」という用語は、抗体の活性を改善するアミノ酸を含む。活性増強アミノ酸残基は、接触、高頻度変異又は好ましい選択的突然変異誘発位置の１つのアミノ酸残基を置換し得ること、さらに、２以上の活性増強アミノ酸残基が１つ又はそれ以

上のＣＤＲ内に存在し得ることを理解すべきである。活性増強アミノ酸残基には、抗体の結合特異性／親和性、例えば、ヒトＩＬ－１２への抗ヒトＩＬ－１２抗体の結合を改善するアミノ酸残基が含まれる。活性増強アミノ酸残基には、抗体（例えば、ヒトＩＬ－１２を阻害するヒトＩＬ－１２抗体）の中和能を改善するアミノ酸残基が含まれる。

【０１６５】

「抗体」という用語は、４つのポリペプチド鎖（ジスルフィド結合によって相互に接続された２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖）から構成される免疫グロブリン分子を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において、ＨＣＶＲ又はＶＨと略称される。）及び重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、３つのドメインＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において、ＬＣＶＲ又はＶＬと略称される。）及び軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメインＣＬから構成される。ＶＨ及びＶＬ領域は、より保存された領域（フレームワーク領域（ＦＲ）と称される。）が散剤された超可変領域（相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される。）へ、さらに細分割することが可能である。各ＶＨ及びＶＬは、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４の順で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲから構成される。

【０１６６】

抗体の「抗原結合部分」（又は「抗体部分」）という用語は、抗原（例えば、ｈＩＬ－１２）に特異的に結合する能力を保持する、抗体の断片を含む。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実行可能であることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、（ｉ）Ｆａｂ断片（ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ及びＣＨ１ドメインからなる一価断片）、（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$断片（ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片）、（ｉｉｉ）ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）ＶＨドメインからなるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ３４１：５４４－５４６）及び（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が含まれる。さらに、Ｆｖ断片の２つのドメインであるＶＬ及びＶＨは別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、ＶＬ及びＶＨ領域が対合して一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの作製を可能とする合成リンカーによって、組み換え法を用いて連結することが可能である（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られている。例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４２：４２３－４２６；ａｎｄ Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：５８７９－５８８３）。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものとする。ダイアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も包含される。ダイアボディは、ＶＨ及びＶＬドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されているが、同一鎖上にある２つのドメイン間での対合を可能とするには短すぎるリンカーを使用することにより、両ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合するように強制し、２つの抗原結合部位を作出する二価の二重特異的抗体である（例えば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：６４４４－６４４８；Ｐｏｌｊａｋ ｅｔ ａｌ（１９９４）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ２：１，１２１－１，１２３を参照）。

【０１６７】

さらに、抗体又はその抗原結合部分は、前記抗体又は抗体部分の、１つ又はそれ以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有又は非共有的会合によって形成されたより大きな免疫接着分子の一部であり得る。このような免疫接着分子の例には、四量体ｓｃＦｖ分子を作製するためにストレプトアビジンコア領域を使用すること（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，Ｓ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｈｕｍａｎ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ６：９３－１０１）、並びに二価及びビオチン化されたｓｃＦｖ分子を作製するために、システイン残基、マーカーペプチド及びＣ末端ポリヒスチジニルを使用すること（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，Ｓ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｍｏｌ．Ｉｍｍ

ｕｎｏｌ．３１：１０４７－１０５８）が含まれる。それぞれ、完全な抗体のパパイン又はペプシン消化などの慣用技術を使用して、完全な抗体から、Ｆａｂ及びＦ（ａｂ’）$_2$断片などの抗体部分を調製し得る。さらに、抗体、抗体部分及び免疫接着分子は、本明細書に記載されているように、標準的な組み換えＤＮＡ技術を使用することによって取得することができる。好ましい抗原結合部分は、完全なドメイン又は完全なドメインの対である。

【０１６８】

「逆変異」という用語は、ヒト抗体の体細胞変異されたアミノ酸の幾つか又は全部が、相同的生殖系列抗体配列からの対応する生殖系列残基と交換される過程を表す。最高の相同性を有する配列を同定するために、本発明のヒト抗体の重鎖及び軽鎖配列は、ＶＢＡＳＥデータベース中の生殖系列配列と別々に並置される。本発明のヒト抗体中の差は、このような異なるアミノ酸をコードする所定のヌクレオチド位置を変異させることによって、生殖系列配列へ戻される。逆変異の候補としてこのように同定された各アミノ酸の役割は、抗原結合における直接又は間接的な役割に関して調査されるべきであり、変異後に、ヒト抗体の特徴的な何れかの望ましい特徴に影響を与えることが明らかとなった一切のアミノ酸は、最終のヒト抗体中に含めるべきでない。一例として、選択的突然変異誘発アプローチによって同定された活性増強アミノ酸は、逆変異へ供されない。逆転写に供するアミノ酸の数を最小限に抑えるために、第二の生殖系列配列が、本発明のヒト抗体の配列と、問題のアミノ酸の両側において、少なくとも１０、好ましくは１２アミノ酸に関して同一であり、及び共線性（ｃｏｌｉｎｅａｒ）である限り、最も近い生殖系列配列と異なるが、第二の生殖系列配列中の対応するアミノ酸と同一であることが明らかとなったアミノ酸位置はそのままにすることができる。逆変異は、抗体の最適化の何れの段階においても行われ得る。好ましくは、逆変異は、選択的突然変異誘発アプローチの直前又は直後に行われる。より好ましくは、逆変異は、選択的突然変異誘発アプローチの直前に行われる。

【０１６９】

本明細書において使用される「ヒトインターロイキン１２」（本明細書において、ｈＩＬ－１２又はＩＬ－１２と略称される。）という用語には、マクロファージ及び樹状細胞によって主として分泌されるヒトサイトカインが含まれる。この用語は、ジスルフィド結合で一緒に連結された３５ｋＤサブユニット（ｐ３５）と４０ｋＤサブユニット（ｐ４０）を含むヘテロ二量体タンパク質を含む。

【０１７０】

このヘテロ二量体タンパク質は、「ｐ７０サブユニット」と称される。ヒトＩＬ－１２の構造は、例えば、「Ｋｏｂａｙａｓｈｉ，ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｊ．ＥｘｐＭｅｄ．１７０：８２７－８４５；Ｓｅｄｅｒ，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９０：１０１８８－１０１９２；Ｌｉｎｇ，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｊ．ＥｘｐＭｅｄ．１５４：１１６－１２７；Ｐｏｄｌａｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２９４：２３０－２３７」にさらに記載されている。ヒトＩＬ－１２という用語は、標準的な組換え発現法によって調製することができる組換えヒトＩＬ－１２（ｒｈＩＬ－１２）を含むものとする。

【０１７１】

「ｐ４０サブユニットを含むインターロイキン」という用語には、ｐ４０サブユニットを含むあらゆるインターロイキン、例えば、あらゆるヒトインターロイキンが含まれる。このようなインターロイキンは本分野において周知であり、ＩＬ－１２、例えば、ヒトＩＬ－１２及びＩＬ－２３、例えば、ヒトＩＬ－２３が含まれる。

【０１７２】

「Ｋａｂａｔ付番」、「Ｋａｂａｔ定義」及び「Ｋａｂａｔ標識」という用語は、本明細書において、互換的に使用される。本分野において認知されているこれらの用語は、抗体又はその抗原結合部分の重鎖及び軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な（すなわち、超可変的な）アミノ酸残基に付番するシステムを表す（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９７１）Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ，Ｓｃｉ．１９０：３８２－３９１及

びＫａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ＮＯ．９１－３２４２）。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、ＣＤＲ１に対するアミノ酸位置３１から３５、ＣＤＲ２に対するアミノ酸位置５０から６５及びＣＤＲ３に対するアミノ酸位置９５から１０２にわたる。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、ＣＤＲ１に対するアミノ酸位置２４から３４、ＣＤＲ２に対するアミノ酸位置５０から５６及びＣＤＲ３に対するアミノ酸位置８９から９７にわたる。

【０１７３】

本明細書において、Ｋａｂａｔ付番は、本発明の抗体中に施されるアミノ酸修飾の位置を示すために使用される。例えば、Ｙ６１抗ＩＬ－１２抗体は、重鎖ＣＤＲ１の３１位において、セリン（Ｓ）からグルタミン酸（Ｅ）へ変異されることができ（Ｈ３１Ｓ→Ｅ）、又は軽鎖ＣＤＲ３の９４位において、グリシン（Ｇ）をチロシン（Ｙ）へ変異させることができる（Ｌ９４Ｇ→Ｙ）。

【０１７４】

「ヒト抗体」という用語は、Ｋａｂａｔら（Ｋａｂａｔ，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２参照。）によって記載されているように、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に対応する可変及び定常領域を有する抗体を含む。本発明のヒト抗体は、例えば、ＣＤＲ、特にＣＤＲ３中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでの無作為の突然変異誘発若しくは部位特異的突然変異誘発によって、又はインビボでの体細胞変異によって導入された変異）を含み得る。変異は、好ましくは、本明細書に記載されている「選択的突然変異誘発アプローチ」を用いて導入される。ヒト抗体は、アミノ酸残基、例えば、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていない活性増強アミノ酸残基で置換された少なくとも１つの位置を有することができる。ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列の一部でないアミノ酸残基と置換された最大２０の位置を有することができる。他の実施形態において、最大１０個、最大５個、最大３個又は最大２個の位置が置換される。好ましい実施形態において、これらの置換は、以下に詳述されているようにＣＤＲ領域内にある。しかしながら、本明細書において使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を含まないものとする。

【０１７５】

「組換えヒト抗体」という用語には、宿主細胞中に形質移入された組換え発現ベクターを用いて発現された抗体（以下で、ＩＩ節において、さらに記載されている。）、組換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリー（以下で、ＩＩＩ節において、さらに記載されている。）、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対して遺伝子導入される動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、ＴａｙｌｏｒＬ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｎｕｃｌ．ＡｃｉｄｓＲｅｓ．２０：６２８７を参照。）など、組換え手段によって、調製され、発現され、作製され、若しくは単離されたヒト抗体、又はヒト免疫グロブリン遺伝子配列の、他のＤＮＡ配列へのスプライシングを伴う他の何れかの手段によって調製され、発現され、作製され、若しくは単離された抗体が含まれる。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変及び定常領域を有する（Ｋａｂａｔ，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２参照。）。しかしながら、ある種の実

施形態において、このような組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発（又は、ヒトＩｇ配列に対して遺伝子導入された動物が使用される場合には、インビボ体細胞突然変異誘発）に供され、従って、組換え抗体のＶＨ及びＶＬ領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列ＶＨ及びＶＬ配列に由来し、これらの配列に関連しつつも、インビボで、ヒト抗体生殖系列レパートリー内には、天然に存在しない場合があり得る配列である。しかしながら、ある種の実施形態において、このような組換え抗体は、選択的突然変異誘発アプローチ又は逆突然変異又は両者の結果である。

【０１７６】

「単離された抗体」には、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない（例えば、ｈＩＬ－１２を特異的に結合する単離された抗体は、ｈＩＬ－１２以外の抗原を特異的に結合する抗体を実質的に含まない。）抗体が含まれる。ＩＬ－１２を特異的に結合する単離された抗体は、他の種から得られるＩＬ－１２分子を結合し得る（以下に、さらに詳しく論述されている。）。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質及び／又は化学物質を実質的に含まないことができる。

【０１７７】

「中和抗体」（又は「ｈＩＬ－１２活性を中和した抗体」）には、ｈＩＬ－１２へのその結合が、ｈＩＬ－１２の生物活性の阻害をもたらす抗体が含まれる。ｈＩＬ－１２の生物活性のこの阻害は、フィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡ）におけるヒトフィトヘマグルチニン芽球増殖の阻害又はヒトＩＬ－１２受容体結合アッセイにおける受容体結合の阻害など、ｈＩＬ－１２生物活性の１つ又はそれ以上の指標を測定することによって評価することができる（実施例３－インターフェロンγ誘導アッセイ参照）。ｈＩＬ－１２生物活性のこれらの指標は、本分野において公知の標準的な幾つかのインビトロ又はインビボアッセイの１つ又はそれ以上によって評価することができる（実施例３参照）。

【０１７８】

「活性」という用語には、抗原に対する抗体（例えば、ＩＬ－１２抗原に結合する抗ｈＩＬ－１２抗体）の結合特異性／親和性、及び／又は、抗体（例えば、ｈＩＬ－１２へのその結合がｈＩＬ－１２の生物活性を阻害する抗ｈＩＬ－１２抗体）の中和能、例えば、ＰＨＡ芽球増殖の阻害又はヒトＩＬ－１２受容体結合アッセイにおける受容体結合の阻害（実施例３参照）などの活性が含まれる。

【０１７９】

「表面プラズモン共鳴」という用語には、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ ａｎｄ Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムな生物特異的相互作用の分析を可能とする光学現象が含まれる。さらなる記述に関しては、実施例５及び「Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ａｎｎ．Ｂｉｏｌ．ＣＨｎ．５１：１９－２６；Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ１１：６２０－６２７；Ｊｏｈｎｓｓｏｎ，Ｂ．，ｅｔ ａｌ（１９９５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．８：１２５－１３１；及びＪｏｈｎｎｓｏｎ，Ｂ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９８：２６８－２７７」を参照されたい。

【０１８０】

本明細書において使用される「K_{off}」という用語は、抗体／抗原複合体からの抗体の解離に対するｏｆｆ速度定数を表すものとする。

【０１８１】

本明細書において使用される「K_d」という用語は、特定の抗体抗原相互作用の解離定数を表すものとする。

【０１８２】

「核酸分子」という用語は、ＤＮＡ分子及びＲＮＡ分子を含む。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖ＤＮＡである。

【０１８３】
ｈＩＬ－１２を結合する抗体（「単離された抗体」を含む。）又は抗体部分（例えば、ＶＨ、ＶＬ、ＣＤＲ３）をコードする核酸に対して本明細書で使用される「単離された核酸分子」という用語には、抗体又は抗体部分をコードするヌクレオチド配列がｈＩＬ－１２以外の抗原を結合する抗体又は抗体部分をコードする他のヌクレオチド配列（この他の配列は、ヒトゲノムＤＮＡ中の核酸で、天然に隣接し得る。）を含まない核酸分子が含まれる。従って、例えば、抗ＩＬ－１２抗体のＶＨ領域をコードする本発明の単離された核酸は、ＩＬ－１２以外の抗原を結合する他のＶＨ領域をコードする他の配列を含有しない。「単離された核酸分子」という用語は、二価の、二重特異抗体（ＶＨ及びＶＬ領域が、ダアイボディの配列以外の他の配列を含有しないダイアボディなど）をコードする配列を含むものとする。

【０１８４】
「ベクター」という用語は、核酸分子に連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を含む。ベクターの１つの種類は「プラスミド」であり、これは、その中にさらなるＤＮＡセグメントを連結し得る環状二本鎖ＤＮＡループを表す。ベクターの別の種類はウイルスベクターであり、ウイルスベクターにおいて、追加のＤＮＡセグメントはウイルスゲノム中に連結され得る。ある種のベクターは、当該ベクターがその中に導入された宿主細胞中で自律的複製を行うことができる（例えば、細菌の複製起点及びエピソーム哺乳動物ベクターを有する細菌ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中への導入時に、宿主細胞のゲノム中に組み込まれることが可能であり、これにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが作用可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（又は単に、「発現ベクター」）と称される。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、本発明は、均等な機能を果たす、ウイルスベクターなどの（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）発現ベクターのこのような他の形態を含むものとする。

【０１８５】
「組換え宿主細胞」（又は単に、「宿主細胞」）という用語は、組換え発現ベクターがその中に導入されている細胞を含む。このような単語は、当該細胞を表すのみならず、このような細胞の子孫も表すことを理解すべきである。変異又は環境的な影響のために、後続の世代中にある種の修飾が生じ得るので、このような子孫は、実際には、親細胞と同一でないことがあり得るが、本明細書において使用される「宿主細胞」という用語の範囲に、なお含まれる。

【０１８６】
本明細書において使用される「修飾する」という用語は、抗体又はその抗原結合部分中の１つ又はそれ以上のアミノ酸を変化させることを表すものとする。変化は、１つ又はそれ以上の位置においてアミノ酸を付加、置換又は欠失させることによって生成させることができる。変化は、ＰＣＲ突然変異誘発などの公知の技術を用いて生成させることができる。

【０１８７】
「接触位置」という用語には、２６の公知の抗体抗原構造の１つにおいて抗原に接触するアミノ酸によって占められている、抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３中のアミノ酸位置が含まれる。抗体抗原複合体の２６の公知の解明された構造の何れかの中のＣＤＲアミノ酸が抗原と接触すれば、そのアミノ酸は、接触位置を占有すると考えることができる。抗原を接触する接触位置は、非接触位置より、アミノ酸によって占有される可能性がより高い。好ましくは、接触位置は、２６の構造のうち３より多い構造中で（＞１１．５％）抗原に接触するアミノ酸を含有するＣＤＲ位置であ

る。最も好ましくは、接触位置は、２５の構造のうち８より多い構造中で（＞３２％）抗原に接触するアミノ酸を含有するＣＤＲ位置である。

【０１８８】

「高頻度変異位置」という用語には、抗体のインビボ親和性成熟の間に、体細胞高頻度変異に対する高い頻度又は確率を有すると考えられている抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３領域中の位置を占めるアミノ酸残基が含まれる。「体細胞性高頻度変異に対する高い頻度又は確率」には、抗体のインビボ親和性成熟の間に、残基が体細胞性高頻度変異を受ける５から約４０％の頻度又は確率が含まれる。この表記されている範囲内の全ての範囲、例えば５から約３０％、例えば５から約１５％、例えば１５から約３０％も、この範囲の一部であることが意図されることを理解すべきである。

【０１８９】

「好ましい選択的突然変異誘発位置」という用語には、接触及び高頻度変異位置の両方であると考えることができる、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３領域中の位置を占めるアミノ酸残基が含まれる。

【０１９０】

「選択的突然変異誘発アプローチ」という用語には、少なくとも１つの好ましい選択的突然変異誘発位置、高頻度変異及び／又は接触位置のＣＤＲアミノ酸を選択し、個別に変異させることによって、抗体の活性を改善する方法が含まれる。「選択的に変異された」ヒト抗体とは、選択的突然変異誘発アプローチを用いて選択された位置に変異を含有する抗体である。別の実施形態において、選択的突然変異誘発アプローチは、抗体の重鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２若しくはＣＤＲ３（以下、それぞれ、Ｈ１、Ｈ２及びＨ３）又は抗体の軽鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３（以下、それぞれ、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３と称される）中の選択された各アミノ酸残基を優先的に変異させる方法を提供することが意図される。アミノ酸残基は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置又は高頻度変異位置から選択され得る。各アミノ酸は、軽鎖又は重鎖可変領域中の位置に基づいて選択される。高頻度変異位置は接触位置でもあり得ることを理解すべきである。一実施形態において、選択的突然変異誘発アプローチは、「標的化されたアプローチ」である。「標的化されたアプローチ」という用語には、標的化された様式で、抗体の重鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２若しくはＣＤＲ３又は軽鎖可変領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２若しくはＣＤＲ３中の選択された各アミノ酸残基を優先的に変異させる方法が含まれるものとする（例えば、「群ごとの標的化されたアプローチ」又は「ＣＤＲごとの標的化されたアプローチ」）。「群ごとの標的化されたアプローチ」では、群Ｉ（Ｌ３及びＨ３を含む）、ＩＩ（Ｈ２及びＬ１を含む）及びＩＩＩ（Ｌ２及びＨ１を含む）を含む選択的変異に対して、特定の群中の各アミノ酸残基が標的とされる（群は、標的化が好ましい順序で列記されている。）。「ＣＤＲごとの標的化されたアプローチ」では、標的化が好ましい以下の順で、Ｈ３、Ｌ３、Ｈ２、Ｌ１、Ｈ１及びＬ２、特定のＣＤＲ中の各アミノ酸残基が選択的変異に対する標的とされる。選択されたアミノ酸残基は、例えば、少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ変異され、抗体の活性に対する変異の効果が測定される。活性は、抗体の結合特異性／親和性及び／又は抗体の中和能の変化として測定される。選択的突然変異誘発アプローチは、ファージディスプレイ、ヒトＩｇＧ生殖系列遺伝子を有するトランスジェニック動物、ヒトＢ細胞から単離されたヒト抗体を含むあらゆる源に由来するあらゆる抗体の最適化のために使用することができることを理解すべきである。好ましくは、選択的突然変異誘発アプローチは、ファージディスプレイ技術を用いてさらに最適化することができない抗体に対して使用される。ファージディスプレイ、ヒトＩｇＧ生殖系列遺伝子を有するトランスジェニック動物、ヒトＢ細胞から単離されたヒト抗体を含むあらゆる源に由来する抗体は、選択的突然変異誘発アプローチの前又は後に、逆変異へ供され得ることを理解すべきである。

【０１９１】

「活性増強アミノ酸残基」という用語は、抗体の活性を改善するアミノ酸残基を含む。

活性増強アミノ酸残基は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置又は高頻度変異の１つのアミノ酸残基を置換し得ること、さらに、２以上の活性増強アミノ酸残基が１つ又はそれ以上のＣＤＲ内に存在し得ることを理解すべきである。活性増強アミノ酸残基には、抗体の結合特異性／親和性、例えば、ヒトＩＬ１２への抗ヒトＩＬ－１２抗体の結合を改善するアミノ酸残基が含まれる。活性増強アミノ酸残基には、抗体（例えば、ヒトＩＬ－１２を阻害するヒトＩＬ－１２抗体）の中和能を改善するアミノ酸残基が含まれる。

{0}Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections.{75}≫　本発明の様々な態様は、以下の項でさらに詳しく記載されている。

【０１９２】

Ｉ．ヒトＩＬ－１２を結合するヒト抗体

本発明は、ヒトＩＬ－１２に結合する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。好ましくは、本発明のヒト抗体は、組み換え、中和ヒト抗ｈＩＬ－１２抗体である。ヒトＩＬ－１２へ結合する本発明の抗体は、実施例１に記載されているようなファージディスプレイ技術によるなど、例えば、１つ又はそれ以上のヒトV_L及びV_HｃＤＮＡライブラリーをｈＩＬ－１２でスクリーニングすることによって選択することができる。ヒトV_L及びV_HｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングによって、最初に、一連の抗ＩＬ－１２抗体が同定され、さらなる開発のために、そのうちの１つの抗体（本明細書において、「Ｊｏｅ９」（又は「Ｊｏｅ野生型」と称される。）を選択した。Ｊｏｅ９は、比較的低親和性のヒトＩＬ－１２抗体（例えば、約０．１ｓｅｃ$^{-1}$のK_{off}）であるが、ｈＩＬ－１２を特異的に結合及び検出するのに有用である。Ｊｏｅ９抗体の親和性は、重鎖及び軽鎖ＣＤＲの突然変異誘発を実施し、「混合され及びマッチされ」、さらに変異を受けた軽鎖及び重鎖可変領域の群を作製し、ｈＩＬ－１２に対して増加した親和性を有する多くのさらなる抗ｈＩＬ－１２抗体をもたらすことによって改善された（実施例１、表２（添付書類Ａ参照）及び図１ＡからＤの配列並置参照）。

【０１９３】

これらの抗体のうち、本明細書においてＹ６１と称されるヒト抗ｈＩＬ－１２抗体が、結合親和性の著しい改善を示した（例えば、約２×１０$^{-4}$ｓｅｃ$^{-1}$のK_{off}）。Ｙ６１抗ｈＩＬ－１２抗体は、重鎖及び軽鎖ＣＤＲ内の特異的アミノ酸残基を個別に変異させることによって、さらなる親和性成熟のために選択された。Ｙ６１のアミノ酸残基は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触及び／又は高頻度変異位置を占めるアミノ酸残基に基づいて、部位特異的変異（選択的突然変異誘発アプローチ）のために選択された。重鎖及び軽鎖ＣＤＲ中の選択された位置での置換の要約が、図２Ａから２Ｈに示されている。本発明の好ましい組換え中和抗体（本明細書においてＪ６９５と称される）は、Ｙ６１の軽鎖ＣＤＲ２の５０位におけるＧｌｙからＴｙｒへの置換及びＹ６１の軽鎖ＣＤＲ３の９４位におけるＧｌｙからＴｙｒへの置換から生じた。

【０１９４】

これらの配列並置によって、Ｊｏｅ９らＪ６９５への系統上に、ｈＩＬ－１２を結合する本発明の抗体の好ましい重鎖及び軽鎖可変領域に対するコンセンサス配列並びにＣＤＲ３、ＣＤＲ２及びＣＤＲ１に対するコンセンサス配列の同定が可能となった。

【０１９５】

さらに、図２Ａから２ＨにまとめられているＹ６１突然変異誘発分析によって、Ｙ６１からの修飾を有するが、優れたｈＩＬ－１２結合特性をなお保持する配列を包含するＹ６１からＪ６９５への系統上に、ｈＩＬ－１２を結合する重鎖及び軽鎖可変領域に対するコンセンサス配列並びにｈＩＬ－１２を結合するＣＤＲ３、ＣＤＲ２及びＣＤＲ１に対するコンセンサス配列の同定が可能となった。添付の配列表中の配列識別子によって特定される本発明の好ましいＣＤＲ、ＶＨ及びＶＬ配列（コンセンサス配列を含む）が、以下に要約されている。

【０１９６】

【表１】

配列番号	抗体鎖	領域	配 列
1	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR H3	(H/S)-G-S-(H/Y)-D-(N/T/Y)
2	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR L3	Q-(S/T)-Y-(D/E)-(S/R/K)-(S/G/Y)-(L/F/T/S)-(R/S/T/W/H)-(G/P)-(S/T/A/L)-(R/S/M/T/L)-(V/I/T/M/L)
3	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR H2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G
4	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR L2	(G/Y)-N-(D/S)-(Q/N)-R-P-S
5	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR H1	F-T-F-S-(S/E)-Y-G-M-H
6	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR L1	(S/T)-G-(G/S)-(R/S)-S-N-I-(G/V)-(S/A)-(N/G/Y)-(T/D)-V-(K/H)
7	コンセンサス Joe 9 to J695	VH	（完全なＶＨ配列；配列表参照）
8	コンセンサス Joe 9 to J695	VL	（完全なＶＬ配列；配列表参照）
9	コンセンサス Y61 to J695	CDR H3	H-(G/V/C/H)-(S/T)-(H/T/V/R/I)-(D/S)-(N/K/A/T/S/F/W/H)
10	コンセンサス Y61 to J695	CDR L3	Q-S-Y-(D/S)-(Xaa)-(G/D/Q/L/F/R/H/N/Y)-T-H-P-A-L-L
11	コンセンサス Y61 to J695	CDR H2	(F/T/Y)-I-(R/A)-Y-(D/S/E/A)-(G/R)-S-(Xaa)-K-(Y/E)-Y-A-D-S-V-K-G
12	コンセンサス Y61 to J695	CDR L2	(G/Y/S/T/N/Q)-N-D-Q-R-P-S
13	コンセンサス Y61 to J695	CDR H1	F-T-F-(Xaa)-(Xaa)-(Y/H)-(G/M/A/N/S)-M-H
14	コンセンサス Y61 to J695	CDR L1	S-G-G-R-S-N-I-G-(S/C/R/N/D/T)-(N/M/I)-(T/Y/D/H/K/P)-V-K
15	コンセンサス Y61 to J695	VH	（完全なＶＨ配列；配列表参照）
16	コンセンサス Y61 to J695	VL	（完全なＶＬ配列；配列表参照）
17	Y61	CDR H3	H-G-S-H-D-N
18	Y61	CDR L3	Q-S-Y-D-R-G-T-H-P-A-L-L
19	Y61	CDR H2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G
20	Y61	CDR L2	G-N-D-Q-R-P-S
21	Y61	CDR H1	F-T-F-S-S-Y-G-M-H
22	Y61	CDR L1	S-G-G-R-S-N-I-G-S-N-T-V-K
23	Y61	VH	（完全なＶＨ配列；配列表参照）

24	Y61	VL	（完全なＶＬ配列；配列表参照）
25	J695	CDR H3	H-G-S-H-D-N
26	J695	CDR L3	Q-S-Y-D-R-Y-T-H-P-A-L-L
27	J695	CDR H2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G
28	J695	CDR L2	Y-N-D-Q-R-P-S
29	J695	CDR H1	F-T-F-S-S-Y-G-M-H
30	J695	CDR L1	S-G-S-R-S-N-I-G-S-N-T-V-K
31	J695	VH	（完全なＶＨ配列；配列表参照）
32	J695	VL	（完全なＶＬ配列；配列表参照）

【０１９７】

Ｊｏｅ９野生型の親和性成熟から産生された抗体は、K_d及びK_{off}速度を測定するために、表面プラズモン分析によって機能的に性質決定された。約０．１s^{-1}から約１×１０$^{-5}$$s^{-1}$の範囲内の$K_{off}$速度、より好ましくは、約１×１０$^{-4}$$s^{-1}$から１×１０$^{-5}$$s^{-1}$又はそれ以下の$K_{off}$を有する一連の抗体が作製された。抗体は、実施例３に記載されているように、フィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）芽球増殖を阻害する能力に関しても、インビトロで性質決定された。約１×１０$^{-6}$Ｍから約１×１０$^{-11}$Ｍ、より好ましくは、約１×１０$^{-10}$Ｍから約１×１０$^{-11}$Ｍ又はそれ以下の範囲のIC_{50}値を有する一連の抗体が作製された。

【０１９８】

従って、一態様において、本発明は、ヒトＩＬ－１２に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、０．１s^{-1}若しくはそれ以下のK_{off}速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又は１×１０$^{-6}$Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でインビトロフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、フィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。好ましい実施形態において、単離されたヒトＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-2}$$s^{-1}$若しくはそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-7}$Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。さらに好ましい実施形態において、単離されたヒトＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-3}$$s^{-1}$若しくはそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-8}$Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。より好ましい実施形態において、単離されたヒトＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-4}$$s^{-1}$若しくはそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。より好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-5}$$s^{-1}$若しくはそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-10}$Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。さらにより好ましい実施形態において、単離されたヒトＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分は、１×１０$^{-5}$$s^{-1}$若しくはそれ以下の$K_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-11}$Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。

【０１９９】

ＩＬ－１２抗体の解離速度定数（K_{off}）は、表面プラズモン共鳴（実施例５参照）によって測定することができる。一般に、表面プラズモン分析は、ＢＩＡｃｏｒｅシステ

ム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いて、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により、リガンド（バイオセンサーマトリックス上に固定された組換えヒトＩＬ－１２）と分析物（溶液中の抗体）の間のリアルタイム結合相互作用を測定する。表面プラズモン分析は、分析物（バイオセンサーマトリックス上の抗体）を固定化し、リガンド（溶液中の組換えＩＬ－１２）を提示することによっても実施することができる。ＩＬ－１２抗体又はその抗原結合部分の中和活性は、幾つかの適切なインビトロアッセイの１つ又はそれ以上を用いて評価することができる（実施例３参照）。

【０２００】

抗体重鎖及び軽鎖ＣＤＲは、抗原に対する抗体の結合特異性／親和性において重要な役割を果たしていることが周知である。従って、本発明は、Ｊｏｅ９の軽鎖及び重鎖を有するヒト抗体並びに該抗体の結合特異性／親和性を改善するために修飾されたＣＤＲを有する他の抗体を包含する。実施例１に示されているように、軽鎖及び重鎖ＣＤＲに対する一連の修飾は、ヒト抗ｈＩＬ－１２抗体の親和性成熟をもたらす。ヒトＩＬ－１２を結合するＪｏｅ９野生型からＪ６９５にわたる一連のヒト抗体の重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸配列の並置が、図１Ａから１Ｄに示されている。抗体のＣＤＲに対するコンセンサス配列モチーフは、（上表にまとめられているように）配列の並置から決定することができる。例えば、Ｊｏｅ９からＪ６９５への系統のＶＨＣＤＲ３に対するコンセンサスモチーフは、アミノ酸配列：（Ｈ／Ｓ）－Ｇ－Ｓ－（Ｈ／Ｙ）－Ｄ－（Ｎ／Ｔ／Ｙ）（配列番号１）を含み、これは、配列番号７に示されているコンセンサスＨＣＶＲの９５位から１０２位までのアミノ酸を包含する。ＶＬＣＤＲ３に対するコンセンサスモチーフは、アミノ酸配列：Ｑ－（Ｓ／Ｔ）－Ｙ－（Ｄ／Ｅ）－（Ｓ／Ｒ／Ｋ）－（Ｓ／Ｇ／Ｙ）－（Ｌ／Ｆ／Ｔ／Ｓ）－（Ｒ／Ｓ／Ｔ／Ｗ／Ｈ）－（Ｇ／Ｐ）－（Ｓ／Ｔ／Ａ／Ｌ）－（Ｒ／Ｓ／Ｍ／Ｔ／Ｌ－Ｖ／Ｉ／Ｔ／Ｍ／Ｌ）（配列番号２）を含み、配列番号８に示されているコンセンサスＬＣＶＲの８９位から９７位までのアミノ酸を包含する。

【０２０１】

従って、別の態様において、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【０２０２】

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-6}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、

ｂ）配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び

ｃ）配列番号２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する。

【０２０３】

好ましい実施形態において、抗体は、アミノ酸配列：Ｆ－Ｉ－Ｒ－Ｙ－Ｄ－Ｇ－Ｓ－Ｎ－Ｋ－Ｙ－Ｙ－Ａ－Ｄ－Ｓ－Ｖ－Ｋ－Ｇ（配列番号３）（アミノ酸配列番号７を含むコンセンサスＨＣＶＲの５０から６５位のアミノ酸を包含する。）を含むＶＨＣＤＲ２をさらに含み、及びアミノ酸配列（Ｇ／Ｙ）－Ｎ－（Ｄ／Ｓ）－（Ｑ／Ｎ）－Ｒ－Ｐ－Ｓ（配列番号４）（アミノ酸配列番号８を含むコンセンサスＬＣＶＲの５０から５６位のアミノ酸を包含する）を含むＶＬＣＤＲ２をさらに含む。

【０２０４】

別の好ましい実施形態において、抗体は、アミノ酸配列：Ｆ－Ｔ－Ｆ－Ｓ－（Ｓ／Ｅ）－Ｙ－Ｇ－Ｍ－Ｈ（配列番号５）（アミノ酸配列番号７を含むコンセンサスＨＣＶＲの２７から３５位のアミノ酸を包含する）を含むＶＨＣＤＲ１をさらに含み、及びアミノ酸配列（Ｓ／Ｔ）－Ｇ－（Ｇ／Ｓ）－（Ｒ／Ｓ）－Ｓ－Ｎ－Ｉ－（Ｇ／Ｖ）－（Ｓ／Ａ）－（Ｎ／Ｇ／Ｙ）－（Ｔ／Ｄ）－Ｖ－（Ｋ／Ｈ）（配列番号６）（アミノ酸配列番号８を含むコンセンサスＬＣＶＲの２４から３４位のアミノ酸を包含する）を含むＶＬＣＤＲ１をさらに含む。

【０２０５】

さらに別の好ましい実施形態において、本発明の抗体は、配列番号７のアミノ酸配列を

含むＨＣＶＲ及び配列番号８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含む。
【０２０６】
さらなるコンセンサスモチーフは、Ｙ６１に対して行われた変異分析に基づいて決定することができ、Ｊ６９５抗体をもたらした（図２Ａから２Ｈ中に要約されている）。図２Ａから２Ｈに示されているグラフによって示されるように、Ｙ６１の重鎖及び軽鎖ＣＤＲのある種の残基は、抗体のｈＩＬ－１２結合特性を著しく損なわずに置換をするのに適している。例えば、１２の異なるアミノ酸残基でのＣＤＲＨ１中の３０位の各置換は、抗体のK_{off}速度を著しく低下させず、この位置が、様々な異なるアミノ酸残基での置換に適していることを示唆する。従って、変異分析に基づいて（すなわち、他のアミノ酸残基による置換に適したＹ６１内の位置）、コンセンサスモチーフが決定された。重鎖及び軽鎖ＣＤＲ３に対するコンセンサスモチーフが、それぞれ、配列番号９及び１０に示されており、重鎖及び軽鎖ＣＤＲ２に対するコンセンサスモチーフが、それぞれ、配列番号１１及び１２に示されており、並びに重鎖及び軽鎖ＣＤＲ１に対するコンセンサスモチーフが、それぞれ、配列番号１３及び１４に示されている。ＶＨ及びＶＬ領域に対するコンセンサスモチーフが、それぞれ、配列番号１５及び１６に示されている。
【０２０７】
従って、一態様において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。
【０２０８】
ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、
ｂ）配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び
ｃ）配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する。
【０２０９】
好ましい実施形態において、抗体は、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＨＣＤＲ２をさらに含み、及び配列番号１２のアミノ酸配列を含むＶＬＣＤＲ２をさらに含む。
【０２１０】
別の好ましい実施形態において、抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＶＨＣＤＲ１をさらに含み、及び配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＬＣＤＲ１をさらに含む。
【０２１１】
さらに別の好ましい実施形態において、本発明の抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ及び配列番号１６のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含む。
【０２１２】
本発明の好ましい抗体であるヒト抗ｈＩＬ－１２抗体Ｙ６１は、（実施例１に記載されているように）ＣＤＲ３のＰＣＲ突然変異誘発によるＪｏｅ９野生型の親和性成熟によって作製された。Ｙ６１は、表面プラズモン共鳴によって及びインビトロ中和アッセイによって測定された、改善された特異性／結合親和性を有していた。Ｙ６１の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ３が、それぞれ、配列番号１７及び１８に示されており、Ｙ６１の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ２が、それぞれ、配列番号１９及び２０に示されており、並びにＹ６１の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ１が、それぞれ、配列番号２１及び２２に示されている。Ｙ６１のＶＨは配列番号２３のアミノ酸配列を有しており、Ｙ６１のＶＬは配列番号２４のアミノ酸配列を有している（これらの配列は、Ｊｏｅ９と並置されて、図１Ａから１Ｄにも示されている。）。
【０２１３】
従って、別の態様において、本発明は、
ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、
ｂ）配列番号１７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び
ｃ）配列番号１８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。
【０２１４】

好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２を有する。

【０２１５】

別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を有する。

【０２１６】

さらに別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１７】

ある種の実施形態において、完全長抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＡ及びＩｇＥ定常領域などの重鎖定常領域及びＫａｂａｔ（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ ＰｕｂｌｉｃａｔｉｏｎＮｏ．９１－３２４２）に記載されているその中のあらゆるアロタイプのバリアントを含む。好ましくは、抗体重鎖定常領域はＩｇＧ１重鎖定常領域である。あるいは、抗体部分は、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’$_2$）断片又は一本鎖Ｆｖ断片であり得る。

【０２１８】

Ｙ６１の各残基の修飾は、図２Ａから２Ｈに示されている抗体群の作製をもたらした。各抗体の特異性／結合親和性は、表面プラズモン共鳴によって及びインビトロ中和アッセイによって測定された。

【０２１９】

従って、別の態様において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、

ｂ）配列番号４０４から配列番号４６９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び

ｃ）配列番号５３４から配列番号５７９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する、

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

【０２２０】

好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号３３５から配列番号４０３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号５０６から配列番号５３３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２を有する。

【０２２１】

別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２８８から配列番号３３４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１及び配列番号４７０から配列番号５０５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を有する。

【０２２２】

さらに別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２２３】

ある種の実施形態において、完全長抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４

、ＩｇＭ、ＩｇＡ及びＩｇＥ定常領域などの重鎖定常領域及びＫａｂａｔ（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２）に記載されているその中のあらゆるアロタイプのバリアントを含む。好ましくは、抗体重鎖定常領域はＩｇＧ１重鎖定常領域である。あるいは、抗体部分は、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’$_2$）断片又は一本鎖Ｆｖ断片であり得る。

【０２２４】

本発明の特に好ましい組換え中和抗体Ｊ６９５は、抗体Ｙ６１の接触及び高頻度変異アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発によって作製された（以下の実施例２及びＩＩＩ節参照）。Ｊ６９５は、軽鎖ＣＤＲ２の５０位のＹ６１におけるＧｌｙからＴｙｒへの置換及び軽鎖ＣＤＲ３の９４位のＧｌｙからＴｙｒへの置換がＹ６１と異なる。Ｊ６９５の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ３が、それぞれ、配列番号２５及び２６に示されており、Ｊ６９５の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ２が、それぞれ、配列番号２７及び２８に示されており、並びにＪ６９５の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ１が、それぞれ、配列番号２９及び３０に示されている。Ｊ６９５のＶＨは配列番号３１のアミノ酸配列を有しており、Ｊ６９５のＶＬは配列番号３２のアミノ酸配列を有している（これらの配列は、Ｊｏｅ９と並置されて、図１Ａから１Ｄにも示されている。）。

【０２２５】

従って、別の態様において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する、

ｂ）配列番号２５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３を有する、及び

ｃ）配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３を有する、

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

【０２２６】

好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２を有する。

【０２２７】

別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１及び配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を有する。

【０２２８】

さらに別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分は、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する。

【０２２９】

ある種の実施形態において、完全長抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＡ及びＩｇＥ定常領域などの重鎖定常領域及びＫａｂａｔ（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２）に記載されているその中のあらゆるアロタイプのバリアントを含む。好ましくは、抗体重鎖定常領域はＩｇＧ１重鎖定常領域である。あるいは、抗体部分は、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’$_2$）断片又は一本鎖Ｆｖ断片であり得る。

【０２３０】

本発明のさらなる抗ＩＬ－１２抗体を提供するために、Ｊｏｅ９からＪ６９５までの系

列又は系統Ｙ６１からＪ６９５上の抗体のＣＤＲ３、ＣＤＲ２及びＣＤＲ１に対する好ましいコンセンサス配列中にさらなる突然変異を施すことができる。ＰＣＲ突然変異誘発などの標準的な分子生物学技術を使用し、軽鎖及び／又は重鎖ＣＤＲ中の各接触又は高頻度変異アミノ酸残基を標的化した後、本明細書に記載されているように、修飾された抗体の速度論的及び機能的分析（例えば、実施例３に記載されている中和アッセイ及び実施例５に記載されているＢＩＡｃｏｒｅ分析によって）によって、このような修飾方法を実施することができる。

【０２３１】

従って、別の態様において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-6}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害し、

ｂ）配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含み、並びに

ｃ）配列番号２のアミノ酸配列を含む軽い鎖ＣＤＲ３、配列番号４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いK_{off}速度を有する。）を含む、

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

【０２３２】

別の態様において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、1×10^{-9}Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害し、

ｂ）配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号１３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号１３のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含み、並びに

ｃ）配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号１４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号１４のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含む、

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

【０２３３】

当業者は、本発明のさらなる抗ＩＬ－１２抗体を提供するために、本発明の抗体のＣＤＲ領域に対して、例えばＹ６１中又はＪ６９５中にさらなる変異を施し得ることを理解する。このような修飾の方法は、上記に記載されているように、標準的な分子生物学技術を用いて実施することができる。修飾された抗体の機能的及び速度論的分析は、それぞれ、実施例３及び実施例５に記載されているように実施することができる。Ｊ６９５の同定をもたらしたＹ６１の各残基の修飾は図２Ａから２Ｈに示されており、実施例２に記載され

ている。

【０２３４】

従って、別の態様において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害し、

ｂ）配列番号１７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含み、並びに

ｃ）配列番号１８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号１８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いK_{off}速度を有する。）を含む、

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

【０２３５】

別の態様において、本発明は、

ａ）インビトロでのＰＨＡアッセイにおいて、１×１０$^{-9}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害し、

ｂ）配列番号２５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１又は好ましい選択的突然変異誘発位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号２５のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ２及び配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いk_{off}速度を有する。）を含み、並びに

ｃ）配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１又は選択的好ましい選択的突然変異誘発位置若しくは高頻度変異位置に１つ若しくはそれ以上のアミノ酸置換を有するこれらの変異体（前記変異体は、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ３、配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ２及び配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１を含む抗体より最大１０倍高いK_{off}速度を有する。）を含む、

単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

【０２３６】

さらに別の実施形態において、本発明は、ヒトＩＬ－１２並びにヒヒＩＬ－１２、マーモセットＩＬ－１２、チンパンジーＩＬ－１２、カニクザルＩＬ－１２及びアカゲザルＩＬ－１２からなる群から選択される少なくとも１つのさらなる霊長類ＩＬ－１２の活性を中和するが、マウスＩＬ－１２の活性を中和しない単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。

【０２３７】

ＩＩ組換えヒト抗体の選択

本発明の組換えヒト抗体は、ヒトリンパ球由来のｍＲＮＡから調製されたヒトＶＬ及びＶＨｃＤＮＡを用いて調製された組換えコンビナトリアル抗体ライブラリー、好ましくはｓｃＦＶファージディスプレイライブラリーのスクリーニングによって単離することができる。このようなライブラリーを調製し、スクリーニングする方法は、本分野において公知である。ファージディスプレイライブラリーを作製するための市販のキット（例えば、Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｐｈａｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｓｙｓｔｅｍ、カタログ番号２７－９４００－０１；及びＳｔｒａｔａｇｅｎｅ ＳｕｒｆＺＡ

Ｐ^{TM}ファージディスプレイキット、カタログ番号２４０６１２）に加えて、抗体ディスプレイライブラリーを作製及びスクリーニングする際に使用するのに特に適した方法及び試薬の例は、例えば、Ｋａｎｇ他のＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／１８６１９；Ｗｉｎｔｅｒ他のＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／２０７９１；Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇ他のＰＣＴ国際公開ＷＯ９３／０１２８８；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ他のＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／０１０４７；ＧａｒｒａｒｄらＰＣＴ国際公開ＷＯ９２／０９６９０；Ｆｕｃｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７０－１３７２；Ｈａｙ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｈｕｍ Ａｎｔｉｂｏｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ３：８１－８５；Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４６：１２７５－１２８１；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（１９９０）３４８：５５２－５５４；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３）ＥＭＢＯＪ１２：７２５－７３４；Ｈａｗｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２）ＪＭｏｌＢｉｏｌ２２６：８８９－８９６；Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ３５２：６２４－６２８；Ｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．（１９９２）ＰＮＡＳ８９：３５７６－３５８０；Ｇａｒｒａｄ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ９：１３７３－１３７７；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｔ ａｌ．（１９９９）ＮｕｃＡｃｉｄＲｅｓ１９：４１３３－４１３７；及びＢａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．（１９９１）ＰＮＡＳ８８：７９７８－７９８２に見出すことができる。

【０２３８】

この方法において使用される抗体ライブラリーは、好ましくは、ヒトＶＬ及びＶＨｃＤＮＡから調製されたｓｃＦｖライブラリーである。ｓｃＦＶ抗体ライブラリーは、ＩＬ－１２に対して結合活性を有するヒト重鎖及び軽鎖配列を選択するための抗原として組換えヒトＩＬ－１２を用いて好ましくスクリーニングされる。ＩＬ－１２のｐ３５サブユニット又はｐ７０ヘテロ二量体に対して特異的な抗体を選択するために、過剰の遊離ｐ４０サブユニットの存在下で、スクリーニングアッセイを行った。サブユニットの優先性は、例えば、実施例１に記載されているようなｍｉｃｒｏ－Ｆｒｉｇｕｅｔ滴定によって測定することができる。

【０２３９】

最初のヒトＶＬ及びＶＨセグメントが選択されたら、好ましいＶＬ／ＶＨ対の組み合わせを選択するために、選択されたＶＬ及びＶＨセグメントの異なる対をＩＬ－１２結合についてスクリーニングする「ミックス＆マッチ」実験が行われる（実施例１参照）。さらに、ｈＩＬ－１２結合に対する親和性をさらに向上させ、及び／又はｈＩＬ－１２結合に対するｏｆｆ速度定数を低下させるために、天然の免疫応答の間に抗体の親和性成熟のために必要とされるインビボ体細胞変異プロセスと類似のプロセスにおいて、好ましくはＶＨ及び／又はＶＬのＣＤＲ３領域内で、好ましいＶＬ／ＶＨ対のＶＬ及びＶＨセグメントを無作為に変異させることが可能である。このインビトロ親和性成熟は、それぞれ、ＶＨＣＤＲ３又はＶＬＣＤＲ３に対して相補的なＰＣＲプライマーを用いてＶＨ及びＶＬ領域を増幅することによって達成することが可能であり、得られるＰＣＲ産物が、ＶＨ及び／又はＶＬＣＤＲ３領域中にランダムな変異が導入されたＶＨ及びＶＬセグメントをコードするように、前記プライマーは、ある位置において、４つのヌクレオチド塩基のランダムな混合物で「スパイク」されている。これらの無作為に変異されたＶＨ及びＶＬセグメントは、ｈＩＬ－１２への結合に関して再選択し、再スクリーニングすることが可能であり、ＩＬ－１２結合に対して高い親和性と低いｏｆｆ速度を示す配列を選択することが可能である。

表２（添付書類Ａ参照）は、ディスプレイされた抗体が、インビトロ親和性成熟の結果として生じた結合特異性／親和性を変化させたことを示している。

【０２４０】

組換え免疫グロブリンディスプレイライブラリーから得られた本発明の抗ｈＩＬ－１２抗体の選択、単離及びスクリーニングに続いて、選択された抗体をコードする核酸を、ファージ粒子から（例えば、ファージゲノムから）回収し、標準的な組換えＤＮＡ技術によ

って、他の発現ベクター中にサブクローニングすることが可能である。所望であれば、本発明の他の抗体形態を作製するために、核酸にさらに操作（例えば、さらなる定常領域などの、さらなる免疫グロブリンドメインをコードする核酸への連結）を施すことが可能である。コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングによって単離された組換えヒト抗体を発現させるために、以下の第ＩＶ節でさらに詳しく記載されているように、組換え発現ベクター中に、抗体をコードするＤＮＡをクローニングし、哺乳動物宿主細胞中に導入される。

【０２４１】

ファージディスプレイ技術によってヒトＩＬ－１２結合抗体を選択する方法及びＣＤＲ領域の無作為又は部位特異的突然変異誘発による選択された抗体の親和性成熟は、実施例１にさらに詳しく記載されている。

【０２４２】

実施例１に記載されているように、ヒトＶＬ及びＶＨｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングによって、一連の抗ＩＬ－１２抗体が同定され、このうち、Ｊｏｅ９抗体をさらなる開発のために選択した。Ｊｏｅ９の重鎖可変領域をＶＢＡＳＥデータベースから選択された重鎖生殖系列配列と比較することによって、Ｊｏｅ９はＣＯＳ－３生殖系列配列と類似していることが明らかとなった。ＣＯＳ－３は、生殖系列配列のV_H３ファミリーに属する。

【０２４３】

V_H３ファミリーは、ヌクレオチド配列の相同性に基づいて７つのファミリーV_H１－V_H７にグループ分けされるヒトＶＨ生殖系列レパートリーの一部である（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，２２７，７７６－７９８ ａｎｄ Ｃｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ，１６，２３７－２４２）。V_H３ファミリーは、一員の数を最も多く含み、生殖系列のレパートリーに最大の寄与をしている。与えられた全てのヒトV_H３生殖系列抗体配列に関して、V_H３ファミリー全体内のアミノ酸配列の同一性は高い（例えば、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，２２７，７７６－７９８及びＣｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ，１６，２３７－２４２参照。）。V_H３ファミリーの２つの何れかの生殖系列ＶＨ配列間のアミノ酸配列の同一性の範囲は、約１００ＶＨ残基のうち６９から９８残基を変動する（すなわち、何れかの２つの生殖系列ＶＨ配列間で６９から９８％アミノ酸配列の相同性）。生殖系列配列の多くの対に対して、少なくとも８０又はそれ以上の同一のアミノ酸残基が存在する（すなわち、少なくとも８０％のアミノ酸配列の相同性）。V_H３ファミリーの一員間のアミノ酸配列の相同性の高い程度は、ＶＨ鎖のＣＤＲ及びフレームワーク領域中の中心部位にある種のアミノ酸残基の存在をもたらす。これらのアミノ酸残基は、ＣＤＲに対して構造的な特徴を付与する。

【０２４４】

ＣＤＲ及びフレームワーク領域中のある位置を占める中心的アミノ酸残基に基づいて、抗体構造の研究は、ＣＤＲの立体構造が標準的ＣＤＲ構造のファミリーへグループ分けできることを示している。その結果、同一の中心的アミノ酸残基を有する標準的構造を有する異なる抗体中に類似の局所的ＣＤＲ立体構造が存在する（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６，９０１－９１７ ａｎｄ Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ，３４２，８７７－８８３）。V_H３ファミリー内に、ＣＤＲ１及びＣＤＲ２標準構造に対する中心的部位にアミノ酸残基の同一性の保存が存在する（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，２２７，７９９－８１７）。

【０２４５】

ＣＯＳ－３生殖系列ＶＨ遺伝子はV_H３ファミリーの一員であり、３－３０（ＤＰ－４９）生殖系列ＶＨ対立遺伝子のバリアントである。ＣＯＳ－３は、５つ位置において、Ｊｏｅ９ＶＨアミノ酸配列と異なるに過ぎない。Ｊｏｅ９ＶＨとＣＯＳ－３間の及びＪｏｅ

９ＶＨと他のＶ$_{H}$３ファミリーの一員間のアミノ酸配列相同性の高い程度も、ＣＤＲ構造の相同性の高い程度を付与する（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，２２７，７９９－８１７；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６，９０１－９１７ ａｎｄ Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ，３４２，８７７－８８３）。

【０２４６】

当業者は、Ｊｏｅ９に対するアミノ酸配列及び標準構造の高い類似性に基づいて、他のＶ$_{H}$３ファミリーの一員も、ヒトＩＬ－１２に結合する抗体を作製するために使用できることを理解する。これは、例えば、鎖シャッフリング技術（Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２，４３３－５５）によって適切なＶＬを選択することにより、又はげっ歯類若しくは他のヒト抗体由来のＣＤＲ（本発明の抗体に由来するＣＤＲを含む。）をＶ$_{H}$３ファミリーのフレームワーク上に移植することによって実施することができる。

【０２４７】

ヒトＶλ生殖系列レパートリーは、ヌクレオチド配列相同性に基づいて、１０のファミリーへグループ分けされている（Ｗｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６４，２２０－２３２）。Ｊｏｅ９の軽鎖可変領域をＶＢＡＳＥデータベースから選択された軽鎖生殖系列の配列と比較することによって、Ｊｏｅ９はＤＰＬ８λ生殖系列と類似することが明らかとなった。Ｊｏｅ９ＶＬは、４つのフレームワーク位置において、ＤＰＬ８配列と異なるに過ぎず、他のＶ$_{\lambda}$１ファミリーの一員のフレームワーク配列と極めて相同的である。Ｊｏｅ９に対する高いアミノ酸配相同性及び標準構造の類似性に基づいて、他のＶ$_{\lambda}$１ファミリーの一員も、ヒトＩＬ－１２に結合する抗体を作製するために使用され得る。これは、例えば、鎖シャッフリング技術（Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．上記）によって適切なＶＨを選択することにより、又はげっ歯類若しくは他のヒト抗体由来のＣＤＲ（本発明の抗体に由来するＣＤＲを含む）をＶ$_{\lambda}$１ファミリーのフレームワーク上に移植することによって実施することができる。

【０２４８】

本発明の方法は、生殖系列配列のＶ$_{H}$３ファミリーの一員に由来する重鎖可変領域と及び生殖系列配列のＶ$_{\lambda}$１ファミリーの一員に由来する軽鎖可変領域とを含む、ｈＩＬ－１２に結合する組換え抗体を含むものとする。さらに、当業者は、Ｖ$_{H}$３ファミリー重鎖配列の何れの一員も、Ｖ$_{\lambda}$１ファミリー軽鎖配列の何れの一員と組み合わせ得ることを理解する。

【０２４９】

当業者は、生殖系列のアミノ酸配列の変化をもたらすＤＮＡ配列多型が集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることも理解する。このような生殖系列配列中の遺伝的多型は、天然の対立遺伝子変動に起因して、集団内の個体間に存在し得る。このような天然の対立遺伝子の変動は、典型的には、遺伝子のヌクレオチド配列の１から５％の変動をもたらす。天然の対立遺伝子の変動の結果である生殖系列配列中のこのようなヌクレオチドの変動及びその結果生じる一切のあらゆるアミノ酸多型が本発明の範囲に含まれるものとする。

【０２５０】

従って、一態様において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

ａ）ヒトＩＬ－１２に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に０．１ｓ$^{-1}$又はそれ以下のＫ$_{off}$速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のＩＣ$_{50}$でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。

ｂ）Ｖ$_{H}$３生殖系列ファミリーの一員から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（該重鎖可変領域は、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

ｃ）Ｖ$_{\lambda}$１生殖系列ファミリーの一員から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

（該軽鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

【０２５１】

好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又は抗原結合は重鎖ＣＤＲ３中に変異を有する。

【０２５２】

別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又は抗原結合は軽鎖ＣＤＲ３中に変異を有する。

【０２５３】

別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又は抗原結合は重鎖ＣＤＲ２中に変異を有する。

【０２５４】

別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又は抗原結合は軽鎖ＣＤＲ２中に変異を有する。

【０２５５】

別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又は抗原結合は重鎖ＣＤＲ１中に変異を有する。

【０２５６】

別の好ましい実施形態において、単離されたヒト抗体又は抗原結合は軽鎖ＣＤＲ１中に変異を有する。

【０２５７】

当業者は、V_H３生殖系列ファミリーの一員間の又は軽鎖V_λ１生殖系列ファミリーの一員間の高いアミノ酸配列類似性に基づいて、生殖系列配列に対する変異はヒトＩＬ－１２に結合するさらなる抗体を与え得ることを理解する。表１（添付書類Ａ参照）は、V_H３ファミリーの一員の生殖系列配列を示しており、ファミリーの一員内での著しい配列相同性を示している。表１には、V_λ１ファミリーの一員に対する生殖系列配列も示されている。Ｊｏｅ９の重鎖及び軽鎖配列が、比較として挙げられている。V_H３又はV_λ１ファミリーメンバーの生殖系列配列に対する突然変異は、例えば、本発明の抗体中で施されたのと同じアミノ酸位置において施され得る（例えば、Ｊｏｅ９中の突然変異）。ＰＣＲ突然変異誘発などの標準的な分子生物学技術を使用し、生殖系列配列中の各アミノ酸残基を標的化した後、本明細書に記載されている修飾された抗体の速度論的及び機能的分析（例えば、実施例３に記載されている中和アッセイ及び実施例５に記載されているＢＩＡｃｏｒｅ分析によって）によって、修飾を実施することができる。

従って、一態様において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

ａ）配列番号５９５から６６７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（該重鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

ｂ）配列番号６６９から６７５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（該軽鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

【０２５８】

当業者は、Ｊｏｅ９とＣＯＳ－３重鎖生殖系列配列の間及びＪｏｅ９とＤＰＬ８λ生殖系列配列の間の高いアミノ酸配列類似性に基づいて、これらの生殖系列配列のＣＤＲ領域に対する他の変異はヒトＩＬ－１２に結合するさらなる抗体を与え得ることを理解する。このような修飾の方法は、上に記載されているように、標準的な分子生物学技術を用いて実施することができる。

【０２５９】

従って、一態様において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

ａ）ヒトＩＬ－１２に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に０．１ｓ$^{-1}$若しくはそれ以下のK_{off}速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、１×１０$^{-6}$Ｍ若しくはそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。

ｂ）ＣＯＳ－３生殖系列アミノ酸配列を含む重鎖可変領域（該重鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

ｃ）ＤＰＬ８生殖系列アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（該軽鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

【０２６０】

軽鎖及び重鎖可変領域中のＣＤＲ及びフレームワーク領域中の中心的部位を占めるある種のアミノ酸残基のために、構造的な特徴がこれらの領域に付与される。特に、ＣＤＲ２及びＣＤＲ１領域は、標準的な構造上の分類に供せられる。ファミリーの一員間にはアミノ酸配列相同性の高い程度が存在するので、これらの標準的な特徴は、ファミリーの一員間に存在する。これらの標準的構造を付与するアミノ酸残基での修飾はＩＬ－１２へ結合するさらなる抗体を産生することが、当業者に理解される。修飾は、上に記載されているように、標準的な分子生物学技術を用いて実施することができる。

【０２６１】

従って、別の態様において、本発明は、以下の特徴を有する単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を特徴とする。

ａ）ヒトＩＬ－１２に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に０．１ｓ$^{-1}$又はそれ以下のK_{off}速度定数でヒトＩＬ－１２から解離し、又はインビトロでのフィトヘマグルチニン芽球増殖アッセイ（ＰＨＡアッセイ）において、１×１０$^{-6}$Ｍ又はそれ以下のIC_{50}でフィトヘマグルチニン芽球の増殖を阻害する。

ｂ）V_H３生殖系列ファミリーの一員から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（前記重鎖可変領域は、他のV_H３生殖系列ファミリーの一員から得られるＣＤＲ２と構造的に類似するＣＤＲ２及び他のV_H３生殖系列ファミリーの一員から得られるＣＤＲ１と構造的に類似するＣＤＲ１を含み、並びに前記重鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基による変異を有する。）を有する。

ｃ）V_λ１生殖系列ファミリーの一員から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（前記軽鎖可変領域は、他のV_λ１生殖系列ファミリーの一員から得られるＣＤＲ２と構造的に類似するＣＤＲ２及び他のV_λ１生殖系列ファミリーの一員から得られるＣＤＲ１と構造的に類似するＣＤＲ１を含み、並びに前記軽鎖可変領域は、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に活性増強アミノ酸残基を有する変異を有する。）を有する。

【０２６２】

本発明の組換えヒト抗体は、ＶＢＡＳＥデータベースから選択されるヒト生殖系列免疫グロブリン配列に対して相同的である可変及び定常領域を有する。（例えば、無作為突然変異誘発又はＰＣＲ突然変異誘発による）組換えヒト抗体に対する変異は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸をもたらす。また、ヒトドナーに由来した組換え抗体のライブラリーは、Ｂ細胞の発達中に起こる体細胞変異の正常な過程のために、それらの対応する生殖系列配列と異なる抗体配列を含有する。ＰＣＲ増幅によって得られた「生殖系列」配列が、真の生殖系列配置から得られるフレームワーク領域中にアミノ酸の差（すなわち、真の生殖系列配列と比較した、増幅された配列の差）をコードする場合には、これらのアミノ酸の差を変化させて真の生殖系列配列に戻すこと（すなわち、生殖系列配置へのフレームワーク残基の「逆変異」）が望ましいことがあり得ることに注目すべきである。従って、本発明は、逆変異段階を場合によって含み得る。これを実施するために、最も近い生殖系列配列と異なる変異された免疫グロブリンフレームワ

ーク配列中のアミノ酸残基を同定するために、まず、（ＶＢＡＳＥデータベース中に例として見出されるような）生殖系列によってコードされる重鎖及び軽鎖のアミノ酸を変異された免疫グロブリン重鎖及び軽鎖フレームワークアミノ酸配列と比較する。次いで、何れのヌクレオチド変化を施すべきかを決定するために遺伝子コードを用いて、変異された免疫グロブリン配列の適切なヌクレオチドを生殖系列配列に対応させるために逆変異させる。変異された免疫グロブリンフレームワーク配列の突然変異誘発は、ＰＣＲによって媒介される突然変異誘発（ＰＣＲ産物が変異を含有するように、変異されたヌクレオチドがＰＣＲプライマー中に取り込まれている。）又は部位特異的突然変異誘発などの標準的な方法によって実施される。逆変異の候補として同定された各アミノ酸の役割は、抗原結合における直接又は間接的な役割に関して調べるべきであり、変異後にヒト抗体の何れかの望ましい特徴に影響を及ぼすことが見出された全てのアミノ酸を最終ヒト抗体中に含めるべきではない。例として、選択的突然変異誘発アプローチによって同定された活性増強アミノ酸は、逆変異に供されない。突然変異誘発から生じた抗体の特徴を決定するためのアッセイには、ＥＬＩＳＡ、競合的ＥＬＩＳ、インビトロ及びインビボ中和アッセイ及び／又は（例えば、実施例３参照）様々な源（ヒト、霊長類及び／又は他の種を含む。）由来の組織切片を用いた免疫組織化学が含まれ得る。

【０２６３】

逆変異に供するアミノ酸の数を最小限に抑えるために、第二の生殖系列配列が、問題のアミノ酸の両側において、少なくとも１０、好ましくは１２のアミノ酸に対して、本発明のヒト抗体の配列と同一であり、共線性である限り、最も近い生殖系列配列と異なるが、第二の生殖系列配列中の対応するアミノ酸と同一であることが明らかとなったアミノ酸位置はそのままにすることができる。これにより、本発明のヒト抗体で処理された対象中の専門の抗原提示細胞によって免疫系に提示されるあらゆるペプチドエピトープが外来でなく、自己抗原（すなわち、第二の生殖系列配列によってコードされる免疫グロブリン）と同一であることが確保される。逆変異は、抗体最適化のあらゆる段階で行われ得る。好ましくは、逆変異は、選択的突然変異誘発アプローチの直前又は直後に行われる。より好ましくは、逆変異は、選択的変異導入アプローチの直前に行われる。

【０２６４】

ＩＩＩ．好ましい選択的突然変異誘発位置、接触及び／又は高頻度変異位置への修飾

典型的には、改善された親和性を有する抗体の選択は、上記第ＩＩ節に記載されているように、ファージディスプレイ法を用いて実施することができる。これは、ＣＤＲ残基の組み合わせを無作為に変異させること、及び異なる配列の抗体を含有する大規模なライブラリーを作製することによって達成することができる。しかしながら、これらの選択法が機能するために、抗体抗原反応は、長時間にわたって、抗原に対してより高い親和性の抗体の優先的結合を可能にするために平衡状態となる傾向がなければならない。親和性のある濃度（すなわち、抗体Ｙ６１の濃度）が達成された時点で、選択された抗ＩＬ－１２抗体の親和性を改善するために、ファージディスプレイ法が使用された場合、（おそらく、抗原とファージ粒子間のさらなる非特異的相互作用のために）平衡状態を確立することができる選択条件を決定することはできない。従って、ファージディスプレイ法によって、さらに高い親和性を有する抗体を選択することはできない。従って、少なくともある種の抗体又は抗原に対しては、高度に改善された結合特異性／親和性を有する抗体を選択する能力において、ファージディスプレイ法には限界がある。従って、この限界を克服するために、抗体のファージディスプレイ親和性成熟を必要としない選択的突然変異誘発アプローチと名づけられた方法が確立され、本発明によって提供される。この選択的突然変異誘発アプローチは、ファージディスプレイ系を用いた限界を克服するために開発されたが、この方法は、ファージディスプレイ系とともに使用することもできることに注意すべきである。さらに選択的突然変異誘発アプローチは、あらゆる抗体の活性を改善するために使用することができる。

【０２６５】

抗体の活性（例えば、親和性又は中和活性）を向上させるために、理想的には、重鎖及

び軽鎖の両方中のあらゆるＣＤＲ位置を他のあらゆる可能なアミノ酸残基に変異することが望まれる。しかしながら、抗体内には、平均して、７０のＣＤＲ位置が存在するので、このようなアプローチには、多大な時間と労力が必要である。従って、本発明の方法は、重鎖及び／又は軽鎖ＣＤＲ内のある選択された残基のみを変異させることによって、抗体の活性を改善することを可能にする。さらに、本発明の方法は、抗体の他の望ましい特性に影響を与えずに、抗体の活性を改善することを可能にする。

【０２６６】

一次配列又は可変領域内でのそれらの位置に基づいて、抗体可変領域の何れのアミノ酸残基が抗原と接触しているかを決定することは正確に予想できない。それにもかかわらず、異なる特異性を有する抗体由来の配列の並置がＫａｂａｔ他によって実施されることにより、抗体間で著しく異なる可変領域内の局所的領域としてＣＤＲが同定された（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９７１）Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ．，Ｓｃｉ．１９０：３８２－３９３，，Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２）。構造的研究は、抗原結合表面がＣＤＲ中に存在するアミノ酸残基によって形成されることを示した。ＣＤＲ外の他のアミノ酸残基は、構造的役割を果たし、又は抗原結合に直接関与することも知られている。従って、各抗原抗体対に対して、ＣＤＲ内及びＣＤＲ外のアミノ酸残基が重要であり得る。

【０２６７】

Ｔｏｍｌｉｓｏｎ他による配列並置研究によって、重鎖及び軽鎖ＣＤＲ１及びＣＤＲ２の中並びに体細胞変異が頻繁に生じる部位であるκ鎖ＣＤＲ３の一部の中の多数の位置が同定された。（Ｔｏｍｌｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２５６：８１３－８１７）。特に、位置Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３３、Ｈ３３Ｂ、Ｈ５２Ｂ、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３１Ａ、Ｌ５０、Ｌ５３、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３及びＬ９４が、体細胞変異が頻繁に生じる部位として同定された。しかしながら、この分析は、重要な重鎖ＣＤＲ３領域及び抗体結合部位の中心に位置することが知られており、抗原との重要な相互作用を与える可能性を秘める軽鎖ＣＤＲ３の区域を除外している。さらに、Ｔｏｍｌｉｓｏｎ他は、体細胞の多様性単独では、抗原結合における特定のアミノ酸の役割を必ずしも予測せず、抗原に接触する保存されたアミノ酸残基及び抗原と接触しない多岐にわたるアミノ酸残基を示唆しないことを提唱している。この結論は、抗体親和性に対する体細胞変異の役割に関する変異研究によってさらに裏付けられている（Ｓｈａｒｏｎ，（１９９０），ＰＮＡＳ，８７：４８１４－７）。高親和性抗ｐ－アゾフェニルアルソン酸（Ａｒｓ）抗体中の１９個の体細胞変異がそれらの対応する生殖系列残基と同時に置き換えられ、活性が２００倍低下した抗Ａｒｓ抗体の生殖系列バージョンが得られた。１９の体細胞変異のうち僅か３つを回復させることによって抗Ａｒｓ抗体の完全な親和性を回復することができ、抗原結合活性に寄与していない多くの体細胞変異が許容され得ることを示している。

【０２６８】

この結果は、１つには、抗体の多様性そのものによって説明することができる。未成熟Ｂ細胞は、多数の自己又は非自己抗原を認識する低親和性抗体を当初産生し得る。さらに、抗体は、親和性成熟の過程において、自己反応性を引き起こし得る配列変動を受ける場合があり得る。このような低親和性抗体の高頻度変異は自己反応性を喪失させる役割を果たし（「負の選択」）、外来抗原に対する親和性を増加させ得る。従って、多数の抗体の一次及び構造的データの分析は、（１）望ましくない抗原に対する親和性を減少させるプロセスと比較した、親和性成熟プロセスにおける体細胞高頻度変異部位の役割又は（２）あるアミノ酸が、特異的な抗原抗体対の特性にどのように寄与するかを予測する方法を与えない。

【０２６９】

抗原認識における特定のアミノ酸残基の役割を明らかにするための他の試みは、抗原抗体複合体の多数の結晶構造を分析することによって為された（ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５）。ＣＤＲ内及びＣＤＲ外に位置する位置の潜在的な役割が示された。分析された２６の構造のうち１０を超える構造において、抗原結合に関与するＣＤＲ中の位置には、重鎖中のＨ３１、Ｈ３３、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８及びＨ１００並びに軽鎖中のＬ３０Ａ、Ｌ３２、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４、Ｌ９６が含まれた。しかしながら、著者は、これら及び他の構造的データを用いた抗原接触の予測は、接触位置を過剰に又は過小に予測し得、異なる戦略を異なる抗原に対して適用しなければならないかもしれないという推測に至った。

【０２７０】

Ｐｉｎｉ他は、抗体親和性を素早く増加させるために、大規模なファージディスプレイライブラリー中の抗体ＣＤＲ配列中の複数の残基を無作為化することについて記載している（Ｐｉｎｉ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２７３：２１７６９－２１７７６）。しかしながら、Ｐｉｎｉ他によって論述されている高親和性抗体は、合計８つの位置に変異を有しており、必要とされる最も少数のアミノ酸に対して、可能な多数の組み合わせを調べなければならないために、抗体の親和性を改善するために何れの変化が絶対に必要とされるかという還元的（ｒｅｄｕｃｔｉｏｎａｒｙ）分析は非実用的なものとなる。

【０２７１】

さらに、複数残基の無作為化は、抗体の他の所望される特性を必ずしも保持し得ない。抗体の望ましい特性又は特徴は本分野において認知されており、例えば、例えば他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持及びヒト生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体配列の保持、中和能の改善が含まれる。他の望ましい特性又は特徴には、種の交叉反応性を保持する能力、エピトープ特異性を保持する能力及び哺乳動物細胞中のタンパク質高い発現濃度を保持する能力が含まれる。望ましい特性又は特徴は、ＥＬＩＳＡ、競合的ＥＬＩＳＡ、インビトロ及びインビボ中和アッセイ（例えば、実施例３参照）、必要に応じてヒト、霊長類又は他の源などの異なる源から得られた組織切片を用いた免疫組織及び一過性発現又は安定な発現を用いた哺乳動物細胞中での発現研究などの（但し、これらに限定されない。）本分野で認知された技術を用いて観察又は測定することができる。

【０２７２】

さらに、Ｐｉｎｉ他の方法は、親和性を改善するために実際に必要とされる最少数より多い変化を導入する可能性があり、ヒト対象中の抗ヒト抗体（ＨＡＭＡ）形成の引き金を引く抗体をもたらし得る。さらに、他の箇所で論述されているように、ここに示されているファージディスプレイ又はその他の関連する方法（リボソームディスプレイなど）は、抗体と抗原間のある親和性に到達すると適切に機能しなくなる場合があり得、他のファージ又はリボソーム成分及び抗原との相互作用などのさらなる相互作用のために、平衡に到達するために必要な条件が合理的な時間枠内に確立されない場合があり得る。

【０２７３】

当業者は、上記に論述されている参考文献の教示から抗体の多様性の起源に関する興味深い科学的情報を収集し得る。しかしながら、本発明は、抗体の他の適切な特徴又は望ましい特徴を保持しつつ、特異的な抗原抗体対の抗体親和性を増加させる方法を提供する。抗原結合など、複数の異なる特徴を特異的抗体に対して付与することの望ましさを考えると、これは特に重要である。

【０２７４】

出発抗体が保持される必要がある望ましい特性又は特徴を有する場合には、選択的突然変異誘発アプローチは、抗体の活性を改善しながら、これらの望ましい特性を保持するための最良の戦略であり得る。例えば、Ｙ６１の突然変異誘発において、目的は、所望の特性を保持しながら、ｈＩＬ－１２に対する親和性を増加させること及び抗体の中和能を改善することであった。Ｙ６１の所望される特性には、（１）他のタンパク質又はヒト組織

との非交叉反応性の保持、（２）優れたエピトープ特異性の保持（すなわち、好ましくはｐ７０（ｐ４０／ｐ３５）ヘテロ二量体におけるｐ４０エピトープを認識することにより、遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制する。）、及び（３）それぞれの生殖系列免疫グロブリン配列に可能な限り近い重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を有する抗体の作製が含まれた。

【０２７５】

一実施形態において、本発明の方法は、親和性及び／又は中和能を改善しながら、抗体の望ましい特性又は特徴を保持するための戦略として、選択的突然変異誘発アプローチを提供する。「選択的突然変異誘発アプローチ」という用語は上記に定義されているとおりであり、選択されたアミノ酸残基を個別に変異させる方法を含む。まず好ましい選択的突然変異誘発位置から、次いで接触位置から、次いで高頻度変異位置から、変異されるべきアミノ酸残基を選択し得る。選択された各位置は、少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ変異させることが可能であり、抗体の所望の特性及び抗体活性の改善の両者に対する変異の効果が測定される。

【０２７６】

選択的突然変異誘発アプローチは、１）好ましい選択的突然変異誘発位置、２）接触位置、３）高頻度変異位置の順序で候補位置を選択する段階、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域内の位置の配置に基づいて前記位置に順位を付ける段階（ＣＤＲ３はＣＤＲ２より好ましく、ＣＤＲ２はＣＤＲ１より好ましい）、

順位の順に、候補の好ましい選択的突然変異誘発位置、高頻度変異及び／又は接触位置を、他の全ての可能なアミノ酸残基へと個別に変異させ、活性増強アミノ酸残基を決定するために、抗体の活性に対して各変異が及ぼす影響を分析する段階、

必要であれば、各活性増強アミノ酸残基の段階的な組み合わせを作製し、及び抗体の活性に対する様々な組み合わせの効果を分析する段階、活性増強アミノ酸残基を有する変異抗体を選択し、アミノ酸置換の免疫原性の可能性に関して、アミノ酸置換の位置と種類に基づいて変異抗体を順位付けする段階を含む。生殖系列データベース中に記載されている可変領域配列とほぼ同じアミノ酸配列を含む変異抗体又は他のヒト抗体と同等のアミノ酸配列を有する変異抗体に対して最も高い順位が与えられる。生殖系列配列又は別のヒト抗体の配列の何れかにおいて稀に遭遇されるアミノ酸置換を含有する変異抗体には、より低い順位が与えられる。生殖系列配列又は別のヒト抗体の配列中で遭遇されないアミノ酸置換を有する変異抗体には、最も低い順位が与えられる。上述されているように、ＣＤＲ３中に配置された少なくとも１つの活性増強アミノ酸残基を含む変異抗体は、ＣＤＲ２中に配置されたものより好ましく、ＣＤＲ２中に配置されたものは、ＣＤＲ１中に配置されたものより好ましい。重鎖可変領域のＣＤＲは、軽鎖可変領域のＣＤＲより好ましい。

【０２７７】

変異抗体は、例えば対応する親抗体と比較したときの活性の改善に関して研究することもできる。変異抗体の活性の改善は、例えば、中和アッセイ又は表面プラズモン共鳴分析による結合特異性／親和性によって測定することができる（実施例３参照）。好ましくは、活性の改善は、親抗体より少なくとも２から２０倍高くなり得る。活性の改善は、親抗体より少なくとも「Ｘ１」から「Ｘ２」倍高くなり得、「Ｘ１」及び「Ｘ２」は２と２０の間の整数（２から２０を含む）であり、表記範囲内の範囲（例えば、２から１５、例えば、５から１０）を含む。

【０２７８】

活性増強アミノ酸残基を有する変異抗体は、少なくとも１つの他の望ましい特性が変異後に保持されているかどうかを測定するために研究することもできる。例えば、抗ｈＩＬ－１２抗体を用いて、（１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、（２）エピトープ認識の保持（すなわち、好ましくはｐ７０（ｐ４０／ｐ３５）ヘテロ二量体におけるｐ４０エピトープを認識することにより、遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制する。）、及び（３）それぞれの生殖系列免疫グロブリン配列に可能な限り近い重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を有する抗体の作製及び生殖系列配列からの差の数に基づく、何れ

がヒト免疫応答を惹起する可能性が最も低いかという測定に関して検査される。望ましい特性又は特徴の保持が起こったかどうかを決定するために、２以上の活性増強アミノ酸残基（例えば、少なくとも２つ又は少なくとも３つの活性増強アミノ酸残基）を有する抗体に対する同じ観察を行うことができる。

【０２７９】

Ｙ６１の突然変異誘発における「選択的突然変異誘発アプローチ」の使用の例が以下に記載されている。各変異Ｈ３１Ｓ→Ｅ、Ｌ５０→Ｙ又はＬ９４Ｇ→Ｙは、それぞれ、抗体の中和活性を改善した。しかしながら、組み合わせクローンを検査すると、組み合わせクローンＨ３１Ｓ→Ｅ＋Ｌ５０→Ｙ＋Ｌ９４Ｇ→Ｙの活性は、Ｌ５０→Ｙ＋Ｌ９４Ｇ→Ｙ（Ｊ６９５）より優れていなかった。従って、ＣＤＲ１の３１位の生殖系列アミノ酸残基ＳｅｒからＧｌｕへの変更は、Ｙ６１に対してＪ６９５の活性を改善させるのに不要であった。従って、選択的突然変異誘発アプローチは、最終活性に寄与する変化の最少数を特定し、これにより、最終抗体の免疫原性の可能性を低下させ、抗体の他の所望の特性を保持する。

【０２８０】

選択された突然変異誘発アプローチによって作製されたＶＨ及びＶＬをコードする単離されたＤＮＡは、第ＩＶ節に記載されているように、完全長抗体鎖遺伝子、Ｆａｂ断片遺伝子、ｓｃＦＶ遺伝子へ変換され得る。選択された突然変異誘発アプローチによって作製されたＶＨ及びＶＬ領域の発現のために、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターは、第ＩＶ節に詳しく記載されているように、様々な宿主細胞中に形質移入することができる。好ましい宿主細胞には、原核宿主細胞、例えば、イー・コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）又は真核宿主細胞、例えば、酵母細胞、例えば、Ｓ．セレビサエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓａｅ）が含まれる。最も好ましい真核宿主細胞は哺乳動物宿主細胞であり、第ＩＶ節に詳しく記載されている。

【０２８１】

選択的突然変異誘発アプローチは、他の手段による抗体の事前の親和性成熟なしに、改善された活性を有する抗体を作製する方法を提供する。選択的突然変異誘発アプローチは、逆転移に供された、改善された親和性を有する抗体を作製する方法を提供する。選択的突然変異誘発アプローチは、親和性成熟された抗体の活性を改善させる方法も提供する。

【０２８２】

当業者は、本分野で公知の標準的な抗体操作技術において、選択的突然変異誘発アプローチを使用できることを認識する。例には、ＣＤＲ移植抗体、キメラ抗体、ｓｃＦＶ断片、完全長抗体のＦａｂ断片及び他の源（例えば、トランスジェニックマウス）から得られたヒト抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【０２８３】

抗体の迅速な大規模変異分析には、リボソームディスプレイ技術を用いたインビトロ転写及び翻訳が含まれる（例えば、Ｈａｎｅｓ ｅｔ ａｌ，（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９４：４９３７－４９４２；Ｄａｌｌ Ａｃｑｕａ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃ．Ｂｉｏｌ．８：４４３－４５０；Ｈｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２５：５１３２－５１３４及びＫａｗａｓａｋｉに対して付与された米国特許第５，６４３，７６８号及び米国特許第５，６５８，７５４号参照）。選択的突然変異誘発アプローチは、リボソームディスプレイ技術を用いて選択することができる、改善された活性を有する抗体を作製する方法も提供する。

【０２８４】

本発明の方法において、抗体又はその抗原結合部分は、ＨＣＶＲ及び／又はＬＣＶＲのＣＤＲ中の各位置を変化させることによってさらに修飾される。これらの修飾はファージディスプレイされた抗体中に施すことができるが、細菌、酵母又は哺乳動物細胞発現系などの宿主系の他の種類中で発現される抗体を用いて実施できる点で、この方法は有利である。修飾のために選択されたＣＤＲ内の各位置は、接触及び／又は高頻度変異位置である

位置を基礎とする。

【０２８５】

本明細書中に定義されている好ましい接触位置及び高頻度変異位置は表３（添付書類Ａ参照）中に示されており、本発明の方法に従うそれらの修飾は、実施例２に詳しく記載されている。好ましい接触位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択される。好ましい高頻度変異位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択される。より好ましいアミノ酸残基（「好ましい選択的突然変異誘発位置」と称される）は接触及び高頻度変異位置の両方であり、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から選択される。特に好ましい接触位置は、Ｌ５０及びＬ９４からなる群から選択される。好ましい活性増強アミノ酸残基は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択される位置に位置するアミノ酸残基を置換する。より好ましい活性増強アミノ酸残基は、位置Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４に位置するアミノ酸残基を置換する。特に、好ましい活性増強アミノ酸残基は、Ｌ５０及びＬ９４からなる群から選択される位置に位置するアミノ酸残基を置換する。

【０２８６】

一般に、本発明の方法は、目的の親抗体又はその抗原結合部分の重鎖又は軽鎖のＣＤＲ内の特定の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触及び／又は高頻度変異位置を選択すること、（例えば、修飾された抗体の「ミニライブラリー」を作製するために、変異原性オリゴヌクレオチドを用いた遺伝学的手段により）その各位置を無作為に変異させること、又は活性増強アミノ酸残基を同定するために、特異的な所望のアミノ酸へある位置を変異させること、及び（例えば、非ファージディスプレイ宿主系中で）修飾された抗体を精製すること、（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ分析によってk_{off}速度を測定することによって）抗原に対する修飾された抗体の活性を測定すること、必要に応じて、他のＣＤＲ位置に対してこれらの段階を反復すること、並びに改善された活性を有することが示された各変異を組み合わせること、並びにこの組み合わせが、親抗体よりさらにより大きな活性（例えば、親和性又は中和能）を有する抗体又はその抗原結合部分を生成するかどうかを検査することを含む。

【０２８７】

従って、一実施形態において、本発明は、

ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）相補性決定領域（ＣＤＲ）内の、１）好ましい選択的突然変異誘発位置、２）接触位置又は３）高頻度変異位置を順に変異のために選択することにより、選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を特定すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価すること；

ｅ）少なくとも１つの他の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して、段階ａ）からｄ）を場合によって反復すること；

ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有する

ことが示された各変異を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。好ましくは、選択された一又は複数の抗体は、上記親抗体の少なくとも１つの望ましい特徴又は特性を喪失せずに又は保持しながら、改善された活性を有する。望ましい特徴又は特性は、本分野で認知された技術を用いて、当業者によって測定又は観察され得る。

【０２８８】

好ましい接触位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択される。好ましい高頻度変異位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択される。より好ましい、好ましい選択的突然変異誘発位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から選択される。特に好ましい接触位置は、Ｌ５０及びＬ９４からなる群から選択される。

【０２８９】

別の実施形態において、本発明は、
ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を変異のために選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）少なくとも１つの他の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して、段階ａ）からｄ）を場合によって反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０２９０】

好ましい接触位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択される。好ましい高頻度変異位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択される。より好ましい、好ましい選択的突然変異誘発位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３及びＬ９４からなる群から選択される。特に好ましい接触位置は、Ｌ５０及びＬ９４からなる群から選択される。

【０２９１】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を変異のために選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）少なくとも１つの他の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して、段階ａ）からｄ）を場合によって反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された３つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０２９２】

好ましくは、活性増強アミノ酸残基は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択される位置に位置するアミノ酸残基を置換する。

【０２９３】

各選択された位置の突然変異誘発に続いて、各クローン中の選択された位置の中に何れのアミノ酸残基が導入されたかを特定するために、変異されたクローンの配列を決定することができる。統計学的に１０から１５の特有の抗体を与えるはずであるクローンの少数（例えば、約２４）を配列決定のために選択することができるのに対して、選択された位置に全ての可能な置換を有する抗体が確実に同定されるようにするために、より多数のクローン（例えば、６０超）を配列決定することができる。

【０２９４】

一実施形態において、まず、重鎖及び／又は軽鎖のＣＤＲ３領域内の接触及び／又は高頻度変異位置が、突然変異誘発のために選択される。しかしながら、ファージディスプレイ選択を介したＣＤＲ３領域の無作為突然変異誘発によって、インビトロで既に親和性成熟されている抗体に関しては、好ましくは、まず、重鎖及び／又は軽鎖のＣＤＲ１又はＣＤＲ２内の接触位置及び／又は高頻度変異位置を選択することが好ましい場合があり得る。

【０２９５】

より好ましい実施形態において、まず、重鎖及び／又は軽鎖のＣＤＲ３領域内の好ましい選択的突然変異誘発位置が、突然変異誘発のために選択される。しかしながら、ファージディスプレイ選択を介したＣＤＲ３領域の無作為突然変異誘発によって、インビトロで既に親和性成熟されている抗体に関しては、まず、重鎖及び／又は軽鎖のＣＤＲ１又はＣＤＲ２内の好ましい選択的突然変異誘発位置を選択することが好ましい場合があり得る。

【０２９６】

別の好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発アプローチによって選択された抗体の最適化は、以下のようにして、順次に行われる。まず、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から選択される好ましい選択的突然変異誘発位置を、それぞれ、少なくとも２つの他のアミノ酸（好ましくは、５から１４の他のアミノ酸）へ変異し、増加した親和性、中和能に関して（及び、おそらくは、他の箇所に論述されてい

る少なくとも１つの他の保持された特徴又は特性に関しても）、得られた抗体を性質決定する。単一の好ましい選択的突然変異誘発位置の変異が、親和性又は中和能を全く又は十分に増加させず、好ましい選択的突然変異誘発位置中のアミノ酸を置換する複数の活性増強アミノ酸の組み合わせさえ、目標活性（親和性及び／又は中和能を含む）を満たす組み合わせ抗体をもたらさない場合には、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｌ３０Ａ及びＬ９６からなる群から得られる選択的突然変異誘発のために、さらなるアミノ酸残基が選択され、それぞれ、少なくとも２つの他のアミノ酸（好ましくは、５から１４の他のアミノ酸）へ変異され、増加した親和性、中和能に関して（及び、おそらくは、他の箇所に論述されている少なくとも１つの他の保持された特徴又は特性に関しても）、得られた抗体を性質決定する。

【０２９７】

Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｌ３０Ａ及びＬ９６からなる群から選択される単一のアミノ酸残基の変異が、活性（親和性及び／又は中和能を含む）を全く又は十分に増加させず、これらの位置中のアミノ酸を置換する複数の活性増強アミノ酸の組み合わせさえ、目標とされる活性（親和性及び／又は標的中和能を含む）を満たす組み合わせ抗体をもたらさない場合には、Ｈ３３Ｂ、Ｈ５２Ｂ及びＬ３１Ａからなる群から、選択的突然変異誘発のために、さらなるアミノ酸残基が選択され、それぞれ、少なくとも２つの他のアミノ酸（好ましくは、５から１４の他のアミノ酸）へ変異され、増加した親和性、中和能に関して（及び、おそらくは、他の箇所に論述されている少なくとも１つの他の保持された特徴又は特性に関しても）、得られた抗体を性質決定する。

【０２９８】

順次行われる選択的突然変異誘発アプローチは、所望の活性（親和性及び／又は中和能を含む）を有する抗体が同定された時点で直ちに、上記に概説されている段階の何れにおいても終了し得ることを理解すべきである。予め選択された位置の突然変異誘発が活性増強アミノ酸残基を同定したが、組み合わせ抗体が、活性（親和性及び／又は中和能を含む）に対する目標の組をなお満たさない場合、及び／又は同定された活性増強アミノ酸が他の望ましい特徴にも影響を及ぼし、従って、許容できない場合には、残りのＣＤＲ残基が突然変異誘発に供せられ得る（ＩＶ節参照）。

【０２９９】

本発明の方法は、所定の目標活性（例えば、所定の親和性及び／又は中和能及び／又は所望の特性若しくは特徴）に到達するために、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善するために使用することができる。

【０３００】

従って、本発明は、

ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から選択される好ましい選択的突然変異誘発位置を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の第一の群を作製するために、選択された好ましい選択的突然変異誘発位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；

ｄ）単一の選択的突然変異誘発位置の変異が所定の目標活性又は部分的目標活性を有する抗体又はその抗原結合部分を与えるかどうかを決定するために、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記第一の群の活性を評価すること；

ｅ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された各変異を、段階的に、親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；

ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分が所定の目標活性又は部分的目標活性を有するかどうかを決定するために、組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価するこ

と；
ｇ）段階ｄ）又はｆ）が所定の目標活性を有する抗体若しくはその抗原結合部分をもたらさず、又は部分活性を有するに過ぎない抗体をもたらした場合には、変異された抗体又はその抗原結合部分の第二の群を作製するために、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｌ３０Ａ及びＬ９６からなる群から選択されるさらなるアミノ酸残基を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ変異させること、
ｈ）Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｌ３０Ａ及びＬ９６からなる群から選択される単一のアミノ酸残基の変異が所定の目標活性又は部分活性を有する抗体又はその抗原結合部分をもたらすかどうかを決定するために、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記第二の群の活性を評価すること；
ｉ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された段階ｇ）の各変異を、段階的に、親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；
ｊ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分が所定の目標活性又は部分的目標活性を有するかどうかを決定するために、組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること；
ｋ）段階ｈ）又はｊ）が所定の目標活性を有する抗体若しくはその抗原結合部分をもたらさず、又は部分活性を有するに過ぎない抗体をもたらした場合には、変異された抗体又はその抗原結合部分の第三の群を作製するために、Ｈ３３Ｂ、Ｈ５２Ｂ及びＬ３１Ａからなる群から選択されるさらなるアミノ酸残基を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ変異させること、
ｌ）Ｈ３３Ｂ、Ｈ５２Ｂ及びＬ３１Ａからなる群から選択される単一のアミノ酸残基の変異が所定の目標活性又は部分活性を有する抗体又はその抗原結合部分をもたらすかどうかを決定するために、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記第三の群の活性を評価すること；
ｍ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された段階ｋ）の各変異を、段階的に、親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；
ｎ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分が所定の目標活性を有するかどうかを決定するために、組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価し、これにより、所定の目標活性を有する抗体又はその抗原結合部分を与えること、
を含む、所定の目標活性を達成するために、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０３０１】
ＰＣＲアセンブリー、Ｋｕｎｋｅｌ（ｄｕｔ－ｕｎｇ－）及びチオリン酸（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｓｃｕｌｐｔｏｒ　ｋｉｔ）オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発を含む多数の突然変異誘発法を使用することができる。

【０３０２】
変異された抗体を発現させるために、細菌、酵母、バキュロウイルス及び哺乳動物の発現系（及びファージディスプレイ発現系）を含む、多様な宿主発現系を使用することができる。適切な細菌性発現ベクターの例は、ｐＵＣ１１９（Ｓｆｉ）である。他の抗体発現系が本分野において公知であり、及び／又は以下のＩＶ節に記載されている。

【０３０３】
本発明の方法によって作製された、修飾された抗体又はその抗原結合部分は、選択のために、ファージディスプレイ法に依存することなく同定することができる。従って、本発明の方法は、ファージディスプレイ系中での選択によって得られるが、ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分の活性を改善するのに特に有利である。

【０３０４】
従って、別の実施形態において、本発明は、

ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された接触又は高頻度変異位置を特定すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価すること；
ｅ）少なくとも１つの他の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して、段階ｂ）からｄ）を場合によって反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された各変異を親抗体又はその抗原結合部分中に組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の親和性を改善する方法を提供する。

【０３０５】
好ましい接触位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択される。好ましい高頻度変異位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択される。より好ましい、好ましい選択的突然変異誘発位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３及びＬ９４からなる群から選択される。特に好ましい接触位置は、Ｌ５０及びＬ９４からなる群から選択される。

【０３０６】
利用可能な方法を用いて、上記に記載されている抗体の他の特性又は特徴を保持しながら、増加された結合親和性及び中和能を有する抗体を誘導することは不可能であり、又は極めて手間がかかる。しかしながら、本発明の方法は、このような抗体を容易に同定することができる。本発明の方法に供される抗体は、あらゆる採取源に由来し得る。

【０３０７】
従って、別の実施形態において、本発明は、
ａ）組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を特定すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び適切な発現系中で前記パネルを発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴に関して（前記特性又は特徴は、前記抗体中に保持される必要がある特

性又は特徴である。）、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０３０８】

好ましい実施形態において、接触位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３０９】

別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択され、並びに他の特徴は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３１０】

より好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３１１】

より好ましい実施形態において、接触位置はＬ５０及びＬ９４からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３１２】

従って、特異的な抗原に対する抗体の親和性が改善されるべきであるが、ファージディスプレイ（又はリボソームディスプレイを含む関連する系）法がもはや適用可能でなく、他の望ましい特性又は特徴が保持されるべき場合には、本発明の方法を使用することができる。従って、別の実施形態において、本発明は、

ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を特定すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸

残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴（該特性又は特徴は保持される必要がある特性又は特徴である。）に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、

ｆ）少なくとも１つの他の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して、段階ａ）からｅ）を場合によって反復すること；

ｇ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有することが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに

ｈ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された他の特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、

を含む、本発明は、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０３１３】

好ましい実施形態において、接触位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３１４】

別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３１５】

より好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３１６】

より好ましい実施形態において、接触位置はＬ５０及びＬ９４からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを

認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３１７】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された接触又は高頻度変異位置を特定すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴（該特性又は特徴は保持される必要がある特性又は特徴である。）に関して、親抗体又はその抗原結合部分に対して変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、

を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０３１８】

好ましい実施形態において、接触位置は、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３１９】

別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３２０】

より好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３２１】

より好ましい実施形態において、接触位置はＬ５０及びＬ９４からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３２２】

別の実施形態において、本発明は、

ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために相補性決定領域（ＣＤＲ）内の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を選択することにより、選択された接触又は高頻度変異位置を特定すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴（該特性又は特徴は保持される必要がある特性又は特徴である。）に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、

ｆ）少なくとも１つの他の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して、段階ａ）からｅ）を場合によって反復すること；

ｇ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性及び少なくとも１つの保持された他の特徴を有することが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに

ｈ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、改善された活性及び少なくとも１つの保持された特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、

を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０３２３】

好ましい実施形態において、接触位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３２４】

別の好ましい実施形態において、高頻度変異位置はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５３及びＬ９３からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可

溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３２５】

より好ましい実施形態において、選択的突然変異誘発のための残基はＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５２、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ５０、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４からなる群から得られる好ましい選択的突然変異誘発位置から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３２６】

より好ましい実施形態において、接触位置はＬ５０及びＬ９４からなる群から選択され、並びに他の特徴は１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３２７】

ＩＶ．他のＣＤＲ残基の修飾

最終的には、ある抗体－抗原結合対中の全てのＣＤＲ残基は、何らかの手段によって、活性増強アミノ酸残基として必要とされることが同定され、及び／又は抗原への結合のために、及び／又は抗体の他の望ましい特性若しくは特徴を保持するために直接又は間接に必要とされることが同定される。このようなＣＤＲ残基は、「好ましい選択的突然変異誘発位置」と称される。特別な状況では、抗体及び抗原の同時結晶化並びに分子モデル化などの他の手段によっても、好ましい選択的突然変異誘発位置を同定することができることに注意すべきである。

【０３２８】

上述されている好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して的を絞って活性増強アミノ酸を同定する好ましい試みが枯渇した場合、又はさらなる改良が必要とされる場合には、残りのＣＤＲ残基を、以下のように修飾し得る。上記に記載されている実施形態に従って、何れかの１つ又はそれ以上の接触又は高頻度修飾位置において抗体は既に修飾され得るが、さらなる改善が必要な場合があり得ることを理解すべきである。従って、別の実施形態において、本発明は、

ａ）親抗体又はその抗体結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；

ｃ）変異された抗体又は変異された抗体の群又はこれらの抗原結合部分を作製するために、前記選択された位置を、例えば少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又は変異された抗体の群又はこれらの抗原結合部分の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｈ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分に対して変異された抗体又は変異された抗体の群又はこれらの抗原結合

部分を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。
【０３２９】
好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。
【０３３０】
単一の残基の突然変異誘発が十分でない場合には、他の残基を含めることが可能である。従って、別の実施形態において、本発明は、
ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）ｂ）の下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６の位置でもない少なくとも１つの他のＣＤＲ位置に対して、段階ｂ）からｄ）を反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。
【０３３１】
上述されている接触又は高頻度変異位置に的を絞って活性増強アミノ酸を同定する好ましい試みが枯渇し、又はさらなる改良が必要とされ、及び突然変異誘発及びファージディスプレイ（又は関連するリボソームディスプレイ）法によって、問題の抗体をさらに最適化することができない場合には、以下に記載されているように、残りのＣＤＲ残基を修飾し得る。上記に記載されている実施形態に従って、何れかの１つ又はそれ以上の好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度修飾位置において抗体は既に修飾され得るが、さらなる改善が必要な場合があり得ることを理解すべきである。
【０３３２】
従って、別の実施形態において、本発明は、
ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択する

こと；並びに
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された接触又は高頻度変異位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で前記パネルを発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。
【０３３３】
好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。
【０３３４】
抗体の親和性を増加させるのに、単一の突然変異誘発が十分でない場合には、他の残基を突然変異誘発の中に含め得る。従って、別の実施形態において、本発明は、
ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）ｂ）の下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４の位置でもない少なくとも１つの他の位置に対して、段階ｂ）からｄ）を反復すること；
ｇ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有することが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに
ｈ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性及び他の特性又は特徴を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。
【０３３５】
好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ

４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３３６】

記載されている好ましい選択的突然変異誘発位置、接触又は高頻度変異位置に対して的を絞った活性増強アミノ酸を同定するための好ましい試みが枯渇する場合があり得、又はさらなる改良が必要とされる場合があり得、抗体の他の特性又は特徴を保持することが重要である。

【０３３７】

従って、別の実施形態において、本発明は、

ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び保持された他の特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、

を含む、他の特徴に影響を与えずに、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０３３８】

好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３３９】

単一の残基の突然変異誘発が十分でなければ、他の残基を含めることができる。従って、別の実施形態において、本発明は、

ａ）親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；

ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異すること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）少なくとも１つの他の特徴又は特性の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること；

ｅ）ｂ）の下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６の位置でもない少なくと

も１つの他のＣＤＲ位置に対して、段階ｂ）からｅ）を反復すること；
ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有し及び少なくとも１つの他の特性又は特徴に影響を与えないことが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに
ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの保持された他の特性又は特徴を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性及び少なくとも１つの他の特性又は特徴の保持を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０３４０】
好ましい選択的突然変異誘発位置、接触及び高頻度変異残基の突然変異誘発が抗体の親和性を十分に増加させず、突然変異誘発及びファージディスプレイ法（又は関連するリボソームディスプレイ法）が、もはや有用ではない場合があり得、抗体の少なくとも１つの他の特徴又は特性を保持すべきである。

【０３４１】
従って、別の実施形態において、本発明は、
ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；
ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で発現させること；
ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；
ｅ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、少なくとも１つの他の特性又は特徴の変化に関して、親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群を評価すること、
を含む、抗体又はその抗原結合部分の親和性を改善する方法を提供する。

【０３４２】
好ましくは、他の特徴又は特性は、１）他のタンパク質又はヒト組織との非交叉反応性の保持、２）エピトープ認識の保持（すなわち、ｐ４０エピトープ、好ましくはｐ７０（遊離の可溶性ｐ４０からの結合妨害を抑制するｐ４０／ｐ３５ヘテロ二量体）におけるｐ４０エピトープを認識する。）及び／又は３）生殖系列免疫グロブリン配列に近い抗体を産生することから選択される。

【０３４３】
単一の残基の突然変異誘発が十分でなければ、他の残基を含めることができる。従って、別の実施形態において、本発明は、
ａ）ファージディスプレイ系における選択によって取得されたが、前記ファージディスプレイ系中での突然変異誘発によって、その活性をさらに改善することができない組換え親抗体又はその抗原結合部分を準備すること；
ｂ）変異のために、Ｈ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１

、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６以外の相補性決定領域（ＣＤＲ）内のアミノ酸残基を選択すること；

ｃ）変異された抗体又はその抗原結合部分の群を作製するために、前記選択された位置を少なくとも２つの他のアミノ酸残基へ個別に変異させ、及び非ファージディスプレイ系中で発現させること；

ｄ）親抗体又はその抗原結合部分との比較において、変異された抗体又はその抗原結合部分の前記群の活性及び少なくとも１つの他の特性又は特徴の保持を評価することにより、活性増強アミノ酸残基を同定すること；

ｅ）ｂ）の下で選択された位置でなく、並びにＨ３０、Ｈ３１、Ｈ３１Ｂ、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ３５、Ｈ５０、Ｈ５２、Ｈ５２Ａ、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５６、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９６、Ｈ９７、Ｈ９８、Ｈ１０１、Ｌ３０、Ｌ３１、Ｌ３２、Ｌ３４、Ｌ５０、Ｌ５２、Ｌ５３、Ｌ５５、Ｌ９１、Ｌ９２、Ｌ９３、Ｌ９４及びＬ９６の位置でもない少なくとも１つの他のＣＤＲ位置に対して、段階ｂ）からｄ）を反復すること；

ｆ）組み合わせ抗体又はその抗原結合部分を形成するために、改善された活性を有し及び少なくとも１つの他の特性又は特徴に影響を与えないことが示された少なくとも２つの各活性増強アミノ酸残基を親抗体又はその抗原結合部分中で組み合わせること；並びに

ｇ）親抗体又はその抗原結合部分に対して改善された活性及び少なくとも１つの他の保持された特徴又は特性を有する抗体又はその抗原結合部分が得られるまで、親抗体又はその抗原結合部分に対して２つの活性増強アミノ酸残基を有する組み合わせ抗体又はその抗原結合部分の活性及び少なくとも１つの特性又は特徴の保持を評価すること、

を含む、抗体又はその抗原結合部分の活性を改善する方法を提供する。

【０３４４】

Ｖ．抗体の発現

本発明の抗体又は抗体部分は、宿主細胞中での、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖遺伝子の組換え発現によって調製することが可能である。抗体を組換え的に発現させるために、軽鎖及び重鎖が宿主細胞中で発現されるように、及び好ましくは、宿主細胞がその中で培養されている培地（抗体は、この培地から回収することが可能である）中に分泌されるように、抗体の免疫グロブリン軽鎖及び重鎖をコードするＤＮＡ断片を担持する１つ又はそれ以上の組換え発現ベクターで、宿主細胞が形質移入される。抗体重鎖及び軽鎖遺伝子を取得し、これらの遺伝子を組換え発現ベクター中に組み込み、ベクターを宿主細胞中に導入するために、「Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ（ｅｄｓ），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ；Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，（１９８９），Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｔ（ｅｄｓ．）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，（１９８９）及びＢｏｓｓらによる米国特許第４，８１６，３９７号」に記載されているものなどの標準的な組換えＤＮＡ法が使用される。

【０３４５】

Ｊｏｅ９ｗｔ又はＪｏｅ９関連抗体の重鎖可変領域をコードするＤＮＡ断片を得るために、第ＩＩ節に記載されているように、ヒトＩＬ－１２に対して特異的な抗体をヒトライブラリーからスクリーニングし、変異する。Ｊｏｅ９ｗｔ又はＪｏｅ９関連ＶＨ及びＶＬセグメントをコードするＤＮＡ断片が得られたら、これらの配列の突然変異誘発は、ＰＣＲ部位特異的突然変異誘発（ＰＣＲ産物が変異を含有するように、変異されたヌクレオチドがＰＣＲプライマー中に取り込まれるＰＣＲ媒介性突然変異誘発。）又は他の部位特異的突然変異誘発法などの標準的な方法によって実施される。例えば、可変領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子、Ｆａｂ断片遺伝子又はｓｃＦｖ遺伝子へ変換するために、標準的な組換えＤＮＡ技術によって、望ましい活性及び結合特異性／親和性の濃度を示したヒトＩＬ－１２抗体、例えばＪ６９５をさらに操作した。これらの操作では、ＶＬ又はＶＨをコードするＤＮＡ断片は、抗体定常領域又は柔軟なリンカーなど、別のタンパク質をコードす

る別のＤＮＡ断片へ作用可能に連結されている。

【０３４６】

本明細書において使用される「作用可能に連結された」という用語は、２つのＤＮＡ断片によってコードされたアミノ酸配列が翻訳領域内に保たれるように、２つのＤＮＡ断片が連結されることを意味するものとする。

【０３４７】

ＶＨ領域をコードする単離されたＤＮＡは、ＶＨをコードするＤＮＡを、重鎖定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３）をコードする別のＤＮＡ分子へ作用可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子へと変換することが可能である。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、本分野において公知であり（例えば、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２を参照）、これらの領域を包含するＤＮＡ断片は、標準的なＰＣＲ増幅によって取得することが可能である。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭ若しくはＩｇＤ定常領域又はＫａｂａｔ（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２）に記載されているようなその中のあらゆるアロタイプバリアントであり得るが、最も好ましいのは、ＩｇＧ１又はＩｇＧ４定常領域である。Ｆａｂ断片重鎖遺伝子の場合、ＶＨをコードするＤＮＡは、重鎖ＣＨ１定常領域のみをコードする別のＤＮＡ分子へ作用可能に連結することが可能である。

【０３４８】

ＶＬ領域をコードする単離されたＤＮＡは、ＶＬをコードするＤＮＡを、軽鎖定常領域ＣＬをコードする別のＤＮＡ分子へ作用可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子（及びＦａｂ軽鎖遺伝子）へ変換することが可能である。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、本分野において公知であり（例えば、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２を参照）、これらの領域を包含するＤＮＡ断片は、標準的なＰＣＲ増幅によって取得することが可能である。軽鎖定常領域は、κ又はλ定常領域であり得るが、最も好ましいのは、λ定常領域である。

【０３４９】

ｓｃＦｖ遺伝子を作製するために、ＶＨ及びＶＬ配列が連続する一本鎖タンパク質として発現され、ＶＬ及びＶＨ領域が柔軟なリンカーによって連結され得るように、ＶＨ及びＶＬをコードするＤＮＡ断片は、柔軟なリンカーをコードする（例えば、アミノ酸配列（$Gly_4-Ser)_3$をコードする）別の断片へ、作用可能に連結される（例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４２：４２３－４２６；Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：５８７９－５８８３；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ（１９９０）３４８：５５２－５５４参照）。

【０３５０】

本発明の抗体又は抗体部分を発現させるために、遺伝子が転写調節配列及び翻訳調節配列へ作用可能に連結されるように、部分又は完全長軽鎖及び重鎖をコードするＤＮＡ（上述のように得られる。）は発現ベクター中に挿入される。本明細書において、「作用可能に連結された」という用語は、ベクター内の転写調節配列及び翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳を制御するという所期の機能を果たすように、抗体遺伝子がベクター中

に連結されていることを意味するものとする。発現ベクター及び発現調節配列は、使用される発現宿主細胞と適合的であるように選択される。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は、別個のベクター中に挿入することが可能であり、又はより典型的には、両遺伝子は同一の発現ベクター中に挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法（例えば、抗体遺伝子断片及びベクター上の相補的制限部位の連結、又は制限部位が存在しなければ、平滑末端連結）によって発現ベクター中に挿入される。Ｊ６９５又はＪ６９５関連軽鎖又は重鎖配列の挿入の前に、発現ベクターは、既に、抗体定常領域配列を担持し得る。例えば、Ｊ６９５又はＪ６９５関連ＶＨ及びＶＬ配列を完全長抗体遺伝子へと変換するための１つのアプローチは、ＶＨセグメントがベクター内のＣＨセグメントへ作用可能に連結され、及びＶＬセグメントがベクター内のＣＬセグメントへ作用可能に連結されるように、それぞれ、既に重鎖定常領域及び軽鎖定常領域をコードする発現ベクター中にそれらを挿入することである。これに加えて又はこれに代えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることが可能である。シグナルペプチドが、抗体鎖遺伝子のアミノ末端へ、翻訳領域内に連結されるように、抗体鎖遺伝子はベクター中にクローニングすることが可能である。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド又は異種のシグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）とすることが可能である。

【０３５１】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中の抗体鎖遺伝子の発現を調節する制御配列を担持する。「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー及び抗体鎖遺伝子の転写又は翻訳を調節する他の発現調節要素（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むものとする。このような制御配列は、例えば、「Ｇｏｅｄｄｅｌ，Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９０）」に記載されている。制御配列の選択など、発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現濃度などの要因に依存し得ることが、当業者によって理解される。哺乳動物の宿主細胞発現のために好ましい制御配列には、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）（ＣＭＶプロモーター／エンハンサーなど）、サルウイルス４０（ＳＶ４０）（ＳＶ４０プロモーター／エンハンサーなど）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ））及びポリオーマに由来するプロモーター及び／又はエンハンサーなど、哺乳動物細胞中でタンパク質発現の高い濃度を誘導するウイルス要素が含まれる。ウイルス制御要素及びその配列のさらなる記述については、例えば、Ｓｔｉｎｓｋｉによる米国特許第５，１６８，０６２号、Ｂｅｌｌらによる米国特許４，５１０，２４５号及びＳｃｈａｆｆｎｅｒらによる米国特許第４，９６８，６１５号、Ｂｕｊａｒｄらによる米国特許第５，４６４，７５８号及びＢｕｊａｒｄらによる米国特許第５，６５４，１６８号を参照されたい。

【０３５２】

抗体鎖遺伝子及び制御配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中でのベクターの複製を制御する配列（例えば、複製起点）及び選択可能なマーカー遺伝子など、さらなる配列を担持し得る。選択可能なマーカー遺伝子は、その中にベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、全てＡｘｅｌ他による米国特許第４，３９９，２１６号、米国特許第４，６３４，６６５号及び米国特許第５，１７９，０１７号を参照されたい。）。例えば、典型的には、選択可能なマーカー遺伝子は、その中にベクターが導入されている宿主細胞に対して、Ｇ４１８、ハイグロマイシン又はメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。好ましい選択可能なマーカー遺伝子には、（メトトレキサート選択／増幅とともに、ｄｈｆｒ－宿主細胞中で使用するための）ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子及びｎｅｏ遺伝子（Ｇ４１８選択用）が含まれる。

【０３５３】

軽鎖及び重鎖を発現させるために、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターは、標準的な技術によって、宿主細胞中に形質移入される。「形質移入」という用語の様々な形態は

、原核又は真核宿主細胞中への外来ＤＮＡの導入のために一般に使用される多様な技術、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラン形質移入などを包含するものとする。原核又は真核宿主細胞の何れの中でも、本発明の抗体を発現することは理論的に可能であるが、真核細胞、特に、哺乳動物細胞は、原核細胞に比べて、適切に折りたたまれ、免疫学的に活性な抗体を組み立てて、分泌する傾向がより大きいので、真核細胞中での抗体の発現、最も好ましくは哺乳動物宿主細胞中での抗体の発現が最も好ましい。本発明の組換え抗体を発現するための好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（Ｕｒｌａｕｂ ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ，（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７７：４２１６－４２２０に記載されており、例えば、Ｒ．Ｊ．Ｋａｕｆｍａｎ ａｎｄ Ｐ．Ａ．Ｓｈａｒｐ（１９８２）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５９：６０１－６２１に記載されているようにＤＨＦＲ選択可能マーカーとともに使用されるｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む。）、ＮＳ０骨髄腫細胞、ＣＯＳ細胞及びＳＰ２細胞が含まれる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞中に導入すると、宿主細胞中で抗体の発現を可能とするのに十分な期間にわたって、又は、より好ましくは、宿主細胞がその中で増殖されている培地中への抗体の分泌を可能とするのに十分な期間にわたって、宿主細胞を培養することによって抗体が産生される。＞抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて、培地から回収することが可能である。

【０３５４】

Ｆａｂ断片又はｓｃＦｖ分子など、完全な状態の抗体の部分を作製するために、宿主細胞を使用することも可能である。上記の手技に対する改変は、本発明の範囲に属することが理解される。例えば、本発明の抗体の軽鎖又は重鎖の何れか（両鎖ではない）をコードするＤＮＡで宿主細胞を形質移入することが望ましい場合があり得る。ｈＩＬ－１２への結合に必要でない軽鎖及び重鎖の一方又は両方をコードするＤＮＡの一部又は全部を除去するために、組換えＤＮＡ技術も使用し得る。このような末端切断されたＤＮＡ分子から発現された分子も、本発明の抗体によって包含される。さらに、１つの重鎖及び１つの軽鎖が本発明の抗体であり、他の重鎖及び軽鎖が、ｈＩＬ－１２以外の抗原に対して特異的である二機能性抗体は、標準的な化学架橋法によって、本発明の抗体を第二の抗体へ架橋することによって作製し得る。

【０３５５】

本発明の抗体又はその抗原結合部分の組換え発現用の好ましいシステムでは、リン酸カルシウムによって媒介された形質移入によって、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、ｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞中に導入される。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子は、遺伝子の転写の高い濃度を誘導するために、各々、（ＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター制御要素又はＳＶ４０エンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター制御要素などの、例えば、ＳＶ４０，ＣＭＶ、アデノウイルスなどに由来する）エンハンサー／プロモーター制御要素へ作用可能に連結されている。組換え発現ベクターは、メトトレキサート選択／増幅を用いて、ベクターで形質移入されたＣＨＯ細胞の選択を可能とするＤＨＦＲ遺伝子も担持する。選択された形質転換体宿主細胞は、抗体重鎖及び軽鎖の発現を可能とするために培養され、完全な状態の抗体が培地から回収される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞を形質移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培地から抗体を回収するために、標準的な分子生物学的技術が使用される。本発明の抗体又はその抗原部分は、ヒト免疫グロブリン遺伝子が遺伝子導入された動物（例えば、マウス）中で発現させることができる（例えば、Ｔａｙｌｏｒ，Ｌ．Ｄ．ｅｔａｌ．（１９９２）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：６２８７－６２９５参照）。本発明の抗体又はその抗原結合部分を発現するトランスジェニック植物を作製するために、植物細胞を修飾することも可能である。

【０３５６】

前記に照らして、本発明の別の態様は、本発明の抗体及び抗体部分の組換え発現のために使用することができる核酸、ベクター及び宿主細胞組成物に関する。好ましくは、本発明は、Ｊ６９５のＣＤＲ又はＪ６９５の完全な重鎖及び／又は軽鎖可変領域をコードする

単離された核酸を特徴とする。従って、一実施形態において、本発明は、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＪ６９５重鎖ＣＤＲ３をコードする抗体重鎖可変領域をコードする単離された核酸を特徴とする。好ましくは、抗体重鎖可変領域をコードする核酸は、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＪ６９５重鎖ＣＤＲ２をさらにコードする。より好ましくは、抗体重鎖可変領域をコードする核酸は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＪ６９５重鎖ＣＤＲ１をさらにコードする。さらにより好ましくは、単離された核酸は配列番号３１のアミノ酸配列（Ｊ６９５の完全なＶＨ領域）を含む抗体重鎖可変領域をコードする。

【０３５７】

別の実施形態において、本発明は、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＪ６９５軽鎖ＣＤＲ３をコードする抗体軽鎖可変領域をコードする単離された核酸を特徴とする。好ましくは、抗体軽鎖可変領域をコードする核酸は、配列番号２８のアミノ酸配列を含むＪ６９５軽鎖ＣＤＲ２をさらにコードする。さらに好ましくは、抗体軽鎖可変領域をコードする核酸は、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＪ６９５軽鎖ＣＤＲ１をさらにコードする。さらにより好ましくは、単離された核酸は配列番号３２のアミノ酸配列（Ｊ６９５の完全なＶＬ領域）を含む抗体軽鎖可変領域をコードする。

【０３５８】

本発明は、抗体重鎖と抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターも提供する。例えば、一実施形態において、本発明は、

ａ）配列番号３１のアミノ酸を含む可変領域を有する抗体重鎖及び

ｂ）配列番号３２のアミノ酸配列を含む可変領域を有する抗体軽鎖をコードする組換え発現ベクターを提供する。

【０３５９】

本発明は、本発明の組換え発現ベクターの１つ又はそれ以上がその中に導入されている宿主細胞も提供する。好ましくは、宿主細胞は哺乳動物宿主細胞であり、より好ましくは、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、ＮＳ０細胞又はＣＯＳ細胞である。さらに、本発明は、本発明の組換えヒト抗体タンパク質が合成されるまで、適切な培地中で、本発明の宿主細胞を培養することによって、本発明の組換えヒト抗体を合成する方法を提供する。この方法は、培地から組換えヒト抗体を単離することをさらに含むことが可能である。

【０３６０】

ＶＩ．医薬組成物及び医薬の投与

本発明の抗体及び抗体部分は、ヒト対象に投与するのに適した医薬組成物中に取り込ませることが可能である。典型的には、医薬組成物は、本発明の抗体又は抗体部分と及び医薬として許容される担体とを含む。本明細書において使用される「医薬として許容される担体」には、生理的に適合性がある、全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤が含まれる。医薬として許容される担体の例には、水、生理的食塩水、リン酸緩衝化された生理的食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの１つ又はそれ以上及びこれらの組み合わせが含まれる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖、マニトール、ソルビトールなどの多価アルコール又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。医薬として許容される担体は、抗体又は抗体部分の保存寿命又は有効性を増大する、湿潤剤又は乳化剤、防腐剤又は緩衝剤などの補助物質の微量をさらに含み得る。

【０３６１】

本発明の抗体及び抗体部分は、非経口投与に適した医薬組成物中に取り込ませることが可能である。好ましくは、抗体又は抗体部分は、０．１から２５０ｍｇ／ｍＬの抗体を含有する注射可能溶液として調製される。注射可能溶液は、フリント又は琥珀色容器、アンプル又は予め充填された注射器中の液体又は凍結乾燥された剤形から構成され得る。緩衝液は、Ｌ－ヒスチジン（１から５０ｍＭ）、最適には５から１０ｍＭ、ｐＨ５．０から７．０（最適にはｐＨ６．０）であり得る。他の適切な緩衝液には、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム又はリン酸カリウムが含まれるが、これらに限定されない。０から３００ｍＭの濃度に（最適には、液体剤形に対して１５０ｍＭ）の溶液

の毒性（ｔｏｘｉｃｉｔｙ）を修飾するために、塩化ナトリウムを使用することが可能である。凍結保護剤、原則として０から１０％（最適には、０．５から１．０％）のスクロースを、凍結乾燥された剤形に対して含めることができる。他の適切な凍結保護剤には、トレハロース及びラクトースが含まれる。凍結乾燥された剤形に対して、充填剤、原則として、１から１０％のマニトール（最適には、２から４％）を含めることが可能である。液体及び凍結乾燥された両剤形中で、安定化剤、原則として１から５０ｍＭのＬ－メチオニン（最適には、５から１０ｍＭ）を使用することが可能である。他の適切な充填剤には、グリシンアルギニンが含まれ、０から０．０５％のポリソルベート－８０（最適には、０．００５から０．０１％）として含めることが可能である。さらなる界面活性剤には、ポリソルベート２０及びＢＲＩＪ界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。

【０３６２】

好ましい実施形態において、医薬組成物は、約０．０１ｍｇ／ｋｇから１０ｍｇ／ｋｇの用量で抗体を含む。抗体のより好ましい用量には、隔週で投与される１ｍｇ／ｋｇ又は毎週投与される０．３ｍｇ／ｋｇが含まれる。

【０３６３】

本発明の組成物は、様々な形態であり得る。これらには、例えば、液体溶液（例えば、注射可能及び注入可能な溶液）、分散液又は懸濁液、錠剤、丸薬、粉末、リポソーム及び坐剤などの液体、半固体及び固体剤形が含まれる。好ましい形態は、予定される投与の様式及び治療用途に依存する。典型的な好ましい組成物は、他の抗体を用いたヒトの受動免疫に対して使用される組成物と同様の組成物など、注射可能溶液又は注入可能溶液の形態である。投与の好ましい様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい実施形態において、抗体は、静脈内注入又は注射によって投与される。別の好ましい実施形態において、抗体は、筋肉内又は皮下注射によって投与される。

【０３６４】

治療組成物は、典型的には、製造及び保存の条件下で、無菌及び安定でなければならない。組成物は、溶液、ミクロエマルジョン、分散液、リポソーム又は高薬物濃度に適したその他の秩序化された構造として製剤化することが可能である。無菌注射可能溶液は、上記に列記されている成分の１つ又は組み合わせを加えた適切な溶媒中に、必要な量で活性化合物（すなわち、抗体又はその抗体部分）を取り込ませ、必要に応じて、その後、ろ過された滅菌によって調製することが可能である。一般に、分散液は、塩基性分散溶媒及び上記に列記されたものから得られる必要なその他の成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化合物を取り込ませることによって調製される。無菌注射可能溶液の調製のための無菌凍結乾燥粉末の場合には、調製の好ましい方法は、予め滅菌ろ過されたその溶液から、あらゆる追加の所望される成分を加えた活性成分の粉末を与える真空乾燥及び噴霧乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合に必要な粒径を維持することによって、また、界面活性剤を使用することによって維持することができる。注射可能組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物中に含めることによって実現することができる。

【０３６５】

多くの治療用途において、好ましい投与経路／様式は皮下注射、静脈内注射又は注入であるが、本発明の抗体及び抗体部分は、本分野で公知の様々な方法によって投与することが可能である。当業者によって理解されるように、投与の経路及び／又は様式は、所望される結果に応じて変動する。ある種の実施形態において、活性化合物は、インプラント、経皮パッチ及び微小封入された送達系を含む徐放製剤など、迅速な放出に対して化合物を保護する担体とともに調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸などの生物分解可能な生体適合性ポリマーを使用することが可能である。このような製剤の多くの調製方法は、特許が付与されており、又は、一般に当業者に公知である。例えば、「Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，

Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ，ｅｄ．，ＭａｒｃｅｌＤｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９７８」を参照されたい。

【０３６６】

ある種の実施形態において、本発明の抗体又は抗体部分は、例えば、不活性希釈剤又は同化可能な食用担体とともに、経口投与され得る。また、化合物（及び、所望であれば、その他の成分）は、硬若しくは軟殻ゼラチンカプセル中に封入され、錠剤へと圧縮され、又は患者の食事中に直接取り込ませ得る。経口治療的投与の場合、化合物は、賦形剤とともに取り込ませることができ、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウェハースなどの形態で使用し得る。非経口投与以外によって本発明の化合物を投与するために、その不活化を妨げるための物質で化合物を被覆し、又はその不活化を妨げるための物質とともに化合物を同時投与することが必要であり得る。

【０３６７】

補助的活性化合物も、組成物中に取り込ませることが可能である。ある実施形態において、本発明の抗体又は抗体部分は、ＩＬ－１２活性が有害である疾患を治療するのに有用である、１つ又はそれ以上のさらなる治療剤とともに共製剤化され、及び／又は同時投与される。例えば、本発明の抗ｈＩＬ－１２抗体又は抗体部分は、他の錠剤を結合する１つ又はそれ以上のさらなる抗体（例えば、他のサイトカインを結合する抗体又は細胞表面分子を結合する抗体）とともに共製剤化され、及び／又は同時投与され得る。さらに、本発明の１つ又はそれ以上の抗体は、先述の治療剤の２つ又はそれ以上と組み合わせて使用され得る。このような組み合わせ療法は、投与される治療剤のより低い投薬量を有利に使用し得るので、様々な単独療法に伴って生じ得る毒性又は合併症が回避される。組み合わせ療法の一部として本発明の抗体が使用される場合、抗体のみが対象に投与される場合と比べて、抗体のより低用量が望ましい場合があり得ることが当業者に理解される（例えば、組み合わせ療法の使用を通じて、相乗的な治療効果が達成され得、次いで、所望の治療効果を達成するために抗体のより低用量の使用を可能とする。）。

【０３６８】

インターロイキン１２は、免疫及び炎症性要素を伴う様々な疾患と関連する病変において重要な役割を果たしている。これらの疾病には、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、アトピー性皮膚炎、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に伴う急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的脈管炎、慢性活動性肝炎、ぶどう膜炎、敗血性ショック、毒物ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生虫症、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性多内分泌腺機能低下症候群Ｉ型及び多内分泌腺機能低下症候群ＩＩ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸窮迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸炎性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネラ関連関節症、脊椎関節症（ｓｐｏｎｄｙｌｏａｒｔｈｏｐａｔｈｙ）、アテローム性疾患／アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱症、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状ＩｇＡ病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全症関連疾患、Ｃ型肝炎、一般的な可変免疫不全症（ｃｏｍｍｏｎ ｖａｒｉｅｄ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ）（一般的な可変低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊、卵巣障害、早発閉経、線維性肺疾患、突発性線維化性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織病関連間質性肺疾患、混合性結合

組織病関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、脈管性びまん性肺疾患、ヘモジデリン関連意疾患、薬物誘導性間質性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風性関節炎、自己免疫性肝炎、１型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性又はルポイド肝炎）、２型自己免疫性肝炎（抗ＬＫＭ抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖、黒色表皮腫を伴うＢ型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、突発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、特定不能な腎疾患、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的脈管炎（ｖａｓｕｌｉｔｉｓ）、ライム病、円板状エリテマトーデス、突発性又は特定不能な男性不妊、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、インシュリン依存性糖尿病、交感性眼炎、結合組織病による二次性肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スティル病、全身性硬化症、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、突発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫性自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性脈管炎及び白斑が含まれる。本発明のヒト抗体及び抗体部分は、リウマチ性脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎など、自己免疫疾患、特に、炎症を伴う自己免疫疾患を治療するために使用することができる。

【０３６９】

好ましくは、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、第ＶＩＩ節により詳しく記載されているように、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病及び乾癬を治療するために使用される。

【０３７０】

本発明のヒト抗体又は抗体部分は、自己免疫疾患及び炎症性疾患の治療において有用な１つ又はそれ以上のさらなる治療剤とともに投与することもできる。

【０３７１】

本発明の抗体又はその抗原結合部分は、このような疾病を治療するために、単独で又は組み合わせて使用することができる。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、単独で、又は追加の因子、例えば治療剤と組み合わせて使用することが可能であり、前記追加の因子は、その意図される目的に対して、当業者によって選択されることを理解すべきである。例えば、追加の因子は、本発明の抗体によって治療されている疾病又は症状を治療するのに有用であると本分野で認識されている治療剤であり得る。追加の因子は、治療用組成物に有益な属性を付与する因子、例えば、組成物に粘性をもたらす因子とすることも可能である。

【０３７２】

本発明に含まれるべき組み合わせは、それらの意図される目的に対して有用な組み合わせであることをさらに理解すべきである。以下に記されている因子は、例示を目的とするものであって、限定を意図するものではない。本発明の一部である組み合わせは、本発明の抗体及び以下のリストから選択される少なくとも１つの追加の因子であり得る。当該組み合わせにおいて、形成された組成物がその意図される機能を実行することが可能であれば、組み合わせは、２以上の追加の因子、例えば、２又は３個の追加の因子を含むこともできる。

【０３７３】

好ましい組み合わせは、ＮＳＡＩＤとも称される非ステロイド性抗炎症薬（イブプロフェンのような薬物が含まれる。）である。他の好ましい組み合わせは、プレドニソロンなどのコルチコステロイドである。ステロイド使用の周知の副作用は、本発明の抗ＩＬ－１２抗体と組み合わせて患者を治療するときに必要とされるステロイド用量を徐々に減らすことによって、低減することが可能であり、又は除去することさえ可能である。本発明の抗体又は抗体部分とともに組み合わせることが可能な関節リウマチに対する治療剤の非限

定的な例には、以下のもの：サイトカイン抑制性抗炎症薬（ＣＳＡＩＤ）；他のヒトサイトカイン又は成長因子（例えば、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ及びＰＤＧＦ）に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ＣＤ９０又はＣＤ１５４を含むこれらのリガンド（ｇｐ３９又はＣＤ４０Ｌ）などの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。

【０３７４】

治療剤の好ましい組み合わせは、異なる点で、自己免疫及びこれに続く炎症カスケードを妨害し得る。好ましい例には、キメラヒト化又はヒトＴＮＦ抗体、Ｄ２Ｅ７、（１９９６年２月９日に出願された米国出願番号０８／５９９，２２６号）、ｃＡ２（Ｒｅｍｉｃａｄｅ™）、ＣＤＰ５７１、抗ＴＮＦ抗体断片（例えば、ＣＤＰ８７０）及び可溶性ｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体、これらの誘導体、ｐ７５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｅｎｂｒｅｌ™）又はｐ５５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｌｅｎｅｒｃｅｐｔ）、可溶性ＩＬ－１３受容体（ｓＩＬ－１３）及びＴＮＦα変換酵素（ＴＡＣＥ）阻害剤などのようなＴＮＦアンタゴニストが含まれる。同様にＩＬ－１阻害剤（Ｖｘ７４０又はＩＬ－１ＲＡなどのインターロイキン－１変換酵素阻害剤）は、同じ理由のために有効であり得る。他の好ましい組み合わせには、インターロイキン１１、抗Ｐ７ｓ及びｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド（ＰＳＧＬ）が含まれる。さらに別の好ましい組み合わせは、ＩＬ－１２機能と平行して、ＩＬ－１２機能に依存して、又はＩＬ－１２と協調して作用し得る自己免疫応答の他の中心的プレーヤーである。特に好ましいのは、ＩＬ－１８抗体又は可溶性ＩＬ－１８受容体又はＩＬ－１８結合タンパク質などのＩＬ－１８アンタゴニストである。ＩＬ－１２及びＩＬ－１８は、重複しているが、異なる機能を有しており、両者に対するアンタゴニストの組み合わせは、最も有効であり得ることが示されている。さらに別の好ましい組み合わせは、非枯渇抗ＣＤ４阻害剤である。さらに別の好ましい組み合わせには、抗体、可溶性受容体又は拮抗性リガンドを含む、共同刺激経路ＣＤ８０（Ｂ７．１）又はＣＤ８６（Ｂ７．２）のアンタゴニストが含まれる。

【０３７５】

本発明の抗体又はその抗原結合部分は、メトトレキサート、６ＭＰ、アザチオプリン、スルファサラジン、メサラジン、オルサラジン、クロロキニン／ヒドロキシクロロキン、ペニシラミン、アウロチオマラート（筋肉内及び経口）、アザチオプリン、コルヒチン（ｃｏｃｈｉｃｉｎｅ）、コルチコステロイド（経口、吸入及び局所注射）、β－２アドレナリン受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテラール）、キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウム及びオキシトロピウム、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン系薬物、ＴＮＦα又はＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子（例えば、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８又はＭＡＰキナーゼ阻害剤）、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤（例えば、Ｖｘ７４０）、抗Ｐ７、ｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド（ＰＳＧＬ）、ＴＮＦα変換酵素（ＴＡＣＥ）阻害剤、キナーゼ阻害剤などのＴ細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体及びその誘導体（例えば、可溶性ｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体及び誘導体ｐ７５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｅｎｂｒｅｌ™）及びｐ５５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｌｅｎｅｒｃｅｐｔ）、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ、可溶性ＩＬ－１３受容体（ｓＩＬ－１３））並びに炎症抑制性サイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３及びＴＧＦβ）などの因子とも組み合わされ得る。好ましい組み合わせには、メトトレキサート又はレフルノミドが

含まれ、中度又は重度の関節リウマチの症例では、シクロスポリンが含まれる。

【０３７６】

本発明の抗体又は抗体部分とともに組み合わせることが可能な炎症性腸疾患に対する治療剤の非限定的な例には、以下のもの：ブデノシド；上皮成長因子；コルチコステロイド；シクロスポリン；スルファサラジン；アミノサリチラート；６－メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リポキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バサラジド；抗酸化剤；トロンボキサン阻害剤；ＩＬ－１受容体アンタゴニスト；抗ＩＬ－１βモノクローナル抗体；抗ＩＬ－６モノクローナル抗体；成長因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル－イミダゾール化合物；他のヒトサイトカイン又は成長因子（例えば、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ及びＰＤＧＦ）に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ９０これらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤薬、補体阻害剤、アドレナリン系薬物、ＴＮＦα又はＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子（例えば、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８又はＭＡＰキナーゼ阻害剤）、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤（例えば、Ｖｘ７４０）、抗Ｐ７、ｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド（ＰＳＧＬ）、ＴＮＦα変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などのＴ細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体及びその誘導体（例えば、可溶性ｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ、可溶性ＩＬ－１３受容体（ｓＩＬ－１３））及び炎症抑制性サイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３及びＴＧＦβ）などの因子とも組み合わされ得る。

【０３７７】

抗体又は抗原結合部分を組み合わせることが可能な、クローン病に対する治療剤の好ましい例には、以下のもの：ＴＮＦアンタゴニスト、例えば、抗ＴＮＦ抗体、Ｄ２Ｅ７（１９９６年２月９日に出願された米国特許出願０８／５９９，２２６）、ｃＡ２（Ｒｅｍｉｃａｄｅ™）、ＣＤＰ５７１、抗ＴＮＦ抗体断片（例えば、ＣＤＰ７８０）、ＴＮＦＲ－Ｉｇ構築物（ｐ７５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｅｎｂｒｅｌ™）及びｐ５５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｌｅｎｅｒｃｅｐｔ））、抗ｐ７、ｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド（ＰＳＧＬ）、可溶性ＩＬ－１３受容体（ｓＩＬ－１３）及びＰＤＥ４阻害剤が含まれる。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えば、ブデノシド及びデキサメタゾンと組み合わせることが可能である。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、スルファサラジン、５－アミノサリチル酸及びオルサラジンなどの因子と、並びにＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインの合成又は作用を妨害する因子（例えば、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤（例えば、Ｖｘ７４０）及びＩＬ－１ｒａとも組み合わされ得る。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、Ｔ細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤６－メルカプトプリンとともに使用され得る。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、ＩＬ－１１と組み合わせることが可能である。

【０３７８】

本発明の抗体又は抗体部分と組み合わせることが可能な、多発性硬化症のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：コルチコステロイド；プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスポリン；メトトレキサート；４－アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン－β１ａ（Ａｖｏｎｅｘ；Ｂｉｏｇｅｎ）；インターフェロン－β１ｂ（Ｂｅｔａｓｅｒｏｎ；Ｃｈｉｒｏｎ／Ｂｅｒｌｅｘ

）；コポリマー１（Ｃｏｐ－１；Ｃｏｐａｘｏｎｅ；ＴｅｖａＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌＩｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）；高圧酸素；静脈内免疫グロブリン；クラブリビン；他のヒトサイトカイン又は成長因子（例えば、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ及びＰＤＧＦ）に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ９０又はこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノール酸・モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン系薬物、ＴＮＦα又はＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子（例えば、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８又はＭＡＰキナーゼ阻害剤）、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤（例えば、Ｖｘ７４０）、抗Ｐ７、ｐ－セレクチン糖タンパク質リガンド（ＰＳＧＬ）、ＴＡＣＥ阻害剤、キナーゼ阻害剤などのＴ細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体及びその誘導体（例えば、可溶性ｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ、可溶性ＩＬ－１３受容体（ｓＩＬ－１３））及び炎症抑制性サイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３及びＴＧＦβ）などの因子とも組み合わされ得る。

【０３７９】

抗体又はその抗原結合部分を組み合わせることが可能な、多発性硬化症のための治療剤の好ましい例には、インターフェロン－β、例えば、ＩＦＮβ１ａ及びＩＦＮ１ｂ；コパキソン、コルチコステロイド、ＩＬ－１阻害剤、ＴＮＦ阻害剤並びにＣＤ４０リガンド及びＣＤ８０に対する抗体が含まれる。

【０３８０】

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体又は抗体部分の「治療的有効量」又は「予防的有効量」が含まれ得る。「治療的有効量」は、所望の治療的結果を達成するために必要な投薬量で、及び所望の治療的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。抗体又は抗体部分の治療的有効量は、病状、年齢、性別及び個体の体重並びに抗体又は抗体部分が、個体内で所望の応答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。治療的有効量は、抗体又は抗体部分のあらゆる毒性効果又は有害効果が、治療的に有益な効果によって凌駕される量でもある。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために必要な投薬量で、及び所望の予防的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。疾病のより初期段階の前に又は疾病のより初期段階において、予防的投薬が対象に使用されるので、通例、予防的有効量は、治療的有効量を下回る。

【０３８１】

投薬計画は、最適な所望の応答（例えば、治療的応答又は予防的応答）を与えるように調整され得る。例えば、単一のボーラスを投与することができ、複数の分割された用量を経時的に投与することができ、又は、治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例的に減少若しくは増加させ得る。投与の容易さ及び投薬量の均一性のために、投薬単位形態で非経口組成物を製剤化することが特に有利である。本明細書において使用される投薬単位形態は、治療されるべき哺乳動物対象に対する統一された投薬として適した、物理的に分離された単位を表し、各単位は、必要とされる医薬担体とともに、所望される治療効果を生じるように計算された活性化合物の所定量を含有する。本発明の投薬単位形態に対する規格は、（ａ）活性化合物の特有の特徴及び達成されるべき具体的な治療効果又は予防効果並びに（ｂ）個体における過敏症の治療用のこのような活性化合物を配合する分野に固有の制約によって規定され、これらに直接依存する。

【０３８２】

本発明の抗体又は抗体部分の治療的又は予防的有効量に対する典型的な非限定的範囲は、０．０１から２０ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは１から１０ｍｇ／ｋｇ、さらに好ましくは０．３から１ｍｇ／ｋｇである。緩和されるべき症状の種類及び重度に応じて、投薬量の値が変動し得ることに注意すべきである。何れの具体的な対象に対しても、個別の要求に従って、及び組成物の投与を行い又は監督している者の専門的判断に従って、特異的投薬計画を経時的に調整すべきこと、及び、本明細書に記載されている投薬量の範囲は典型的なものに過ぎず、特許請求の範囲に記載されている組成物の範囲又は実施を限定することを意図したものではないことをさらに理解すべきである。

【０３８３】

ＶＩＩ．本発明の抗体の使用

ｈＩＬ－１２に結合することができるので、本発明の抗ＩＬ－１２抗体又はその一部は、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）又は組織免疫組織化学など慣用のイムノアッセイを用いて、（例えば、血清又は血漿などの生物学的試料中で）ｈＩＬ－１２を検出するために使用することが可能である。本発明は、本発明の抗体又は抗体部分を生物試料と接触させること、及びｈＩＬ－１２に結合された抗体（又は抗体部分）又は結合していない抗体（又は抗体部分）を検出することにより、生物試料中のｈＩＬ－１２を検出することを含む生物試料中のｈＩＬ－１２を検出する方法を提供する。抗体は、結合した又は結合していない抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接又は間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質及び放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド又はフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例には、ルミノールが含まれる。適切な放射性材料の例には、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ又は^{3}Ｈが含まれる。

【０３８４】

抗体を標識することに代えて、検出可能な物質で標識されたｒｈＩＬ－１２標準及び標識されていない抗ｈＩＬ－１２抗体を用いた競合イムノアッセイによって、生物学的流体中においてｈＩＬ－１２のアッセイを行うことが可能である。このアッセイでは、生物試料、標識されたｒｈＩＬ－１２標準及び抗ｈＩＬ－１２抗体を組み合わせ、標識されていない抗体へ結合された標識されたｒｈＩＬ－１２標準の量を測定する。生物試料中のｈＩＬ－１２の量は、抗ｈＩＬ－１２抗体へ結合された、標識されたｒｈＩＬ－１２標準の量に反比例する。

【０３８５】

本発明のＹ６１及びＪ６９５抗体は、ヒト以外の種から得られたＩＬ－１２、特に、霊長類から得られたＩＬ－１２を検出するために使用することもできる。例えば、Ｙ６１は、カニクイザル及びアカゲザル中のＩＬ－１２を検出するために使用することができる。Ｊ６９５は、カニクイザル、アカゲザル及びヒヒ中のＩＬ－１２を検出するために使用することができる。しかしながら、何れの抗体も、マウス又はラットＩＬ－１２と交叉反応しない（実施例３、Ｆ項参照）。

【０３８６】

本発明の抗体及び抗体部分は、インビトロ（実施例３参照）及びインビボ（実施例４参照）でｈＩＬ－１２活性を中和することができる。従って、本発明の抗体及び抗体部分は、例えば、ｈＩＬ－１２を含有する細胞培養中において、ヒト対象中において、又は本発明の抗体と交叉反応するＩＬ－１２を有する他の哺乳動物対象（例えば、ヒヒ、カニクイザル及びアカゲザルなどの霊長類）中において、ＩＬ－１２活性を阻害するために使用することができる。好ましい実施形態において、本発明は、ヒトＩＬ－１２並びにヒヒＩＬ－１２、マーモセットＩＬ－１２、チンパンジーＩＬ－１２、カニクザルＩＬ－１２及び

アカゲザルＩＬ－１２からなる群から選択される少なくとも１つのさらなる霊長類ＩＬ－１２の活性を中和するが、マウスＩＬ－１２の活性を中和しない単離されたヒト抗体又はその抗原結合部分を提供する。好ましくは、ＩＬ－１２はヒトＩＬ－１２である。例えば、ｈＩＬ－１２を含有する又は含有すると疑われる細胞培養中において、本発明の抗体又は抗体部分は、培養中のｈＩＬ－１２活性を阻害するために培地へ添加することができる。

【０３８７】

別の実施形態において、本発明は、ＩＬ－１２活性が有害である疾患に罹患している対象中のＩＬ－１２活性を阻害する方法を提供する。ＩＬ－１２は、多岐にわたる疾患の病態生理への関与が推測されている（Ｗｉｎｄｈａｇｅｎ ｅｔ ａｌ．，（１９９５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８２：１９８５－１９９６；Ｍｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ａｎｄ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ．４１：３０６－３１４；Ｂｕｃｈｔ ｅｔ ａｌ，（１９９６）Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０３：３４７－３６７；Ｆａｉｓ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ Ｒｅｓ．１４：２３５－２３８；Ｐａｒｒｏｎｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．１５０：８２３－８３２；Ｍｏｎｔｅｌｅｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ．１１２：１１６９－１１７８及びＢｅｒｒｅｂｉ ｅｔ ａｌ．，（１９９８）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ１５２：６６７－６７２；Ｐａｒｒｏｎｃｈｉ ｅｔ ａｌ（１９９７）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．１５０：８２３－８３２）。本発明は、このような疾患に罹患している対象中のＩＬ－１２活性が阻害されるように、本発明の抗体又は抗体部分を前記対象に投与することを含む、このような疾患に罹患している対象中のＩＬ－１２活性を阻害するための方法を提供する。好ましくは、ＩＬ－１２はヒトＩＬ－１２であり、及び対象はヒト対象である。あるいは、対象は、本発明の抗体が交叉反応するＩＬ－１２を発現している哺乳動物であり得る。さらなる主題は、（例えば、ｈＩＬ－１２の投与によって、又はｈＩＬ－１２導入遺伝子の発現によって）ｈＩＬ－１２がその中に導入された哺乳動物であり得る。本発明の抗体は、治療目的のために、ヒト対象へ投与することができる（以下で、さらに論述されている）。さらに、本発明の抗体は、獣医学的目的のために、又はヒト疾病の動物モデルとして、前記抗体と交叉反応するＩＬ－１２を発現しているヒト以外の哺乳動物へ投与することができる。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体の治療効果（例えば、投薬量の検査及び投与の時間経過）を評価するために有用であり得る。

【０３８８】

本明細書において、「ＩＬ－１２活性が有害である疾患」という用語には、当該疾患に罹患している対象中にＩＬ－１２が存在することが示されており、又はＩＬ－１２の存在が当該疾患の病態生理の原因であることが疑われており、若しくは当該疾患の悪化に寄与する要因であることが疑われている疾病及びその他の疾患を含むものとする。従って、ＩＬ－１２活性が有害である疾患は、ＩＬ－１２活性の阻害が疾患の症候及び／又は進行を緩和すると予想される疾患である。このような疾患は、例えば、当該疾患に罹患している対象の生物学的流体中のＩＬ－１２の濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液などの中のＩＬ－１２の濃度の増加）によって証明され得、ＩＬ－１２の濃度の増加は、例えば、上述されているような抗ＩＬ－１２抗体を用いて検出することができる。ＩＬ－１２活性が有害である疾患の多数の例が存在する。一実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、本明細書に記載されている疾病又は疾患を治療するための治療法において使用することができる。別の実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、本明細書に記載されている疾病又は疾患を治療するための医薬を製造するために使用することができる。幾つかの非限定的な具体的疾患の治療における本発明の抗体及び抗体部分の使用が、以下でさらに論述されている。

【０３８９】

Ａ．関節リウマチ：

インターロイキン－１２は、関節リウマチなどの炎症性疾患において役割を果たしてい

ると推測されている。関節リウマチ患者から得られた滑液中に誘導性ＩＬ－１２ｐ４０メッセージが検出されており、関節リウマチを有する患者から得られた滑液中にＩＬ－１２が存在することが示されている（例えば、Ｍｏｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ，（１９９８）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　ａｎｄ　Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ４１：３０６－３１４参照）。関節リウマチ滑膜の下内層中に、ＩＬ－１２陽性細胞が存在することが見出されている。本発明のヒト抗体及び抗体部分は、例えば、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、ライム関節炎、リウマチ性脊椎炎、骨関節炎及び通風性関節炎を治療するために使用することができる。典型的には、抗体又は抗体部分は全身的に投与されるが、ある種の疾患に関しては、抗体又は抗体部分の局所投与が有益であり得る。本発明の抗体又は抗体部分は、自己免疫疾患の治療において有用な１つ又はそれ以上のさらなる治療剤とともに投与することもできる。

【０３９０】

関節リウマチに対するコラーゲン誘導性関節炎（ＣＩＡ）マウスモデルにおいて、関節炎の前に、抗ＩＬ－１２ｍＡｂ（ラット抗マウスＩＬ－１２モノクローナル抗体Ｃ１７．１５）でマウスを処理すると、疾病の開始が大幅に抑制され、疾病の発生及び重度が低下された。関節炎の発生後早期に抗ＩＬ－１２ｍＡｂで処理することによって、重度が低減されたが、疾病の発症後、抗ＩＬ－１２ｍＡｂでマウスをより遅く処理すると、疾病の重度に対して最小限の効果を有した。

【０３９１】

Ｂ．クローン病

インターロイキン－１２は、炎症性腸疾患であるクローン病においても役割を果たしている。ＩＦＮ－γ及びＩＬ－１２の増加した発現が、クローン病を有する患者の腸粘膜中で起こる（例えば、Ｆａｉｓ　ｅｔ　ａｌ，（１９９４）Ｊ　Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ　Ｒｅｓ．１４：２３５－２３８；Ｐａｒｒｏｎｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ，（１９９７）Ａｍｅｒ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５０：８２３－８３２；Ｍｏｎｔｅｌｅｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ，（１９９７）Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ１１２：１１６９－１１７８；Ｂｅｒｒｅｂｉ　ｅｔ　ａｌ，（１９９８）Ａｍｅｒ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５２：６６７－６７２参照）。抗ＩＬ－１２抗体は、大腸炎のマウスモデル（例えば、ＴＮＢＳ誘導性大腸炎ＩＬ－２ノックアウトマウス及び最近では、ＩＬ－１０ノックアウトマウス）において、疾病を抑制することが示された。従って、本発明の抗体及び抗体部分は、炎症性腸疾患の治療において使用することができる。

【０３９２】

Ｃ．多発性硬化症

インターロイキン－１２は、多発性硬化症の中心的媒介物質であると推測されている。誘導性ＩＬ－１２ｐ４０メッセージ又はＩＬ－１２自体の発現が、多発性硬化症を有する患者の病変中に示され得る（Ｗｉｎｄｈａｇｅｎ　ｅｔ　ａｌ，（１９９５）Ｊ　Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８２：１９８５－１９９６，　Ｄｒｕｌｏｖｉｃ　ｅｔ　ａｌ，（１９９７）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｌ．Ｓｃｉ．１４７：１４５－１５０）。多発性硬化症を有する慢性の進行性患者は、ＩＬ－１２の上昇した循環濃度を有する。多発性硬化症を有する患者から得たＴ細胞及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を用いた研究によって、Ｔｈ１型免疫応答をもたらす進行性多発性硬化症の基礎として、自己永続的な一連の免疫相互作用が明らかとなった。Ｔ細胞からのＩＦＮ－γの増加した分泌は、ＡＰＣによる増加したＩＬ－１２産生をもたらし、増加したＩＬ－１２産生は、Ｔｈ１型免疫活性化及び疾病の慢性状態に至るサイクルを永続化した（Ｂａｌａｓｈｏｖ　ｅｔ　ａｌ，（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９４：５９９－６０３）。多発性硬化症におけるＩＬ－１２の役割は、多発性硬化症のマウス及びラット実験的アレルギー性脳脊髄炎（ＥＡＥ）モデルを用いて調べられてきた。マウスでの多発性硬化症の再発性弛張性寛解型ＥＡＥモデルにおいて、抗ＩＬ－１２ｍＡｂでの前処理は麻痺を遅延させ、臨床スコアを低下させた。麻痺のピーク時又はその後の寛解期の間における抗ＩＬ－１２ｍＡｂでの処理は、臨床スコアを低下させた。従って、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、ヒト中の多発性硬化症を伴

う症候を緩和させる役割を果たし得る。

【０３９３】

Ｄ．インシュリン依存性糖尿病

インターロイキン－１２は、インシュリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）の重要な媒介物質として推測されてきた。ＩＬ－１２の投与によって、ＮＯＤマウス中にＩＤＤＭが誘導され、抗ＩＬ－１２抗体はＩＤＤＭの養子免疫伝達モデルにおいて保護的であった。初期発症ＩＤＤＭ患者は、幾つかの残存する膵島細胞機能が維持されている所謂「ハネムーン期間」をしばしば経験する。これらの残存する膵島細胞はインシュリンを産生し、投与されたインシュリンより良好に血中グルコース濃度を制御する。これらの初期発症患者の抗ＩＬ－１２抗体での処理は、膵島細胞のさらなる破壊を抑制し、これにより、インシュリンの体内源を維持し得る。

【０３９４】

Ｅ．乾癬

インターロイキン－１２は、乾癬における中心的媒介物質として推測されている。乾癬は、ＴＨ１型サイトカイン発現プロファイルを伴う急性及び慢性の皮膚病変を伴う。（Ｈａｍｉｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ　Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１：２２５－２３１；Ｔｕｒｋａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．１：６９０－６９９）。罹病したヒトの皮膚試料中に、ＩＬ－１２ｐ３５及びｐ４０ｍＲＮＡが検出された。従って、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、乾癬などの慢性的皮膚疾患を緩和させる役割を果たし得る。

【０３９５】

以下の実施例によって、本発明がさらに例示されるが、いかなる意味においても、以下の実施例を限定的なものと解釈してはならない。本願を通じて引用されている、引用された全ての参考文献（文献、発行された特許及び公開された特許出願を含む）の内容は、参照により、本明細書へ明示的に組み込まれる。本明細書に添付されている全ての表（添付書類Ａ）の内容が参照により組み込まれることをさらに理解すべきである。

【０３９６】

表１　ＷＨ３ファミリー生殖系列のアミノ酸配列
付番はＫａｂａｔに従う
（比較のためにＪｏｅ９ＶＨを含めた。）

配列番号	生殖系列 VH	10	20	30	40
			CDR H1	CDR H2	
594	dp-29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	DHYMD	WVRQAPGKGLEWVG	RTRNKANSYTTEYAASVKG	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
595	DP-30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	DHYMS	WVRQAQGKGLELVG	LIRNKANSYTTEYAASVKG	RLTISREDSKNTLYLQMSSLKTEDLAVYYCAR
596	HC15-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	DHYMS	WVRQAQGKGLELVG	LIRNKANSYTTEYAASVKG	RLTISREDSKNTHYLQMSSLKTEDLAVYYCAR
597	VRD26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	DHYMS	WVRQAQGKGLELVG	LIRNKANSYTTEYAASVKG	RLTISREDSKNTLYLQMSSLKTEDLAVYYCAR
598	DP-31	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVS	GISW..NSGSIGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK
599	DP-32	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFD	DYGMS	WVRQAPGKGLEWVS	GINW..NGGSTGYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR
600	DP-33	EVQLVESGGVVVQPGRSLRLSCKASGFTFD	DYTMH	WVRQAPGKGLEWVS	LISW..DGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK
601	dp-35	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS	YI..SSSGSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
602	VH3-8	QVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS	YI..SSSSSYTNYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
603	yac-9	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	GSAMH	WVRQASGKGLEWVG	RIRSKANSYATAYAASVKG	RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
604	dp-38	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	NAWMS	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
605	LSG2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	NAWMS	WVRQAPGKGLEWVG	RIESKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
606	LSG3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	NAWMS	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
607	LSG4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	NAWMS	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTNYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
608	LSG6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	NAWMN	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
609	v3-15	EVQLVESGGALVKPGGSLRLSCAASGFTFS	NAWMS	WVRQAPGKGLEWVG	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
610	dp-39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCPASGFTFS	NHYMS	WVRQAPGKGLEWVS	YI..SGDSGYTNYADSVKG	RFTISRDNAWNSPYLQMNSLRAEDTAVYYCVK
611	dp-40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	NRYTS	WVRQAPGKGLEWVS	YS..SGNSGYTNYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVK
612	dp-59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	NSDMH	WVKQAPGKGLEWVS	GV..SWNGSRTHYADSVKG	RFIISRDNSRNTLYLQTNSLRAEDTAVYYCVR
613	v3-16p	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	NSDMH	WARKAPGKGLEWVS	GV..SWNGSRTNYVDSVKR	RFIISRDNSRNSLYLQKNRRAEDMAVYYCVR
614	v3-19p	TVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFS	NSDMH	WVRQAPGKGLEWVS	GV..SWNGSRTNYADSVKG	RFIISRDNSRNFLYQQMNSLRPEDMAVYYCVR
615	v3-13	EVHLVESGGGLVQPGGALRLSCAASGFTFS	NYDMH	WVRQATGKGLEWVS	AN..GTAG.DTYYPGSVKG	RFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR
616	DP-42	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS	SNYMS	WVRQAPGKGLEWVS	VI.Y..SGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
617	dp-44	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVS	AI...GTGGGTYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR
618	DP-45	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVS	AI...GTGGGTYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR
619	dp-47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AI..SGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
620	21m	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEYVS	AI..SSNGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYVQMSSLRAEDTAVYYCVK
621	P1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEYVS	AI..SSNGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYVQMSSLRAEDTAVYYCVK
622	v3-64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEYVS	AI..SSNGGSTYYAMSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR
623	vh26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AI..SGSGGSTYYGDSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
624	B25	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYTDSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
625	b32a	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
626	B37	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAR
627	B43	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
628	B48	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
629	B52	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
630	B54	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
631	cos-8	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
632	dp-46	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
633	F2H	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEYVS	AI..SSNGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYVQMSSLRAEDTAVYYCVK
634	F3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEYVS	AI..SSNGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
635	F7	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFAISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
636	hv3005	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
637	P2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
638	dp-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYDMH	WVRQATGKGLEWVS	AI..GTAG.DTYYPGSVKG	RFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR
639	dp-50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYEMN	WVRQAPGKGLEWVS	YI..SSSGSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

【表２】

表１　ＷＨ３ファミリー生殖系列のアミノ酸配列
付番はＫａｂａｔに従う
（比較のためにＪｏｅ９ＶＨを含めた。）

配列番号	生殖系列 VH	10	20	30	40
			CDR H1		CDR H2
640	B1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRLRARLCITVRE
641	B13	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
642	B18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
643	B26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
644	B28E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
645	B29E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
646	B29M	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
647	B30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..WYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
648	B32M	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEGTAVYYCAR
649	cos-3	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	FI..RYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
650	dp-49	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
651	dp-50	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..WYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
652	P6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..WYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
653	P9E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVRX---
654	v3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..SYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
655	v3-33	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VI..WYDGSNKYYADSAKG	RFTISRDNSTNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAR
656	dp-51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYSMN	WVRQAPGKGLEWVS	YI..SSSSSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
657	dp-77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	SYSMN	WVRQAPGKGLEWVS	SI..SSSSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
658	HHG4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	SYSMN	WVRQAPGKGLEWVS	SI...SSSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
659	v3-21	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	SYSMN	WVRQAPGKGLEWVS	SI..SSSSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
660	v3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYSMN	WVRQAPGKGLEWVS	YI..SSSSSTIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
661	DP-52	EDQLVESGGGLVQPGGSLRPSCAASGFAFS	SYVLH	WVRRAPGKGPEWVS	AIG...TGGDTYYADSVMG	RFTISRDNAKKSLYLQMNSLIAEDMAVYYCAR
662	cos-6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMH	WVRQAPGKGLVWVS	RI..NSDGSSTSYADSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
663	dp-53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMH	WVRQAPGKGLVWVS	RI..NSDGSSTSYADSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
664	dp-54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQAPGKGLEWVA	NI..KQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
665	dp-87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMH	WVRQAPGKGLVWVS	RI..NSDGSSTSYADSMKG	QFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCTR
666	VH3-11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQAPGKGLEWVA	NI..KQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
667	JOE9 VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	FI..RYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMKSLRAEDTAVYYCTT

表１　ＷＨ３ファミリー生殖系列のアミノ酸配列
付番はＫａｂａｔに従う
（比較のためにＪｏｅ９ＶＨを含めた。）

配列番号	gene*	生殖系列 VH	CDR L1	CDR L2	CDR L3
668	1b	DP15	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC SGSSSNIGNNY.VS WYQQLPGTAPKLLIY DNNKRPS GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC GTWDSSLSA
669	1d	DP54	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC SGSSSDMGNYA.VS WYQQLPGTAPKLLIY ENNKRPS GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLWPEDEADYYC LAWDTADRA
670	1c	DP12	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC SGSSSNIGSNT.VN WYQQLPGTAPKLLIY SNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC AAWDDSLNG
671	1g	DP13	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC SGSSSNIGSNY.VY WYQQLPGTAPKLLIY RNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC AAWDDSLSG
672	1a	DP31	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISC SGSSSNIGNN.AVN WYQQLPGKAPKLLIY YDDLLPS GVSDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC AAWDDSLNG
673	1f	DP79	QSVLTQPPSVSGNPGQRVTISC TGSSSNIGAGYYVH WYQQLPGTAPKLLIY GNSNRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYC QAWDSNLNA
674	1e	DP18	QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISC TGSSSNIGAGYDVH WYQQLPGTAPKLLIY GNSNRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC QSYDSSLSG
675		JOE9 VL	SYVLTQPRSVSGSPGQSVTISC SGGRSNIGSNT.VK WYQQLPGTAPKLLIY GNDQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC QSYDSRLRG

*Williams, JMB, 1996, 264, 220-232

【０３９７】

【表３】

表２

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PHA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
Joe9 wt	77	SGSYDY	110	QSYDSSLRGSRV	1.00E-01	1.50E-06	1.00E-06	
Joe9 wt IgG1	77	SGSYDY	110	QSYDSSLRGSRV			5.00E-07	
70-1	78	HGSHDN	110	Joe9 wt	1.34 e-2		2.00E-07	
70-1 IgG1	78	HGSHDN	110	Joe9 wt			2.00E-07	
70-2	79	HGSYDY	110	Joe9 wt	3.30E-02		3-5.0E-7	
70-7	80	RRRSNY	110	Joe9 wt	1.29E-01		3-5.0E-7	
70-13	81	SGSIDY	110	Joe9 wt	7.20E-02		3-5.0E-7	
78-34	77	wt	111	QSYDRGFTGSRV	1.64 e-2	2.00E-07	6.00E-07	
78-25	77	wt	112	QSYDSSLRGSRV	5.00E-02			
78-28	77	wt	112	QSYDSSLRGSRV	4.66E-02			
78-35	77	wt	113	QSYDSSLTGSRV	4.99E-02	4.00E-07		
79-1	77	wt	114	QSYDSSLWGSRV		2.00E-07	6.00E-07	
101-14	79	70-2	111	78-34	7.52E-03			
101-9	79	70-2	113	78-35	8.54E-03			
101-19	81	70-13	111	78-34	4.56E-02			
101-8	81	70-13	111	78-34	1.01E-02			
101-4	81	70-13	113	78-35	9.76E-03			
101-5	81	70-13	113	78-35	4.45E-02			
101-11 (12)	78	70-1	111	78-34	4.5 e-3		3.00E-08	
101-11 IgG1	78	70-1	111	78-34		1.60E-09		
26-1 (2,3)	78	70-1	114	79-1	7.4 e-3		6.00E-08	
136-9	82	HGSHDD	115	QTYDISESGSRV	3.20E-03			
136-10	82	HGSHDD	116	QSYDRGFTGSRV	1.40E-03	2.00E-09		
136-14	83	HGSHDN	117	QTYDRGFTGSRV	1.10E-03	3.00E-10	1.00E-07	
136-15	83	HGSHDN	118	QTYDKGFTGSSV	7.4 e-4	1.00E-10	2.00E-09	
136-15 生殖系列	83	HGSHDN	118	QTYDKGFTGSSV	4.60E-04		6.00E-09	
136-16	83	HGSHDN	119	QSYDRRFTGSRV	6.10E-04	3.00E-10	5.00E-09	
136-17	83	HGSHDN	120	QSYDWNFTGSRV	2.90E-05	2.00E-09	7.00E-09	
136-18	83	HGSHDN	121	QSYDRGFTGSRV	1.10E-03	8.00E-10		
136-21	83	HGSHDN	122	QSYDNGFTGSRV	4.20E-04	2.00E-09		
136-24	83	HGSHDN	123	QSYDNAVTASKV	8.90E-04	1.00E-09		

表2

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PRA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
101-11	84	TT HGSHDN WGQG	124	QSYDRGFTGSRV	4.5x10-3	2X10-9	2.00E-08	
136-15M1	85	AK	124	QSYDRGFTGSRV		4.00E-10		
149-4	86	.. .. .S..	124	.....	1.37x10-3	8x10-11	3.00E-09	
149-5	87	.. ..T	125	QSYDSSLWGTRV	1.02x10-3	1.2x10-10	3.00E-09	
149-6	84	.. ..	124	.....	2.73x10-3	6x10-10	2.00E-09	
149-7	84	.. ..	126	.....D.....	1.13x10-3	9x10-10	3.00E-09	
149-8	88	K.			2.33x10-3	3x10-9		
149-9	89	K. ....H.	127	...E.....M.	3.54x10-3	1.8x10-10		
149-11	90	.. .. .S..	128	....N....A..	1.43x10-2	2x10-10	4.00E-09	
149-12	84	.. ..			3.73x10-3	neutralising		
149-13	84	.. ..			2.22x10-3	5x10-10		
149-14	91	.. .R..N.				1.5x10-10	6.00E-09	
	92	TT HGSHDN	124	QSYDRGFTGSRV				
156-1	93	.. ..T	126	.....D.....	5.00E-03			
156-2	93	.. ..T	129	.....R.....				
156-3	93	.. ..T	128	....N....A..	9.00E-03			
156-4	93	.. ..T	127	...E.....SM.				
156-5	93	.. ..T	130	.T..K.....S.				
156-6	92	.. ..	126	.....D.....	3.00E-03			
156-7	92	.. ..	129	.....R.....				
156-8	92	.. ..	128	....N....A..				
156-9	92	.. ..	127	...E.....SM.				
156-10	92	.. ..	130	.T..K.....S.				
156-11	94	.K	126	.....D.....				
156-12	94	.K	129	.....R.....				
156-13	94	.K	128	....N....A..				
156-14	94	.K	127	...E.....SM.				
156-15	94	.K	130	.T..K.....S.				
156-16	93	.. ..T	124	.....				
156-17	92	.. ..	125	....SSLW.T..	6.00E-03			
156-18	93	.. ..T	125	....SSLW.T..				

表２

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PHA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
	92	TT HGSHDN	124	QSYDRGFTGSRV				
103-1	95	.. Q.R...	124	.....	2.9x10-3			
103-2	96	K. R.R...	130	.T..K.....S.	7.3x10-4	7.00E-11	1.00E-09	
103-3	97	.. ..K	124	.....	2.5x10-3			
103-6			131	.....D...T..	4.5x10-4			
103-7	98	.. ..D	131	.....D...T..	3.7x10-4	1.40E-10	1.00E-09	
103-8	99	K.	130	.T..K.....S.	3.3x10-4	6.00E-11	1.50E-09	
103-14 & 9	100	KT HGSHDN	132	QSYDRGFTGSMV	6.7 e-4	4.00E-11	1.20E-09	
103-8 & 2	100	KT HGSHDN	133	QTYDKGFTGSSV	5.3 e-4		1.50E-09	
103-4	101	TT HGSHDN	134	QSYDRGFTGARV	1.6 e-4	8.60E-11	9.00E-10	
103-152	101	TT HGSHDN	135	QSYERGFTGARV		8.60E-11		
	102	TT SGSYDY	136	QSYDRGFTGSRVF				
170-1	102	.. ..	137	.....FK..	2.35E-03			
170-2	102	.. ..	138	.....VSAY..	8.80E-04			
170-3	102	.. ..	139	.....L.VTK..	1.11E-03			
170-4	102	.. ..	140	.....Y.A....	8.11E-04			
170-7	102	.. ..	141	.....K..	5.30E-04			
170-11	102	.. ..	142	.....L..F...	4.40E-04			
170-13	102	.. ..	143	.....YK..	1.59E-03			
170-15	102	.. ..	144	.....L..Y.L.	4.43E-03			
170-19	103	.. H..H.N	145	.....DYK..	1.00E-03			
170-21	104	.. H..Q.N	146	.....P.L.	3.89E-03			
170-22	102	.. ..	147	.....L.....	5.60E-04			
170-23	103	.. H..H.N	148	.....A..W	1.00E-03	2.00E-10		
170-24	104	.. H..Q.N	149	.....Y...	2.80E-04	5.00E-10		
170-35	105	A. H..Q.N	136	.....	1.00E-05			
170-38			150	.....P...	2.10E-04			
170-39			151	.....M.S....	2.79E-03			
170-36	83	HGSHDN	152	QSYDRDSTGSRVF	4.00E-04	2.00E-10		
170-25	106	HGSQDT	153	QSYDSSLRGSRVF	5.00E-04	5.00E-11		

表２

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PHA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
	106	SGSYDY	136	QSYDRGFTGSRVF				
73-B1	107	SGSYDY	154	H...SD.....	3.25E-03	>1E-8		
73-B2	107	SGSYDY	155	H.SES.....	2.07E-03			
73-B6	107	SGSYDY	156	H...NR.....	2.51E-03	>1E-8		
73-C1	107	SGSYDY	157	H...SR.....	2.71E-03	>1E-8		
73-C2	107	SGSYDY	158	....SE.....	3.79E-03			
73-C6	107	SGSYDY	159	....T.....	3.96E-03			
73-D1	107	SGSYDY	160	H...S.....	3.99E-03			
73-D2	107	SGSYDY	161	....T.....	3.56E-03			
73-D4	107	SGSYDY	162	H...TK.....	5.36E-03			
73-D5	107	SGSYDY	163	H.S.S.....	3.57E-03			
73-E3	107	SGSYDY	164	....SD.....	4.98E-03			
73-E6	107	SGSYDY	165	H..ES.....	4.17E-03			
73-F3	107	SGSYDY	166	....APWS.....	7.08E-03			
73-F5	107	SGSYDY	167	...DSD....K..	3.74E-03			
73-G2	107	SGSYDY	168	HTN.S.....	3.98E-03			
73-G3	107	SGSYDY	169	H...TR.....	3.50E-03			
73-G4	107	SGSYDY	170	....MR.....	6.58E-03			
73-G5	107	SGSYDY	171	H.S.SDS.....	6.01E-03			
73-G6	107	SGSYDY	172	...NTD.....	6.30E-03			
73-H2	107	SGSYDY	173	....S.....	5.93E-03			
73-F6	107	SGSYDY	174	H...M.....	5.87E-03			
73-H3	107	SGSYDY	175	H...N.....	6.85E-03			
73-C5	107	SGSYDY	176	H.H..D.....	4.84E-03			
73-B7	108	HGSQDN	177	QSYDSSLRGSRV	2.50E-03	7.00E-09		

表2

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PHA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
			136	QSYDRGFTGSRVF				
M2 A2	83	HGSHDN	178	.....IH.....	4.00E-02			
M2 A4	83	HGSHDN	179	....S..P.....	8.49E-03			
M2 A5	83	HGSHDN	180	.....I.S.....	4.01E-02			
M2 B1	83	HGSHDN	181	....S.L.....	7.97E-03			
M2 B3	83	HGSHDN	182	....I.M.....	4.60E-02			
M2 B4	83	HGSHDN	183	....I.L.....	4.42E-02			
M2 B5	83	HGSHDN	184	....S.V.....	8.38E-03			
M2 B6	83	HGSHDN	185	.....L.A....	2.81E-02			
M2 C2	83	HGSHDN	181	....S.L.....	4.85E-02			
M2 C3	83	HGSHDN	186	....T.L.....	4.62E-02			
M2 C4	83	HGSHDN	181	....S.L.....	8.16E-03			
M2 C5	83	HGSHDN	187	....TAL.....	4.71E-02			
M2 D1	83	HGSHDN	188	....IR.....	3.71E-02			
M2 D2	83	HGSHDN	189	....IRS.....	3.85E-02			
M2 D3	83	HGSHDN	190	....NRL.....	3.33E-02			
M2 D4	83	HGSHDN	191	...ETS.....	5.81E-02			
M2 D5	83	HGSHDN	192	....SSS.....	5.18E-02			
M2 D6	83	HGSHDN	193	....S...A....	5.01E-02			
M2 E1	83	HGSHDN	194	.T..K.....S..	5.32E-02			
M2 E2	83	HGSHDN	195	.....N.....	4.77E-02			
M2 E6	83	HGSHDN	196	....T...K....	9.77E-03			
M2 F1	83	HGSHDN	197	....SDV.....	6.16E-02			
M2 H5	83	HGSHDN	198	....A.....	9.90E-03			

表2

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PHA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
			124	QSYDRGFTGSRV				
A5	83	HGSHDN	199	......THPSML	1.12E-03			
A12	83	HGSHDN	200	......TTPRPM	1.43E-03			
A4	83	HGSHDN	201	......RNPALT	1.47E-03			
A6	83	HGSHDN	202	......THPWLH	1.87E-03			
A10	83	HGSHDN	203	......NSPATV	1.87E-03			
A11	83	HGSHDN	204	......TFPSPQ	2.07E-03			
C2	83	HGSHDN	205	......LNPSAT	2.23E-03			
A8	83	HGSHDN	206	......KSNKML	2.37E-03			
B8	83	HGSHDN	207	......HTAHLY	2.40E-03			
C6	83	HGSHDN	208	......QTPSIT	2.42E-03			
A3	83	HGSHDN	209	......YPRNIL	2.51E-03			
B11	83	HGSHDN	210	......ITPGLA	2.95E-03			
B5	83	HGSHDN	211	......QPHAVL	3.04E-03			
C10	83	HGSHDN	212	......NSPIPT	3.10E-03			
C4	83	HGSHDN	213	......TPNNSF	3.23E-03			
C3	83	HGSHDN	214	....S.VDPGPY	3.34E-03			
B2	83	HGSHDN	215	......RPRHAL	3.61E-03			
A2	83	HGSHDN	216	......PYHPIR	3.80E-03			
C5	83	HGSHDN	217	......PHTQPT	3.91E-03			
A7	83	HGSHDN	218	......HNNFSP	3.95E-03			
C9	83	HGSHDN	219	......PTHLPH	3.97E-03			
B3	83	HGSHDN	220	......TPSYPT	4.12E-03			
C8	83	HGSHDN	221	....S.TSNLLP	5.36E-03			
B7	83	HGSHDN	222	......DSNHDL	5.45E-03			
A1	83	HGSHDN	223	......LPRLTH	5.66E-03			
C7	83	HGSHDN	224	......IPTSYL	5.83E-03			
C12	83	HGSHDN	225	......LRVQAP	5.85E-03			
B10	83	HGSHDN	226	......LSDSPL	6.04E-03			
B6	83	HGSHDN	227	....S.SLRRIL	7.58E-03			
A9	83	HGSHDN	228	......PARTSP	7.98E-03			
B9	83	HGSHDN	229	......RAAHPQ	8.66E-03			

表2

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PHA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
			124	QSYDRGETGSRV				
177-D7	83	HGSHDN	230	.....TQPABI	4.07E-04			
177-G6	83	HGSHDN	231	.....THPTMI	5.50E-04			
177-D9	83	HGSHDN	232	.....RIPABT	6.32E-04			
177-C6	83	HGSHDN	233	.....THPVPA	7.94E-04			
177-H5	83	HGSHDN	234	.....SBPIPA	1.32E-03			
177-H9	83	HGSHDN	235	.....THPVPA	1.58E-03			
177-H10	83	HGSHDN	236	.....THPTMY	3.44E-03			
144-F1	83	HGSHDN	237	.....HHYTTF	5.80E-04			
43-E3	83	HGSHDN	238	.....SHPAAE	8.00E-04			
43-E9	83	HGSHDN	239	.....TIPSIE	8.00E-04			
43-G2	83	HGSHDN	240	.....SSPAIM	7.00E-04			
43-G3	83	HGSHDN	241	.....IWPNLN	9.00E-04			
31-A6	83	HGSHDN	242	.....THPNLN	5.00E-04			
31-B5	83	HGSHDN	243	.....THPSIS	5.00E-04			
			124	QSYDRGETGSRV				
Y17	83	HGSHDN	244	QSYDRGSAPMIN	8.90E-05	4.50E-10	>1E-8	
Y19	83	HGSHDN	245	QSYDRGHHPAMS	2.26E-04	3.00E-11	>1E-8	
Y38	83	HGSHDN	246	.....THPSIT	5.08E-04	5.50E-11	2.60E-09	
Y45	83	HGSHDN	247	.....TDPAIV	6.17E-04	4.00E-11	4.30E-09	
Y61	83	HGSHDN	248	.....THPALL	2.75 e-4	4E-11	1.40E-10	
Y61 IgG	83	HGSHDN	248	.....THPALL	1.50E-04	1.60E-11	1.30E-10	
Y61 IgG 生殖系列	83	HGSHDN	248	.....THPALL	1.50E-04	1.60E-11	1.30E-10	1.60E-10
Y139	83	HGSHDN	249	.....SHPALT	5.92E-04	3E-11	4.50E-10	
Y139 IgG1	83	HGSHDN	249	.....SHPALT			1.00E-09	
Y174	83	HGSHDN	250	.....TTPAPE	7.55E-04	6E-11	2.00E-09	
Y177	83	HGSHDN	251	.....SHPTLI	6.61E-04	5E-11	1.00E-09	
A5	83	HGSHDN	252	.....THPSML	4.50E-04	6.60E-11		
A12	83	HGSHDN	253	.....TTPRPM	5.57E-04	2.50E-10		
D9	83	HGSHDN	254	.....RLPAQT	8.21E-04	3.5E-09	>>	
G6	83	HGSHDN	255	.....THPLTI	5.08E-04	1E-10	1.00E-09	
G6 IgG1	83	HGSHDN	255	.....THPLTI			1.00E-09	
C6	83	HGSHDN	256	QSYDRGQTPSIT	1.07E-03	3.5E-10	1.00E-08	
Y55	83	HGSHDN	257	QSYDRGTHFQMY	1.06E-03	1.40E-10	>1E-8	

表2

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PHA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
A4	83	HGSHDN	258	QSYDRGRNPALT	6.30E-04	2.50E-10		
AO3	83	HGSHDN	259	QSYDRGTHPLTM	3.04E-04	3.00E-11	4.00E-10	
AO3 IgG1	83	HGSHDN	260	QSYDRGTHPLTM	3.04 e-4	2.90E-11	3.80E-10	
AO3 IgG 生殖系列	83	HGSHDN	260	QSYDRGTHPLTM	2.50E-04	3.50E-11	1.75E-10	
99-B11	83	HGSHDN	261	QSYDSGYTGSRV	5.40E-03			
99-C11	83	HGSHDN	262	QSYDSGFTGSRV	5.70E-03			
99-H4	83	HGSHDN	263	QSYDSRFTGSRV	4.80E-03			
99-E9	83	HGSHDN	262	QSYDSGFTGSRV	5.40E-03			
99-H7	83	HGSHDN	264	QSYPDGTPASRV	3.30E-03			
99-H11	83	HGSHDN	265	QSYSTHMPISRV	4.90E-03			
99-F6	83	HGSHDN	266	QSYDSGSTGSRV	4.90E-03			
99-F7	83	HGSHDN	267	QSYPNSYPISRV	4.80E-03			
99-F8	83	HGSHDN	268	QSYIRAPQQV	3.70E-03			
99-F11	83	HGSHDN	262	QSYDSGFTGSRV	5.40E-03			
99-G7	83	HGSHDN	269	QSYLKSRAFSRV	4.80E-03			
99-G11	83	HGSHDN	270	QSYDSRFTGSRV	4.30E-03			
			124	QSYDRGETGSRV				
L3.3R3M-B1	83	HGSHDN	271	.....FTGSMV	5.46E+00			
L3.3R3M-B3	83	HGSHDN	272	.....FTGSMV	5.51E+00			
L3.3R3M-C6	83	HGSHDN	273	.....FTGFDG	6.17E+00			
L3.3R3M-F9	83	HGSHDN	274	.....TAPALS	4.99E+00			
L3.3R3M-G8	83	HGSHDN	275	.....SYPALR	5.55E+00			
L3.3R3M-H6	83	HGSHDN	276	.....NWPNSN	5.69E+00			
L3.3R3M-H10	83	HGSHDN	277	.....TAPSLL	5.35E+00			
L3.3R3M-A3	83	HGSHDN	278	.....FTGSMV	5.37E+00			
L3.3R3M-F8	83	HGSHDN	279	.....TTPRIR	4.99E+00			
L3.3R3M-G1	83	HGSHDN	280	.....FTGSMV	4.21E+00			
L3.3R3M-G7	83	HGSHDN	281	.....FTGSMV	4.24E+00			
L3.3R3M-H11	83	HGSHDN	282	.....MIPALT	3.95E+00			

表2

クローン	H3 配列番号	H3	L3 配列番号	L3	koff	RB アッセイ IC50 (M)	PHA アッセイ IC50 (M)	IFN gamma IC50 (M)
Y61-L94N	109	CKT HGSHDN	283	QSYDRNTHPALL			8.00E-11	
Y61-L94F	109	CKT HGSHDN	284	QSYDRFTHPALL			6.00E-11	
Y61-L94Y	109	CKT HGSHDN	285	QSYDRYTHPALL		2.00E-11	2.00E-11	
Y61-L94Y IgG	109	CKT HGSHDN	285	QSYDRYTHPALL	1.27E-04	6.00E-11	5.00E-11	4.00E-11
Y61-L50Y	109	CKT HGSHDN	286	QSYDRGTHPALL		2.00E-11		2.00E-11
Y61-L50Y* IgG	109	CKT HGSHDN	286	QSYDRGTHPALL	6.98E-05		2.00E-11	3.00E-11
Y61-L50Y-H31E** IgG	109	CKT HGSHDN	286	QSYDRGTHPALL	2.99E-05		6.00E-11	2.00E-11
Y61-L50Y-H31E-L94Y** IgG	109	CKT HGSHDN	287	QSYDRYTHPALL	4.64E-05		1.00E-11	1.00E-11
J695 (Y61-L94Y-L50Y IgG*)	109	CKT HGSHDN	287	QSYDRYTHPALL	5.14E-05	5.00E-11	1.00E-11	5.00E-12

*CDR L2: L50GをYへ

**CDR L2: L50GをYへ ; CDR H1: H31S to E

【０３９８】

【表４】

表３

| Kabat 番号 | CDR H1 | | | | | | | | | | CDR H2 | | | | | | | | | | | | | | | | | CDR H3 | | | | | | | | | | | | | | | | |

【表５】

表４：過剰の遊離ＩＬ－１２ｐ４０の存在下での中和活性

配列番号	クローン	PHA アッセイ IC50 (M) p70:p40 1:0	PHA アッセイ IC50 (M) p70:p40 1:20	PHA アッセイ IC50 (M) p70:p40 1:50
VH: 47	136-15	2.00E-09	5.00E-09	4.00E-09
VL: 48				
VH: 51	149-5	6.50E-09	7.00E-09	4.00E-09
VL: 52				
VH: 53	149-6	9.00E-10	1.00E-09	1.00E-09
VL: 54				
VH: 84	149-7	3.50E-09	2.50E-09	4.00E-09
VL: 126				
VH: 23	Y61 IgG	1.80E-10		1.80E-10
VL: 24				
VH: 65	AO3 IgG1	2.50E-10		2.20E-10
VL: 66				
VH: 31	J695	1.00E-11		3.50E-11
VL: 32				

【０４００】

実施例

【実施例１】

【０４０１】

抗ＩＬ－１２抗体の単離

Ａ．ＩＬ－１２結合抗体のスクリーニング

ヒト扁桃（ｓｃＦｖ１と称する）、扁桃及び末梢血リンパ球（ＰＢＬ）（ｓｃＦｖ２と称する）及び骨髄由来リンパ球（ＢＭＤＬと称する）由来のｍＲＮＡから得られたヒトＶＬ及びＶＨｃＤＮＡを用いて調製された３つの別個のｓｃＦｖファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって、ｈＩＬ－１２に対する抗体を単離した。ライブラリーの構築及び選択法は、「Ｖａｕｇｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．１４：３０９－３１４」に記載されている抗原ヒトＩＬ－１２ｐ

７０サブユニット、ヒトＩＬ－１２ｐ４０サブユニット、キメラＩＬ－１２（マウスｐ４０／ヒトｐ３５）、マウスＩＬ－１２、ビオチン化されたヒトＩＬ－１２及びビオチン化されたキメラＩＬ－１２を用いて、ライブラリーをスクリーニングした。標準的な操作を用いて、イムノチューブ上に抗原を被覆することによって、ＩＬ－１２特異的抗体を選択した（Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７）。ＩＬ－１２又はビオチン化されたＩＬ－１２を用いてｓｃＦｖライブラリー２をスクリーニングし、多数のＩＬ－１２特異的結合物質を生成した。５つの異なるクローンタイプを選択し、ＢｓｔＮ１酵素消化パターンによって決定し、ＤＮＡ配列決定によって確認した。主要なクローンタイプは、ＶＨＤＰ５８／ＶＬＤＰＬ１１、ＶＨＤＰ７７／ＶＬＤＰＫ３１、ＶＨＤＰ４７／ＶＬ及びＶＨＤＰ７７／ＶＬＤＰＫ３１であり、これら全てがＩＬ－１２のｐ４０サブユニットを認識した。

【０４０２】

ＩＬ－１２ｐ７０でのＢＭＤＬライブラリーのスクリーニングによって、３つの異なるクローンタイプが得られた。これらのうち２つは、交叉反応性クローンであることが明らかとなった。優勢なクローンを配列決定し、ＶＨＤＰ３５／ＶＬＤＰからなっていた。このクローンは、ＩＬ－１２のｐ４０サブユニットを認識する。ＩＬ－１２ｐ７０を用いたｓｃＦｖライブラリー１のスクリーニングは、特異的ＩＬ－１２抗体を産生しなかった。

【０４０３】

ｐ４０サブユニットではなく、ＩＬ－１２のｐ７０ヘテロ二量体又はｐ３５サブユニットへ優先的に結合するＩＬ－１２抗体を同定するために、組み合わされたｓｃＦｖ１＋２ライブラリー及びＢＭＤＬライブラリーを使用した。ｐ７０ヘテロ二量体又はｐ３５サブユニットを認識するＩＬ－１２抗体を選択するために、遊離のｐ４０の存在下で、ファージライブラリーを予め温置し、選択した。単離されたクローンの配列決定によって、９個の異なる抗体系列が明らかとなった。「ミクロ－Ｆｒｉｇｕｅｔ」滴定によって、サブユニットの優先性をさらに分析した。ＥＬＩＳＡ中でビオチン補足されたＩＬ－１２に対して、ｓｃＦｖを含有する上清を滴定し、$ＥＤ_{50}$を測定した。５０％ＥＤを生成するｓｃＦｖの濃度を、遊離のｐ７０又はｐ４０（阻害剤）の漸増濃度とともに予め温置した。ビオチン－ＩＬ－１２被覆されたプレート上のＥＬＩＳＡシグナルの減少を測定し、遊離のｐ７０又はｐ４０の濃度に対してプロットした。これによって、ｐ７０及びｐ４０に関して、各クローンに対する$ＩＣ_{50}$が得られた。両サブユニットに対する滴定が重複する場合には、ｓｃＦｖはｐ４０及びｐ７０の両方に結合する。これからの何らかの変動は、ｐ４０に比較したｐ７０の優先度を与える。

Ｂ．ＩＬ－１２に対して特異的な抗体系列（Ｊｏｅ９）の親和性成熟

ＩＬ－１２受容体結合アッセイ（ＲＢＡと称される）において、ＩＬ－１２の受容体へのＩＬ－１２の結合を阻害する能力に関して、及び実施例３に記載されているＰＨＡ刺激されたヒト芽球細胞（ＰＨＡアッセイ）のＩＬ－１２誘導性増殖を阻害する能力に関して、クローンを検査した。クローンＪｏｅ９がＲＢＡ及びＰＨＡアッセイの両方で最も低い$ＩＣ_{50}$を有しており、両アッセイにおいて、１×１０^{-6}Ｍの$ＩＣ^{50}$値を有していた。さらに、Ｊｏｅ９の重鎖可変領域（ＶＨ）は、ＶＢＡＳＥデータベースから同定された最も近い生殖系列配列ＣＯＳ－３と比べて変化の数が最も少なかった。表１（添付書類Ａ参照）は、生殖系列配列の$Ｖ_{Ｈ}$３ファミリー（ＣＯＳ－３がそのメンバーである）及び生殖系列配列の$Ｖ_{\lambda}$１ファミリーのメンバーを示している。従って、Ｊｏｅ９を親和性成熟のために選択した。Ｊｏｅ９野生型（Ｊｏｅ９ｗｔ）抗体のＶＨ及びＶＬのアミノ酸配列が、図１Ａから１Ｄに示されている。

【０４０４】

Ｊｏｅ９の親和性を増加させるために、重鎖及び軽鎖の両方の相補性決定領域３（ＣＤＲ３）の様々な変異を作製した。重鎖ＣＤＲ３（「Ｈ３」と称される）又は軽鎖ＣＤＲ３（「Ｌ３」と称される）の何れかに対して特異的な縮重オリゴヌクレオチド（各ＣＤＲ３中に平均３つの塩基置換（「スパイク」と称される）を有する）を用いる部位特異的ＰＣＲ突然変異誘発によって、ＣＤＲ３バリアントを作製した。重鎖ＣＤＲ３変異体のレパー

トリーを作製するために、４つのヌクレオチド全ての無作為混合物を含有する縮重重鎖オリゴヌクレオチド５’ＴＧＴＣＣＣＴＴＧＧＣＣＣＡ（Ｇ）（Ｔ）（Ａ）（Ｇ）（Ｔ）（Ｃ）（Ａ）（Ｔ）（Ａ）（Ｇ）（Ｃ）（Ｔ）（Ｃ）（Ｃ）（Ｃ）（Ａ）（Ｃ）（Ｔ）ＧＧＴＣＧＴＡＣＡＧＴＡＡＴＡ３’（配列番号５８０）及びオリゴヌクレオチドｐＵＣリバースタグＧＡＣ ＡＣＣ ＴＣＧ ＡＴＣ ＡＧＣ ＧＧＡ ＴＡＡ ＣＡＡ ＴＴＴ ＣＡＣ ＡＣＡ ＧＧ（配列番号５８１）を用いて、重鎖ＣＤＲ３のＰＣＲ突然変異誘発を行った。Ｊｏｅ９リバースオリゴヌクレオチド（５’ＴＧＧ ＧＧＣ ＣＡＡ ＧＧＧ ＡＣＡ３’（配列番号５８２）及びｆｄｔｅｔｅｓｅｑ２４＋２１オリゴヌクレオチド（５’－ＡＴＴ ＣＧＴ ＣＣＴ ＡＴＡ ＣＣＧ ＴＴＣ ＴＡＣ ＴＴＴ ＧＴＣ ＧＴＣ ＴＴＴ ＣＣＡ ＧＡＣ ＧＴＴ ＡＧＴ－３’（配列番号５８３）を用いて、親軽鎖を増幅した。

【０４０５】

２つのＰＣＲ産物間の相補性を使用して、ＰＣＲアセンブリー反応中での２つの断片の徐冷を誘導し、ｐＵＣリバースタグ（配列番号５８１）及びｆｄＴａｇ５’－ＡＴＴ ＣＧＴ ＣＣＴ ＡＴＡ ＣＣＧ ＴＴＣ－３’（配列番号５８４）を用いて、完全長の組換えられたｓｃＦｖライブラリーを増幅した。軽鎖ＣＤＲ３変異体のレパートリーを作製するために、４つのヌクレオチド全ての混合物を含有する軽鎖オリゴヌクレオチド５’ＧＧＴＣＣＣＡＧＴＴＣＣＧＡＡＧＡＣＣＣＴＣＧＡＡＣＣ（Ｃ）（Ｃ）（Ｔ）（Ｃ）（Ａ）（Ｇ）（Ｇ）（Ｃ）（Ｔ）（Ｇ）（Ｃ）（Ｔ）（Ｇ）（Ｔ）（Ｃ）ＡＴＡＴＧＡＣＴＧＧＣＡＧＴＡＡＴＡＧＴＣＡＧＣ３’（配列番号５８５）及びＪｏｅ９リバースオリゴヌクレオチド５’ＴＧＧ ＧＧＣ ＣＡＡ ＧＧＧ ＡＣＡ３’（配列番号５８６）を用いて、軽鎖のＰＣＲ突然変異誘発を行った。ｐＵＣリバースタグ（配列番号５８１）及びＨｕＪＨ３ＦＯＲオリゴヌクレオチド５’ＴＧＡＡＧＡＧＡＣＧＧＴＧＡＣＣＡＴＴＧＴＣＣＣ３’（配列番号５８７）を用いて、親重鎖を増幅した。２つのＰＣＲ産物間の相補性を使用して、ＰＣＲアセンブリー反応中での２つの断片の徐冷を誘導し、リバースタグＧＡＣ ＡＣＣ ＴＣＧ ＡＴＣ ＡＧＣ Ｇ（配列番号５８８）及びＨｕＪλ２－３ＦＯＲＮＯＴオリゴヌクレオチド５’ＧＡＧ ＴＣＡ ＴＴＣ ＴＣＧ ＡＣＴ ＴＧＣ ＧＧＣ ＣＧＣ ＡＣＣ ＴＡＧ ＧＡＣ ＧＧＴ ＣＡＧ ＣＴＴ ＧＧＴ ＣＣＣ３’（配列番号５８９）を用いて、完全長の組換えられたｓｃＦｖライブラリーを増幅した。

【０４０６】

１ｎＭビオチン化されたＩＬ－１２を用いて重鎖ＣＤＲ３変異体を選択し、７ｎＭの濃度で、遊離のＩＬ－１２又はｐ４０を含有するＰＢＳ中にて、室温で１時間洗浄した。ファージＥＬＩＳＡによってクローンを分析し、ＢＩＡｃｏｒｅ速度論結合研究において、低密度ＩＬ－１２チップを用いて、ＩＬ－１２に結合されたクローンを検査した（実施例５中のＢＩＡｃｏｒｅ分析のための操作）。一般に、ＢＩＡｃｏｒｅ分析は、ＢＩＡｃｏｒｅシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いて、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により、リガンド（バイオセンサーマトリックス上に固定された組換えヒトＩＬ－１２）と分析物（溶液中の抗体）の間のリアルタイム結合相互作用を測定する。システムは、デキストランバイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出するために、ＳＰＲの光学的特性を使用する。タンパク質は、既知濃度でデキストランマトリックスに共有結合される。デキストランマトリックスを通じて抗体を注入し、注入された抗体と固定化されたリガンド間の特異的結合は、増加したマトリックスタンパク質濃度をもたらし、その結果、ＳＰＲシグナルの変化をもたらす。これらのＳＰＲシグナルの変化は、共鳴単位（ＲＵ）として記録され、センサーグラムのｙ軸に沿って、時間に関して表示される。ｏｆｆ速度（k_{off}）、ｏｎ速度（k_{on}）、会合速度（Ｋａ）及び解離速度（Ｋｄ）定数を測定するために、ＢＩＡｃｏｒｅ速度論評価ソフトウェア（バージョン２．１）を使用した。その受容体へのＩＬ－１２の抗体の結合による阻害（ＲＢＡアッセイ）、ＰＨＡ刺激されたヒト芽球細胞中でのＩＬ－１２誘導性増殖の阻害（ＰＨＡアッセイ）及びヒト芽球細胞によるＪＸ－１２誘導性インターフェロンγ産生（ＩＦＮγアッセイ）を含む中和アッセイによって、k_{off}速度の改善

を示したクローンを分析した。重鎖ＣＤＲ３のスパイクが導入されたクローン７０－１から７０－１３の中和アッセイから得られた解離速度及び／又はＩＣ$_{50}$値の要約が表２に示されている（添付書類Ａ参照）。クローン７０－１は親Ｊｏｅ９クローンより優れたＫ$_{off}$速度を示し、２．０×１０$^{-7}$Ｍの最も低いＩＣ$_{50}$値を有していた。従って、完全なＩｇＧ１への変換のために、クローン７０－１を選択した。

【０４０７】

１ｎＭビオチン－ＩＬ－１２を用いて軽鎖ＣＤＲ３変異体を選択し、７ｎＭ遊離のｐ４０を含有するＰＢＳで洗浄した。ファージＥＬＩＳＡ中でクローンをスクリーニングし、低密度ＩＬ－１２チップを用いて、ＢＩＡｃｏｒｅ結合分析中で、ＩＬ－１２に結合されたクローンを検査した。ＩＬ－１２受容体結合の阻害又はＰＨＡ芽球細胞増殖の阻害の何れかを測定する中和アッセイにおいて、親Ｊｏｅ９クローンより優れたｏｆｆ速度を示したクローンを検査した。軽鎖ＣＤＲ３変異体クローン７８－３４から７９－１の中和アッセイから得られた解離速度及び／又はＩＣ$_{50}$値の要約が表２に示されている（添付書類Ａ参照）。

【０４０８】

ｋ$_{off}$定数に基づいて、クローン７８から３４及び７８から３５は、親Ｊｏｅ９と比べて改善されたｋ$_{off}$速度を示した。重鎖変異体との組み合わせ分析のために、これらの両クローンを選択した。

【０４０９】

Ｃ．組み合わせクローン

最も優れた結合特性を示した変異体軽鎖及び重鎖クローンを、ｓｃＦｖｓの組み合わせ及び組み立てのために使用した。上述されているように、ＰＣＲ重複伸長並びに変異されたＶＨ及びＶＬセグメントの貫通（ｐｕｌｌ－ｔｈｒｏｕｇｈ）によって、改善された効力特性を有する変異体クローンを組み合わせた。軽鎖変異体（７８－３４、７８－３５及び７９－１）との重鎖変異体（７０－２、７０－１３及び７０－１）の組み合わせから、表２に示されているクローン１０１－１４から２６－１（添付書類Ａ参照）を作製した。これらのクローンに対して中和アッセイから得られたｋ$_{off}$速度及び／又はＩＣ$_{50}$値は、表２に示されている。

【０４１０】

ＢＩＡｃｏｒｅ結合分析は、０．００４５ｓ$^{-1}$のｏｆｆ速度を有するとして、軽鎖ＣＤＲ３変異体クローン７８－３４との重鎖ＣＤＲ３変異体クローン７０－１の組み合わせから作製されたクローン１０１－１１を同定した。このｋ$_{off}$速度は、重鎖ＣＤＲ３変異体クローン７０－１（０．０１３４ｓ$^{-1}$）又は軽鎖ＣＤＲ３変異体クローン７８－３４（０．０１６４ｓ$^{-1}$）単独のｋ$_{off}$速度と比べて、著しい改善であった。さらに、クローン１０１－１１は、中和アッセイの著しい改善を示した。従って、以下に記載されている親和性成熟のために、クローン１０１－１１を選択した。

【０４１１】

Ｄ．クローン１０１－１１の親和性成熟

クローン１０１－１１のさらなる親和性成熟は、スパイクが導入されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用する、１０１－１１の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ３の両方のＰＣＲ突然変異誘発の反復サイクルからなった。ビオチン化されたＩＬ－１２（ｂｉｏ－ＩＬ－１２）の減少する濃度を用いて、クローンを選択した。ＢＩＡｃｏｒｅ結合分析及びＲＢＡ、ＰＨＡ中和アッセイによって、変異されたクローンの結合特性を評価した。クローン１３６－９から１７０－２５に対するｋ$_{off}$速度及び／又はＩＣ$_{50}$値が、表２に示されている（添付書類Ａ参照）。クローン１０３－１４は、受容体結合アッセイ及びＰＨＡ芽球アッセイの両方において、改善されたＩＣ$_{50}$値を示した。クローン１０３－１４も低いｋ$_{off}$速度を示し、従って、さらなる親和性成熟のために選択された。

【０４１２】

Ｅ．クローン１０３－１４軽ＣＤＲ３の無作為化されたライブラリーの作製及び選択

以下に概説されている３つの異なるライブラリーを用いて、クローン１０３－１４（Ｑ

ＳＹＤＲＧＦＴＧＳＭＶ（配列番号５９０））の軽鎖ＣＤＲ３を３つのセグメント中へ系統的に無作為化した（Ｘは、配列ＮＮＳの無作為化されたコドンによってコードされ、Ｎはあらゆるヌクレオチドであり、Ｓはデオキシシトシン又はデオキシグアニジンの何れかである。）。

【０４１３】

【化１】

L3.1=XXXXXXFTGSMV (配列番号 : 591)

L3.2= QSYXXXXXXSMV (配列番号 : 592)

L3.3=QSYDRGXXXXXX (配列番号 : 593)

【０４１４】

クローン１０３－１４の３つの軽鎖ＣＤＲ全て（Ｌ３．１、Ｌ３．２及びＬ３．３と称される。）の無作為化された突然変異誘発を行った。クローン１０３－１４の重鎖ＣＤＲ３（Ｈ３と称される）は変異されなかった。クローン１０３－１４（Ｈ３並びにＬ３．１、Ｌ３．２及びＬ３．３）に基づく４つの無作為化されたライブラリーを構築し、限定的抗原濃度及び過剰の遊離抗原（ｐ４０及びｐ７０）の存在又は不存在を使用することを含む多様な選択条件に供した。選択からの出力（クローン７３－Ｂ１から９９－Ｇ１１）が、主としてＢＩＡｃｏｒｅによって、及び時折ＲＢＡによってスクリーニングされ、表２に示されている（添付書類Ａ参照）。

【０４１５】

１０３－１４の軽鎖ＣＤＲの無作為突然変異誘発はクローンＹ６１を生成し、これは、親クローン１０３－１４と比べて、IC_{50}値の著しい改善を示した。完全なＩｇＧ１への変換のために、Ｙ６１を選択した。完全なＹ６１－ＩｇＧ１はＰＨＡアッセイによって測定された約１３０ｐＭのIC_{50}値を有する。IC_{50}値は、遊離ｐ４０の５０倍モル濃度過剰によって影響を受けず、遊離のｐ４０はＹ６１抗ＩＬ－１２抗体と交叉反応することにより、ヘテロ二量体への抗体結合を減少させることはないことを示している。Ｙ６１重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の完全長配列が、以下に示されている。

【０４１６】

Ｙ６１重鎖可変領域ペプチド配列

【０４１７】

【化２】

CDR H1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASFTFS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA

CDR H2

FIRYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKT

CDR H3

HGSHDN WGQGTMVTVSS (配列番号 : 23)

【０４１８】

Ｙ６１軽鎖可変領域ペプチド配列

【０４１９】

【化３】

CDR L1
QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC SGGRSNIGSNTVK WYQQLPGTAPKLLIY

CDR L2
GNDQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC

CDR L3
QSYDRGTHPALL FGTGTKVTVLG (配列番号:24)

【０４２０】

ＣＤＲ残基は、Ｋａｂａｔ定義に従って割り当てられている。

【実施例２】

【０４２１】

高頻度変異及び接触位置におけるＹ６１の変異

典型的には、改善された親和性を有する組換え抗体の選択は、ファージディスプレイ法を用いて実施することができる。これは、異なる配列の一本鎖抗体を含有する大規模なライブラリーを作製するために、ＣＤＲ残基の組み合わせを無作為に変異させることによって達成される。典型的には、改善された親和性を有する抗体は、抗体抗原反応中で平衡状態に達する能力に基づいて選択される。しかしながら、Ｙ６１ｓｃＦｖをファージ表面上に発現し、ＩＬ－１２とともに温置すると、系を正常な抗体抗原平衡状態へ到達させることができる選択条件を見出すことはできなかった。精製されたＹ６１ｓｃＦｖは正常な解離速度論を示すので、おそらくは、非特異的相互作用のために、ｓｃＦｖ－ファージはＩＬ－１２に結合し続けた。Ｙ６１に対するファージディスプレイ親和性成熟（すなわち、複数のＣＤＲ残基の突然変異誘発によるライブラリーの作製及び選択）という通常の方法を使用することができなかったので、各ＣＤＲ位置が変異を受ける新たな戦略が開発された。

【０４２２】

この戦略は、変異のための適切なＣＤＲ位置を選択することを含み、好ましい選択的突然変異誘発位置、接触位置及び／又は高頻度変異位置であるアミノ酸を同定及び選択することを基礎とする。接触位置とは、抗原が抗体と相互作用するときに、抗原と接触する高い確率を有する残基として定義されるのに対して、高頻度変異位置は、抗体のインビボでの親和性成熟の間に、体細胞性高頻度変異の確率が高いと考える残基として定義される。好ましい選択的突然変異誘発位置は、接触及び高頻度変異位置の両方であるＣＤＲ位置である。Ｙ６１抗体は、実施例１に記載されている操作を用いて、ＣＤＲ３領域中において最適化されており、従って、ファージディスプレイ選択法を用いて、抗体結合部位の中心に位置するこの領域をさらに改善することは困難であった。有害な抗原抗体接触を除去することによって、又は新たな接触を作製することによって、ＣＤＲ３領域外の接触位置の候補を変異させることによって、活性のより大きな改善が得られた。

【０４２３】

抗原との接触点と考えられたＹ６１のアミノ酸残基及びインビボ親和性成熟の間の体細胞性高頻度変異の部位であるＣＤＲ位置が、表３に示されている（添付書類Ａ参照）。Ｙ６１親和性成熟のために、ＣＤＲ３の外側の１５の残基、Ｌ３ループ内の３つの残基及びＨ３ループ中の５つの残基をＰＣＲ突然変異誘発のために選択した。

【０４２４】

突然変異誘発のために、Ｙ６１ｓｃＦｖ遺伝子をｐＵＣ１１９（Ｓｆｉ）プラスミドベクター中にクローニングした。各選択された位置を変異するために、無作為化されたコドンを用いて、オリゴヌクレオチドを設計し、合成した。ＰＣＲ突然変異誘発後、クローンの少数（約２４）を配列決定し、宿主細胞、例えば、細菌、酵母又は哺乳動物の宿主細胞中で発現させた。発現された抗体を精製し、ＢＩＡｃｏｒｅシステムを用いて、k_{off}を測定した。次いで、Ｙ６１と比べて改善されたｏｆｆ速度を有するクローンを、中和ア

ッセイにおいて検査した。他のＣＤＲ位置に対して、この操作を繰り返した。さらに大きな中和能を有する抗体を作製するために、改善された中和活性を有することが示された各変異を組み合わせた。

【０４２５】

中和能を改善させるために変異されたＹ６１ＣＤＲ位置及び各位置におけるそれぞれのアミノ酸置換が図２Ａから２Ｈに示されている。ＢＩＡｃｏｒｅ分析によって測定されたｏｆｆ速度が示されている。これらのｏｆｆ速度は、各表の右側にヒストグラムとしても示されている。

【０４２６】

位置Ｈ３０、Ｈ３２、Ｈ３３、Ｈ５０、Ｈ５３、Ｈ５４、Ｈ５８、Ｈ９５、Ｈ９７、Ｈ１０１、Ｌ５０、Ｌ９２、Ｌ９３におけるこれらの置換の結果は、調べた全てのアミノ酸置換がＹ６１より劣るｏｆｆ速度を有する抗体をもたらすことを示した。Ｈ５２、Ｌ３２及びＬ５０位において、唯一つのアミノ酸置換がＹ６１のｏｆｆ速度を改善することが見出され、他の変化は全て活性に悪影響を与えた。Ｌ５０に関しては、この単一のＧｌｙ→Ｔｙｒ変化は、Ｙ６１の中和能を著しく（５から１０倍）改善させた。この結果はＹ６１活性に対するこれらの位置の重要性を示し、多くの事例で、ファージディスプレイは最適な残基に対して選択できることを示唆している。しかしながら、位置Ｈ３１、Ｈ５６、Ｌ３０及びＬ９４において、幾つかの置換がＹ６１のｏｆｆ速度を改善することが見出され、ファージディスプレイアプローチは最適な残基の選択を可能としなかったが、これらの位置も抗原結合にとって重要であることを示唆している。

【０４２７】

Ｙ６１の接触及び高頻度変異位置の選択的変異によって、Ｙ６１の中和能を改善した軽鎖ＣＤＲ２中のアミノ酸残基Ｌ５０及び軽鎖ＣＤＲ３の残基Ｌ９４が同定された。これらの変異の組み合わせは加算的効果をもたらし、中和能の著しい増加を示す抗体Ｊ６９５を生成した。Ｊ６９５重鎖及び軽鎖可変領域配列の完全長配列が以下に示されている。

【０４２８】

Ｊ６９５重鎖可変領域ペプチド配列

【０４２９】

【化４】

CDR H1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMH WVRQAPGKGLEWVA

CDR H2

FIRYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKT

CDR H3

HGSHDN WGQGTMVTVSS (配列番号: 31)

【０４３０】

Ｊ６９５軽鎖可変領域ペプチド配列

【０４３１】

【化５】

CDR L1

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC SGSRSNIGSNTVK WYQQLPGTAPKLLIY

CDR L2

YNDQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC

CDR L3

QSYDRYTHPALL FGTGTKVTVLG (配列番号 : 32)

【０４３２】

ＣＤＲ残基は、Ｋａｂａｔ定義に従って割り当てられている。

【０４３３】

Ｊｏｅ９からＪ６９５への軌跡であるクローンの系列発達を示す重鎖及び軽鎖可変領域配列並置の要約が図１Ａから１Ｄに示されている。ＣＤＲ及び残基の付番は、Ｋａｂａｔに従う。

【実施例３】

【０４３４】

抗ｈＩＬ－１２抗体の機能的活性

本発明のヒト抗ヒトＩＬ－１２抗体の機能的活性を調べるために、抗体がＩＬ－１２活性を阻害する能力を測定する幾つかのアッセイにおいて抗体を使用した。

【０４３５】

Ａ．ヒトＰＨＡ活性化されたリンパ芽球の調製

「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｕｎｉｔ ７．１」に記載されているように、１５００ｒｐｍで４５分間のＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ勾配遠心によって、健康なドナーから集められたｌｅｕｋｏｐａｃからヒト末梢血単核細胞を単離した。水性血液溶液及びリンパ球分離溶媒の界面のＰＢＭＣを集め、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ粒子を除去するために、１５００ｒｐｍで１５分間の遠心によってリン酸緩衝化生理的食塩水（ＰＢＳ）で３回洗浄した。

【０４３６】

次いで、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｕｎｉｔ ６．１６」に記載されているように、リンパ芽球を形成するためにＰＢＭＣを活性化した。０．２％（ｖ／ｖ）ＰＨＡ－Ｐ（Ｄｉｆｃｏ，Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ）が補充されたＲＰＭＩ完全培地（ＲＰＭＩ１６４０培地、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１００μｇ／ｍＬストレプトマイシン）中に、０．５から１×１０^{6}細胞／ｍＬで、洗浄されたＰＢＭＣを再懸濁し、５％CO_2雰囲気中、３７℃で４日間培養した。４日後、ＲＰＭＩ完全培地中に、０．２％（ｖ／ｖ）ＰＨＡ－Ｐ及び５０Ｕ／ｍＬ組換えヒトＩＬ－２を加えた細胞培養物を容積で１：１に分割した。ヒトＩＬ－２ｃＤＮＡを担持する発現ベクターをＣＯＳ細胞中に形質移入することによって、組換えヒトＩＬ－２を作製し（Ｋａｕｆｍａｎ ｅｔ ａｌ，（１９９１） Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９，４４８４－４４９０参照）、ＰＣＴ／ＵＳ９６／０１３８２号に記載されているように精製した。次いで、さらに１日から３日間、細胞培養物を温置した。ＰＨＡ芽球細胞を採集し、ＲＰＭＩ完全培地で２回洗浄し、１０×１０^{6}細胞／ｍＬで、９５％ＦＢＳ、５％ＤＭＳＯ中に凍結させた。

【０４３７】

ＩＬ－１２受容体結合アッセイ（Ｂ節参照）のために使用すべきＰＨＡ芽球細胞はＩＬ－２の存在下での１日の培養後に収集されたのに対して、ＰＨＡ芽球増殖アッセイ（Ｃ節参照）及びインターフェロン－γ誘導アッセイ（Ｄ節参照）のために使用すべきＰＨＡ芽球細胞はＩＬ－２の存在下での３日の培養後に収集された。

【０４３８】

Ｂ．ＩＬ－１２受容体結合アッセイ

抗ＩＬ－１２抗体がＰＨＡ芽球上のＩＬ－１２への放射性標識されたＩＬ－１２の結合を阻害する能力は、以下のようにして分析した。結合緩衝液（ＲＰＭＩ１６４０、５％ＦＢＳ、２５ｍＭＨｅｐｅｓｐＨ７．４）中、３７℃で１時間、５０から１００ｐＭ^{125}Ｉ－ｈＩＬ－１２（ヨウ素化されたｈＩＬ－１２は、２０から４０ｍＣｉ／ｍｇの比活性になるように、Ｂｏｌｔｏｎ－Ｈｕｎｔｅｒ標識法を用いて、ＮＥＮ－Ｄｕｐｏｎｔから調製した。）とともに、抗ＩＬ－１２抗体の様々な濃度を予め温置した。上述のように、ＰＨＡ芽球細胞を単離し、１回洗浄し、２×１０^{7}細胞／ｍＬの細胞密度になるように、結合緩衝液中に再懸濁した。抗体^{125}Ｉ－ｈＩＬ－１２混合物にＰＨＡ芽球（１×１０^{6}細胞）を添加し、室温で２時間温置した。室温で３０秒間のアッセイ混合物の遠心、液体の吸引及び０．１ｍＬ結合緩衝液での洗浄、その後の１０，０００×ｇで４分間の４℃

での遠心によって、細胞に結合された放射能を遊離の^{125}Ｉ－ｈＩＬ－１２から分離した。γカウンターを用いて、細胞に結合された放射能に関して細胞沈降物を調べた。抗体の不存在下で総結合を測定し、２５ｎＭ非標識ＩＬ－１２をアッセイ中に含めることによって非特異的結合を測定した。温置は、二つ組みで行った。

【０４３９】

Ｙ６１及びＪ６９５ヒト抗ＩＬ－１２抗体を用いたＩＬ－１２受容体結合アッセイにおいて、両抗体はＩＬ－１２受容体結合の同等の阻害を示した。Ｙ６１は約１．６×１０$^{-11}$ＭのＩＣ$_{50}$値でＩＬ－１２受容体結合を阻害したのに対して、Ｊ６９５は約１．１×１０$^{-11}$ＭのＩＣ$_{50}$値を有していた。

【０４４０】

Ｃ．ヒトＰＨＡ芽球増殖アッセイ

ＰＨＡ芽球増殖（その増殖は、ＩＬ－１２によって刺激される。）を阻害する能力に関して、抗ＩＬ－１２抗体を評価した。マイクロタイタープレート（Ｕ底、９６ウェル、Ｃｏｓｔａｒ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）中で、ＲＰＭＩ完全培地１００ｍＬ中の２３０ｐｇ／ｍＬｈＩＬ－１２とともに、３７℃、５％ＣＯ$_2$で、抗ＩＬ－１２抗体の系列希釈を予め１時間温置した。上述のように、ＰＨＡ芽球細胞を単離し、１回洗浄し、３×１０^{5}細胞／ｍＬの細胞密度になるように、ＲＰＭＩ完全培地中に再懸濁した。抗体／ｈＩＬ－１２混合物に、ＰＨＡ芽球（１００ｍＬ、３×１０^{4}細胞）を添加し、３７℃、５％ＣＯ$_2$で３日間温置し、０．５ｍＣｉ／ウェル（３Ｈ）チミジン（Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ　Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＩＬ）で４から６時間標識した。細胞採取装置（Ｔｏｍｔｅｃ，Ｏｒａｎｇｅ，ＣＴ）を用いて、ガラスファイバーフィルター上に培養内容物を採取し、液体シンチレーションカウンティングによって、細胞ＤＮＡ中への（^{3}Ｈ）チミジンの取り込みを測定した。全ての試料は、二つ組みでアッセイを行った。

【０４４１】

ｐ７０：ｐ４０の変動する濃度（すなわち、遊離のｐ４０サブユニットに対するＢＬ－１２ヘテロ二量体の比）の存在下での中和の結果が、表４に示されている（添付書類Ａ参照）。

【０４４２】

ＰＨＡ芽球増殖アッセイ中でのＹ６１ヒト抗ＩＬ－１２抗体の分析は、過剰のｐ４０なしに（１：０のｐ７０：ｐ４０比）、ＩＬ－１２ｐ７０単独の存在下において、この抗体が約１．８×１０$^{-10}$ＭのＩＣ$_{50}$値でＰＨＡ芽球増殖を阻害することを示した。遊離のｐ４０の５０倍過剰の存在下で（１：５０のｐ７０：ｐ４０比）、Ｙ６１抗体は、約１．８×１０$^{-10}$ＭのＩＣ$_{50}$値でＰＨＡ芽球増殖を阻害した。この結果は、芽球増殖を阻害するＹ６１の能力が過剰なｐ４０の存在によって損なわれないことを示している。

【０４４３】

ヒト抗ＩＬ－１２抗体Ｊ６９５は、１：０の比のｐ７０：ｐ４０の存在下において、約１．０×１０$^{-11}$ＭのＩＣ$_{50}$値で、ＰＨＡ芽球増殖を阻害した。１：５０の比のｐ７０：ｐ４０の存在下において、この抗体は、約５．８＋２．８×１０$^{-12}$Ｍ（ｎ＝２）のＩＣ$_{50}$値で、ＰＨＡ芽球増殖を阻害し、過剰のｐ４０は抗体に対して極僅かな阻害効果を有したことを示している。結果を総合すると、Ｌ５０及びＬ９４における変異のために、Ｙ６１と比較して、Ｊ６９５の中和活性は改善されたことを示している。

【０４４４】

Ｄ．インターフェロンγ誘導アッセイ

抗ＩＬ－１２抗体がＰＨＡ芽球によるＩＦＮγの産生（その産生はＩＬ－１２によって刺激される。）を阻害する能力を、以下のようにして分析した。マイクロタイタープレート（Ｕ底、９６ウェル、Ｃｏｓｔａｒ）中で、ＲＰＭＩ完全培地１００ｍＬ中の２００から４００ｐｇ／ｍＬｈＩＬ－１２とともに、３７℃、５％ＣＯ$_2$で、抗ＩＬ－１２抗体の様々な濃度を予め１時間温置した。上述のように、ＰＨＡ芽球細胞を単離し、１回洗浄し、１×１０^{7}細胞／ｍＬの細胞密度になるように、ＲＰＭＩ完全培地中に再懸濁した。

【０４４５】

抗体／ｈＩＬ－１２混合物にＰＨＡ芽球（１×１０^{6}細胞１００μＬ）を添加し、３７℃及び５％ＣＯ$_{2}$で１８時間温置した。温置後、各ウェルから無細胞上清１５０μＬを取り出し、ＥＬＩＳＡ（Ｅｎｄｏｇｅｎ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ ｇａｍｍａ ＥＬＩＳＡ，Ｅｎｄｏｇｅｎ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）によって、産生されたヒトＩＦＮγの濃度を測定した。各上清は、二つ組みでアッセイを行った。

【０４４６】

このアッセイでのヒト抗ＩＬ－１２抗体Ｙ６１の分析は、Ｙ６１が、約１．６×１０$^{-10}$ＭのＩＣ$_{50}$値で、ヒトＩＦＮγ産生を阻害するのに対して、ヒト抗ＩＬ－１２抗体Ｊ６９５は、約５．０±２．３×１０$^{-12}$Ｍ（ｎ＝３）のＩＣ$_{50}$値で、ヒトＩＦＮγ産生を阻害することを示した。結果は、Ｌ５０及びＬ９４での修飾の結果、Ｊ６９５の親和性が大幅に改善されることを示している。

【０４４７】

Ｅ．単離されたＰＢＭＣからの非ヒトＩＬ－１２の誘導

他の種から得られたＩＬ－１２とのヒト抗ｈＩＬ－１２抗体の交叉反応性を調べるために、非ヒトＩＬ－１２を以下のように産生した。カニクイザル、ヒヒ及びイヌＰＢＭＣに対してｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（Ｎｙｃｏｍｅｄ，Ｏｓｌｏ，Ｎｏｒｗａｙ）を、イヌＰＢＭＣに対してＡｃｃｕ－ｐａｑｕｅ（Ａｃｃｕｒａｔｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ ＆ Ｓｃｉ．Ｃｏｒｐ．，Ｗｅｓｔｂｕｒｙ，ＮＹ）を、ラットＰＢＭＣに対してＬｙｍｐｈｏｌｙｔｅ－ｒａｔ（Ａｃｃｕｒａｔｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ ＆ Ｓｃｉ．Ｃｏｒｐ．，Ｗｅｓｔｂｕｒｙ，ＮＹ）を使用して、上述のような密度勾配遠心によって、ヘパリン処理された新鮮な血液からＰＢＭＣを分離した。

【０４４８】

次いで、記載されているようにＩＬ－１２を産生するために、ＰＢＭＣを誘導した（Ｄ’Ａｎｄｒｅａ ｅｔ ａｌ．，（１９９２）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ１７６，１３８７－１３９８，Ｖｉｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５５，３９４６－３９５４，Ｂｕｅｔｔｎｅｒ ｅｔ ａｌ，（１９９８）Ｃｙｔｏｋｉｎｅ １０，２４１－２４８）。ＳＡＣの０．００７５％（重量／容量）（Ｐａｎｓｏｒｂｉｎ；Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ－Ｂｅｈｒｉｎｇ Ｃｏ．，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）又は１から５ｍｇ／ｍＬＣｏｎＡ（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）＋０．００７５％ＳＡＣが補充されたＲＰＭＩ完全培地中に、１×１０^{6}細胞／ｍＬで、洗浄されたＰＢＭＣを再懸濁し、５％ＣＯ$_{2}$雰囲気中、３７℃で１８時間温置した。遠心及び０．２ｍｍフィルターを通じたろ過によって、無細胞及び無ＳＡＣ培地を集めた。

【０４４９】

アカゲザル由来のＩＬ－１２は、Ｅｍｏｒｙ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｓｃｈｏｏｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ａｔｌａｎｔａ，ＧＡから得た組換えアカゲザルＩＬ－１２として取得した。

【０４５０】

Ｆ．マウス２Ｄ６細胞増殖アッセイ

マウスＴ細胞クローン２Ｄ６は、マウスＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７及びＩＬ－１２に応答して増殖する（Ｍａｒｕｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ Ｂｉｏｌ．６１，３４６－３５２）。ラットＩＬ－１２を含有するラットＰＢＭＣ上清に応答して、有意な増殖も検出された。細胞は、イヌ、カニクイザル、ヒヒ又はヒトＩＬ－１２に応答しない。５０ｍＭベーターメルカプトエタノール（βＭＥ）及び３０ｎｇ／ｍＬマウスＩＬ－１２が補充されたＲＰＭＩ完全培地中で、マウス２Ｄ６細胞を増殖させた。アッセイの１日前に、マウスＩＬ－１２を洗浄除去し、βＭＥを加えたＲＰＭＩ完全培地中において、細胞を一晩温置した。

【０４５１】

マイクロタイタープレート（Ｕ底、９６ウェル、Ｃｏｓｔａｒ）中で、βＭＥを加えたＲＰＭＩ完全培地１００ｍＬ中の４０ｐｇ／ｍＬマウスＩＬ－１２とともに、３７℃、５

％CO_2で、抗ＩＬ－１２抗体の系列希釈を予め１時間温置した。２Ｄ６細胞を１回洗浄し、1×10^5細胞／ｍＬの細胞密度になるように、βＭＥを含有するＲＰＭＩ完全培地中に再懸濁した。抗体／ｈＩＬ－１２混合物に、２Ｄ６細胞（１００μＬ、1×10^4細胞）を添加し、３７℃、５％CO_2で３日間温置し、０．５ｍＣｉ／ウェル（３Ｈ）チミジンで４から６時間標識した。培養内容物を採取し、液体シンチレーションカウンティングによって計数した。全ての試料は、二つ組みでアッセイを行った。

【０４５２】

Ｇ．非ヒトＩＬ－１２とのＪ６９５の種交叉反応性

幾つかの非ヒト種から単離されたＰＢＭＣを用いて、非ヒトＩＬ－１２とのＪ６９５の種交叉反応性を分析した。マウス及び／又はヒトＩＬ－１２に対するウサギ及び／又はヒツジポリクローナル抗体を用いて誘導された非ヒトＰＢＭＣ誘導性応答を遮断することによって、マウス２Ｄ６細胞増殖アッセイ、ヒトＰＨＡ芽球増殖アッセイ及びインターフェロンγ誘導アッセイなどの上記に記載されている幾つかのバイオアッセイを用いて、ラット、イヌ、カニクイザル及びヒヒＰＢＭＣ上清中の非ヒトＩＬ－１２活性の存在を確認した。次いで、応答の５０％の阻害が観察されるＪ６９５抗体濃度を測定することによって、同じバイオアッセイにおいて、ＰＢＭＣ上清中の非ヒトＩＬ－１２又は精製されたマウス及びアカゲザルＩＬ－１２との、ヒト抗ＩＬ－１２抗体Ｙ６１及びＪ６９５の交叉反応性を評価した。種の交叉反応性の結果は、表５に要約されている。結果は、Ｙ６１及びＪ６９５がそれぞれ、サル（例えば、Ｙ６１に関してはカニクイザル及びアカゲザルＩＬ－１２、及びＪ６９５に関してはカニクイザル、アカゲザル及びヒヒ）から得たＩＬ－１２を認識できること、並びにＪ６９５は、イヌＩＬ－１２に対して約３５倍活性が少ないこと、Ｙ６１及びＪ６９５は何れも、マウス又はラットＩＬ－１２と交叉反応しないことを示している。

【０４５３】

Ｈ．Ｊ６９５のヒトサイトカイン特異性

固定化されたヒトＩＬ－１２への可溶性Ｊ６９５の結合を妨害する能力に関して、ヒトサイトカインの群が検査される競合ＥＬＩＳＡにおいて、Ｊ６９５の特異性を検査した。ヒトサイトカインの群には、ＩＬ－１α及びＩＬ－ｌβ（Ｇｅｎｚｙｍｅ、Ｂｏｓｔｏｎ、ＭＡ）、ＩＬ－２（Ｅｎｄｏｇｅｎ）、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１７、ＩＦＮ－γ並びにＴＧＦ－β１（Ｒ＆Ｄ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）ＩＬ－８（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、ＰＤＧＦ、ＩＧＦ－Ｉ及びＩＧＦ－ＩＩ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ Ｃｏｒｐ．，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）、ＴＮＦα及びリンホトキシン、ＩＬ－６、可溶性ＩＬ－６受容体、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＬ－１２ｐ４０、Ｍ－ＣＳＦ、及びＬＩＦが含まれた。ＥＢＩ－３（Ｂリンパ球中でエプシュタイン－バールウイルス感染によって誘導されるＩＬ－１２ｐ４０関連タンパク質（Ｄｅｖｅｒｇｎｅ ｅｔ ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７０，１１４３－１１５３））を、ヒトＩｇＧ－Ｆｃキメラ（ＥＢＩ－３／Ｆｃ）として発現させた。一本鎖サケ精子ＤＮＡ（Ｓｉｇｍａ）も検査した。

【０４５４】

【表６】

表５　種交叉反応性のデータ

IC_{50} (M)								
抗体		マウスIL-12	ラットIL-12	イヌIL-12	カニクイザルIL-12	アカゲザルIL-12	ヒヒIL-12	ヒトIL-12
名前	特異性	精製された	PBMC上清	PBMC上清	PBMC上清	精製された	PBMC上清	精製された
C17.15	ﾗｯﾄ-αmuIL	3.0×10^{-11}						
R03B03	ｳｻｷﾞ-αmuIL12	1.5×10^{-10}	6.0×10^{-10}					
C8.6.2	ﾏｳｽ-αmuIL12				1.2×10^{-10}	1.0×10^{-10}	2.0×10^{-10}	5.0×10^{-11}
Y61	ヒト-αmuIL12	中和せず			2.2×10^{-10}	1.0×10^{-10}		1.7×10^{-10}
J695	ヒト-αhuIL12	中和せず	中和せず	3.5×10^{-10}	1.0×10^{-10}	1.0×10^{-10}	1.5×10^{-10}	5.0×10^{-12}

【０４５５】

平底ＥＬＩＳＡイムノアッセイマイクロタイタープレート（９６ウェル、高結合、Ｃｏｓｔａｒ）を、４℃で一晩、０．１ｍＬヒトＩＬ－１２（０．１Ｍカーボナートコーティング緩衝液（４容量０．１ＭＮａＨＣＯ$_3$＋８．５容量０．１ＭＮａＨＣＯ$_3$）中２μｇ／ｍＬ）で被覆した。０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０（ＰＢＳ－Ｔ）を含有するＰＢＳでプレートを２回洗浄し、室温で１時間、ＰＢＳ－Ｔ中の１ｍｇ／ｍＬウシ血清アルブミン（ＢＳＡ，Ｓｉｇｍａ）２００μＬでブロックし、再び、ＰＢＳ－Ｔで２回洗浄した。５０μｇ／ｍＬＢＳＡを含有するＰＢＳ－Ｔ中に（ＰＢＳ－Ｔ／ＢＳＡ）ＩＬ－１２抗体Ｊ６９５（１００ｎｇ／ｍＬ）及び各サイトカイン（２ｎＭ）を含有する試料（１００μＬ）を添加し、室温で２時間温置した。プレートを４回洗浄し、マウス抗ヒトλ－ＨＲＰ１００μＬ（ＰＢＳ－Ｔ／ＢＳＡ中の１：５００、ＳｏｕｔｈｅｒｎＢｉｏｔｅｃｈ．Ａｓｓ．Ｉｎｃ．，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＡＬ）とともに室温で１時間温置した。プレートを４回洗浄し、ＡＢＴＳ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）を用いて、暗所にて、２０から３０分間呈色させた。マイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ）を用いて、ＯＤ$_{450}$ｎｍを読み取った。一切の可溶性サイトカインの不存在下において、ＩＬ－１２によって被覆されたプレートへのＪ６９５の結合に比べたパーセント結合を測定した。

【０４５６】

結果は、固定化されたＩＬ－１２によって被覆されたプレートへのＪ６９５の結合がヒトＩＬ－１２ｐ７０によってのみ遮断され、より低い程度で、ヒトＩＬ－１２ｐ４０によって遮断され、検査された他のサイトカインの何れによっても遮断されないことを示した。

【０４５７】

Ｉ．新規ＩＬ－１２分子への結合

ｐ３５サブユニットが新規ｐ１９分子によって置換されている別のＩＬ－１２ヘテロ二量体が記載されている。ｐ１９は、ＩＬ－６／ＩＬ－１２ファミリーメンバーを探索する３Ｄ相同性を用いて同定され、活性化された樹状細胞によって合成される。Ｐ１９はｐ４０と結合して、ｐ１９／ｐ４０二量体（これは、ＩＬ－１２様活性を有する。）を形成するが、ＩＦＮγ誘導において、ｐ３５／ｐ４０ヘテロ二量体ほど強力ではない。ｐ４０単独を認識するが、好ましくは、ｐ７０分子に関しても認識する抗体（例えば、Ｊ６９５及びＹ６１、実施例３Ｈ参照）は、ｐ３５／ｐ４０分子及びｐ１９／ｐ４０分子の両方を中

和すると予測される。

【実施例４】

【０４５８】

抗ｈＩＬ－１２抗体のインビボでの活性

カニクイザルでの末梢血液学に対するヒトＩＬ－１２の効果を研究するためにＢｒｅｅ他によって使用されたモデルから改変されたモデルにおいて、ＩＬ－１２によって誘導された応答に対するＩＬ－１２抗体のインビボでの効果を調べた（Ｂｒｅｅ ｅｔ ａｌ，（１９９４）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２０４：１１５０－１１５７）。以前の研究では、５日間にわたる、１μｇ／ｋｇ／日のヒトＩＬ－１２の投与は、２４時間後に、白血球数（ＷＢＣ）の減少、特にリンパ球及び単球亜群の減少をもたらした。血小板数の減少が、７２時間の時点で観察された。血漿ネオプテリン（ＩＦＮ－γに応答した単球活性化のマーカー）の濃度は２４時間の時点で上昇し始め、７２時間の時点で最高であった。

【０４５９】

ヒト抗ｈＩＬ－１２抗体を用いた最初の研究において、５ｋｇの平均体重を有する１５匹の健康なカニクイザルを選択し、５つのグループ（ｎ＝３）に分けた。群１には、１０ｍｇ／ｋｇヒト静脈内免疫グロブリンの静脈内（ＩＶ）投与を与えた（ＩＶＩＧ，Ｍｉｌｅｓ，Ｅｃｋｈａｒｔ，ＩＮ，プロテインＡ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅを用いて精製）。群２には、１ｍｇ／ｋｇＣ８．６．２（中和マウス抗ヒトＩＬ－１２モノクローナル抗体）の静脈内投与を与えた。群３には、１０ｍｇ／ｋｇＣ８．６．２の静脈内投与を与えた。群４には、１ｍｇ／ｋｇＹ６１（ヒト抗ヒトＩＬ－１２抗体、ＣＨＯ細胞馴化培地から精製）の静脈内投与を与えた。群５には、１０ｍｇ／ｋｇＹ６１の静脈内投与を与えた。

【０４６０】

抗体投与の１時間後に、全ての動物に、ヒトＩＬ－１２（１μｇ／ｋｇ）の単回皮下（ＳＣ）注射を与えた。以下の時点：ベースライン、８、２４、４８、９６及び２１６時間で、血液試料を採取し、示差及び血清化学を用いて、完全な血液細胞の数に関して分析した。血清ヒトＩＬ－１２、Ｃ８．６．２抗体、Ｙ６１抗体、サルＩＦＮ－γ、サルＩＬ－１０、サルＩＬ－６及び血漿ネオプテリン濃度も測定した。

【０４６１】

ＩＬ－１２＋ＩＶＩＧ対照抗体で処理された動物（群１）は、赤血球、血小板、リンパ球数及び単球数など、予想された血液学的変化の多くを示した。１又は１０ｍｇ／ｋｇのＣ８．６．２又はＹ６１抗体の何れかで処理された動物（群２から５）では、これらの減少は見られず、又はより顕著でなかった。

【０４６２】

サルＩＦＮ－γ及びサルＩＬ－１０（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｃａｍａｒｉｌｌｏ，ＣＡ）、サルＩＬ－６（Ｅｎｄｏｇｅｎ）及び血漿ネオプテリン（ＩＣＮ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｏｒａｎｇｅｂｕｒｇ，ＮＹ）に対して特異的なＥＬＩＳＡによって、血清又は血漿試料を分析した。ＩＬ－１２＋ＩＶＩＧで処理された対照を含むＩＬ－１２処理された動物の全てにおいて、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１０及びＩＬ－６は検出されなかった。これは、おそらく、ＩＬ－１２への低濃度の曝露（僅か１μｇ／ｋｇの１回投薬）によるものである。それにも関わらず、ＩＬ－１２＋ＩＶＩＧで処理された動物では血漿ネオプテリン濃度が約３倍増加していたが、Ｃ８．６．２で処理された動物又はより低用量（１ｍｇ／ｋｇ）のＹ６１で処理された動物を含むＹ６１処理された動物の全てにおいて変化しておらず、Ｙ６１がＩＬ－１２に対するこの感受性応答を遮断する上でインビボにおいて有効であったことを示唆する。

【０４６３】

第二の研究では、外来ｒｈＩＬ－１２を投与し、Ｊ６９５がｒｈＩＬ－１２投与に通常伴われる応答を遮断又は低下させ得るかどうかを測定するために、カニクイザルでのＪ６９５のインビボ活性及び薬物動力学（ＰＤ）を研究した。雄のカニクイザル（ｎ＝３／群）に、伏在静脈を介した大量瞬時静脈内（ＩＶ）注射として又は背側皮膚中の皮下（ＳＣ

）へ、０．０５、０．２又は１．０ｍｇ／ｋｇＪ６９５又は１ｍｇ／ｋｇ静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）の単回用量を投与した。Ｊ６９５又はＩＶＩＧの投与から１時間後、全ての動物の背側皮膚内に１μｇ／ｋｇｒｈＩＬ－１２の単回皮下投薬を与えた。Ｊ６９５投与から最大２８日まで、大腿静脈を介して血液試料を集めた。各血液試料から血清を取得し、ＥＬＩＳＡによって、ＩＬ－１２、Ｊ６９５、ＩＦＮ－γ及び抗Ｊ６９５抗体に対してアッセイを行った。逆相高性能液体クロマトグラフィーによって、ネオプテリンのアッセイを行った。

【０４６４】

Ｊ６９５又はｒｈＩＬ－１２の投与前に測定されたネオプテリンの濃度に関して標準化されたネオプテリンの濃度が、図３に示されている。ネオプテリンの抑制を群間で比較するために、ネオプテリン濃度に対して標準化された曲線下面積（ＡＵＣ）を各動物に対して計算した（表６）。ネオプテリン曝露（ＡＵＣ）は、ＩＶＩＧ対照群と比べて、ＩＶ群中では約７１と９３％の間で、及びＳＣ群では７１と１００％の間で、用量依存的様式で抑制された。これらの結果は、ネオプテリン応答（ED_{50}）の５０％阻害に必要なＪ６９５の用量は、ＩＶ又はＳＣ経路の何れかによって投与された場合、０．０５ｍｇ／ｋｇ未満であることを示唆している。

【０４６５】

【表７】

表６：カニクイザルにおけるJ695によるIL-12誘導性ネオプテリンの用量依存性抑制

IVIG又はJ695及びrhIL-12の投薬経路	J695用量 (mg/kg)	IVIG用量 (mg/kg)	標準化されたネオプテリンレベルの曲線下面積	対照と比較したネオプテリン曲線下面積の%減少
単回静脈内注射の1時間後に、1μg/kgヒトIL-12の用量を皮下に与えた	−	1.0	1745±845	0
	0.05	−	502±135	71.3
	0.2	−	199±316	88.6
	1.0	−	128±292	92.7
単回静脈内注射の1時間後に、1μg/kgヒトIL-12の用量を皮下に与えた	−	1.0	1480±604	0
	0.05	−	426±108	71.2
	0.2	−	395±45.9	73.3
	1.0	−	0±109	100

【０４６６】

Ｊ６９５での処理も、ｒｈＩＬ－１２投与に通常伴う血液学（白血球減少症及び血小板減少症）の変化を抑制し、又は低下させた。対照ＩＶ及びＳＣＩＶＩＧ処理群のベースライン値と比べると、ｒｈＩＬ－１２投与から２４時間後に、リンパ球数が約５０％低下していた。３つの用量濃度全てでのＪ６９５のＳＣ又はＩＶ投与はこの低下を抑制し、ベースライン値と概ね同じリンパ球数を２４時間の時点でもたらした。ＩＬ－１２投与から４８時間後に、ＩＶ及びＳＣＩＶＩＧで処理された群中の血小板数は、ベースライン値と比べたときに、約２５％低下していた。

【０４６７】

反復投与中の僅かな蓄積を仮定すると、９０％効果濃度を上回る血清濃度を維持することを目標とした一例の投薬スケジュールは、概ね隔週に与えられる１ｍｇ／ｋｇＩＶ及びＳＣであり、又は概ね毎週与えられる０．３ｍｇ／ｋｇである。この研究は、このような投薬量で抗体をサルへ安全に与えることができることを示している。独立の毒性研究では、抗体の最大１００ｍｇ／ｋｇをサルへ安全に与え得ることがさらに見出された。

【０４６８】

Ｊ６９５は、キメラＩＬ－１２（マウスｐ３５サブユニットをヒトＩＬ－１２ｐ４０サ

ブユニットと組み合わせた分子）で処理されたマウス中のＩＦＮ－γ産生を抑制する上でも効果的である。マウス中で生物学的不活性であるヒトＩＬ－１２とは異なり、このキメラＩＬ－１２は、ＩＦＮ－γの誘導を含む生物学的機能をマウス中で保持する。さらに、ヒトｐ４０サブユニットは、この分子にＪ６９５が結合し、中和できるようにする。０、１、２、３及び４日目に、５つの１日用量で、０．０５ｍｇ／ｋｇの用量のキメラＩＬ－１２を、雌のＣ３Ｈ／ＨｅＪマウス（１０匹／実験群）に腹腔内投与された。ＩＬ－１２注射の３０秒前に、０．０５、０．０１、０．００２、０．０００４、０．００００８及び０．０００００１６ｍｇ／ｋｇの用量で、０、２及び４日目に、Ｊ６９５を与えた。０、２及び４日目に、０．０５ｍｇ／ｋｇの用量で、対照ｈｕＩｇＧ１γを腹腔内に与えた。５日目にマウスから採血し、ＥＬＩＳＡによって、血清ＩＦＮ－γ濃度を測定した。結果は、Ｊ６９５が、約０．００１ｍｇ／ｋｇのＥＤ$_{50}$で、ＩＦＮ－γ産生の用量依存的阻害を引き起こすことを示した。総合すると、これらの結果は、Ｊ６９５がインビボでのＩＬ－１２活性の強力な阻害剤であることを示している。

【実施例５】

【０４６９】

組換えヒトＩＬ－１２（ｒｈＩＬ－１２）へのヒト抗体の結合の速度論的分析

ＢＩＡｃｏｒｅ系（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を用いて、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって、捕捉されたリガンド（バイオマトリックス上に捕捉されたヒト抗ｒｈＩＬ－１２抗体Ｊ６９５）と分析物（溶液中のｒｈＩＬ１２）間でのリアルタイム結合相互作用を測定した。システムは、デキストランバイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出するために、ＳＰＲの光学的特性を使用する。タンパク質は、既知濃度でデキストランマトリックスに共有結合される。デキストランマトリックスを通じて抗体を注入し、注入された抗体と固定化されたリガンド間の特異的結合は、増加したマトリックスタンパク質濃度をもたらし、その結果、ＳＰＲシグナルの変化をもたらす。これらのＳＰＲシグナルの変化は、共鳴単位（ＲＵ）として記録された、センサーグラムのｙ軸に沿って、時間に関して表示される。

【０４７０】

バイオセンサーマトリックス上へのヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，カタログ番号２０４０－０１，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＡＬ）の固定化を促進するために、まず、１００ｍＭＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）及び４００ｍＭＮ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）を用いて、マトリックス上のカルボキシル基を活性化することによって、遊離のアミン基を介して、ヤギ抗ヒトＩｇＧをデキストランマトリックスへ共有結合させる。次に、活性化されたマトリックスを横切って、ヤギ抗ヒトＩｇＧを注入する。ヤギ抗ヒトＩｇＧ３５μＬ（２５μｇ／ｍＬ）を酢酸ナトリウムｐＨ４．５中に希釈し、活性化されたバイオセンサーを横切って注入し、タンパク質上の遊離アミンを活性化されたカルボキシル基へ直接結合させる。反応しなかったマトリックスＥＤＣ－エステルは、１Ｍエタノールアミンの注入によって不活化する。標準的なアミンカップリングキットは市販されている（ＢｉａｃｏｒｅＡＢ，カタログ番号ＢＲ－１０００－５０，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）。

【０４７１】

ヤギ抗ヒトＩｇＧを介して、マトリックス上に捕捉させるために、ＨＢＳ走行緩衝液（ＢｉａｃｏｒｅＡＢ，カタログ番号Ｎｏ．ＢＲ－１００１－８８，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）中にＪ６９５を希釈した。ｒｈＩＬ１２特異的抗体が固定化されたヤギ抗ヒトＩｇＧを結合する能力を測定するために、以下のようにして、結合アッセイを実施した。ヤギ抗ヒトＩｇＧポリクローナル抗体が連結されたデキストランマトリックスを通じて、５μＬ／分の流速で、Ｊ６９５の分取試料（２５μｇ／ｍＬ；２５μＬ分取試料）を注入した。タンパク質の注入の前に及び直後に、ＨＢＳ緩衝液のみを各フローセルを通して流した。結合されたＩｇＧ１Ｊ６９５の量（約１２００ＲＵ）を表すために、ベースラインとＪ６９５注入完了から約３０秒後の対応する点とのシグナルの正味の差を取った。可溶

性ｒｈＩＬ１２への直接のｒｈＩＬ１２特異的抗体の結合を測定した。ＨＢＳ走行緩衝液中にサイトカインを希釈し、５μＬ／分の流速で、固定化されたタンパク質マトリックスを通じて、分取試料５０μＬを注入した。使用したｒｈＩＬ－１２の濃度は、１０、２０、２５、４０、５０、８０、１００、１５０及び２００ｎＭであった。ｒｈＩＬ－１２の注入の前に及び直後に、各フローセルを通してＨＢＳ緩衝液のみを流した。特定の試料の結合値を表すために、ベースラインシグナルとサイトカイン注入完了後のシグナルの正味の差を取った。次の試料の注入前に、１００ｍＭＨＣｌを用いて、バイオセンサーマトリックスを再生した。解離定数（ｏｆｆ速度）、会合定数（ｏｎ速度）を測定するために、ＢＩＡｃｏｒｅ速度論評価ソフトウェア（バージョン２．１）を使用した。

【０４７２】

ＣＯＳ由来Ｊ６９５と比べた、ＣＨＯ由来Ｊ６９５のｒｈＩＬ－１２への結合の代表的結果が、表７に示されている。

【０４７３】

【表８】

表７：CHO又はCOS由来のJ695のrhIL-12への結合

源	rhIL12, nM	結合されたrhIL12、RU	Ab、結合、RU	rhIL12/AB
CHO	200	1112	1613	1.48
CHO	150	1033	1525	1.45
CHO	100	994	1490	1.43
CHO	80	955	1457	1.40
CHO	50	912	1434	1.36
CHO	40	877	1413	1.33
CHO	25	818	1398	1.25
CHO	20	773	1382	1.20
CHO	10	627	1371	0.98
源	rhIL12, nM	結合されたrhIL12、RU	Ab、結合、RU	rhIL12/AB
CHO	200	1172	1690	1.49
CHO	150	1084	1586	1.46
CHO	100	1024	1524	1.44
CHO	80	985	1489	1.42
CHO	50	932	1457	1.37
CHO	40	894	1431	1.34
CHO	25	833	1409	1.27
CHO	20	783	1394	1.20
CHO	10	642	1377	1.00

【０４７４】

ＢＩＡｃｏｒｅ技術を用いて、捕捉されたＪ６９５と可溶性ｒｈＩＬ－１２間の分子速度論相互作用を定量的に分析した。幾つかの独立した実験を行い、表８に示されているように、速度論的速度定数を導き出すために利用可能なＢＩＡｃｏｒｅ数学的解析ソフトウェアによって結果を分析した。

【０４７５】

【表９】

表８：rhIL-12に対するJ695の見かけの速度論的定数及び親和性定数

抗体		源	On速度（$M^{-1}s^{-1}$）	Off速度（s^{-1}）	Kd (M)、平均
J695		CHO	3.25E+05	4.72E-05	1.34E-10
J695		COS	3.40E+05	2.61E-05	9.74E-11

【０４７６】

ＣＨＯ由来Ｊ６９５（K_d＝１．３４$^{-10}$Ｍ$^{-1}$）及びＣＯＳ由来Ｊ６９５（Ｋｄ＝９．７４×１０$^{-11}$Ｍ$^{-1}$）抗体間の相互作用に対して計算された見かけの定数（K_d）間に、小さな差が存在した。Ｊ６９５とｒｈＩＬ１２間の見かけの解離定数（K_d）は、式：K_d＝ｏｆｆ速度／ｏｎ速度によって、観察された速度定数から推測した。

【０４７７】

Ｊ６９５とｒｈＪＬ－１２間の相互作用に対する見かけの会合及び解離速度定数を測定するために、Ｊ６９５の固定量（２μｇ／ｍＬ）及びｒｈＩＬ－１２の変動する濃度を用いて、幾つかの結合反応を実施した。捕捉されたＪ６９５と可溶性ｒｈＩＬ１２間のリアルタイム結合相互作用センサーグラムは、抗体の両形態が会合及び解離相の両方に対して極めて似通っていることを示した。

【０４７８】

捕捉されたＩｇＧ１Ｊ６９５ｍＡｂが可溶性組換えサイトカインを結合する能力をさらに評価するために、直接的ＢＩＡｃｏｒｅ法を使用した。この方法では、ヤギ抗ヒトＩｇＧ（２５μｇ／ｍＬ）が連結されたカルボキシメチルデキストランセンサー表面を、ＩｇＧ１Ｊ６９５（２μｇ／ｍｌ）で被覆し、次いで、組換えサイトカインを添加した。ＣＨＯ又はＣＯＳ由来ＩｇＧ１Ｊ６９５が捕捉されたバイオセンサー表面を横切って、可溶性ｒｈＩＬ１２を注入し、溶液中のサイトカインの濃度が増加するにつれて、シグナルの量が増加した。ｒｍＩＬ－１２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号４１９－ＭＬ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）では、結合は観察されなかった（すなわち、最大１０００ｎＭまで検査されたあらゆるｒｈＩＬ－１２濃度）。これらの結果は、ＩｇＧ１Ｊ６９５抗体がｒｈＩＬ－１２上の異なる決定基を認識するという結論を支持する。

【０４７９】

表９は、可溶性ｒｂＩＬ－１２のみへのヒトＩｇＧ１Ｊ６９５ｍＡｂの結合を示し、他の組換えサイトカインへは結合しないことを示すためのＢＩＡｃｏｒｅを用いた実験の結果を示している。

【０４８０】

【表１０】

表９：BIAcore 技術を用いた J695 のエピトープマッピング

	捕捉されたリガンド COSJ695	捕捉されたリガンド CHOJ695
可溶性分析物		
組換えヒト IL-12	陽性	陽性
組換えヒト IL-12	陰性	陰性

【実施例６】

【０４８１】

ＩＬ－１２に対するＪ６９５の親和性のさらなる研究

ＢＩＡｃｏｒｅプラズモン共鳴技術を用いて、Ｊ６９５抗体とヒトＩＬ－１２間の分子速度論的相互作用を定量的に分析し、見かけの速度論的速度定数を導出した。

【０４８２】

可溶性ｒｈＩＬ－１２の固相捕捉されたＪ６９５への結合を測定するために、ＢＩＡｃｏｒｅ技術を使用した。バイオセンサーチップ上にヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体を固定化し、次いで、Ｊ６９５の一定量を注入し、表面上に捕捉した。ｒｈＩＬ－１２の変動する濃度を適用し、Ｊ６９５への異なる濃度のＩＬ－１２の結合を時間の関数として測定した。ゼロ次解離及び一次会合速度論並びにＪ６９５とＩＬ－１２間での単純な１対１分子相互作用を仮定して、見かけの解離及び会合速度定数を計算した。３つの独立した実験が行われ、示されている値は３つの実験に対する平均である。これらの測定から、見かけの解離（k_d）及び会合（k_a）速度定数が導出され、相互作用に対するK_d値を計算するために使用された（表１０参照）。これらの結果は、Ｊ６９５がｒｈＩＬ－１２に対して高い親和

性を有することを示した。

【０４８３】

【表１１】

表１０：J695とヒトIL-12間の相互作用に対する速度論的パラメータ

速度論的パラメータ	値
k_d	$3.71\pm0.40\times10^{-3}s^{-1}$
k_a	$3.81\pm0.48\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$
k_d	$9.74\times10^{-11}M$ (14ng/mL)

【実施例７】

【０４８４】

Ｃ１７．１５（マウスインターロイキン－１２に対するラットモノクローナル抗体）の特徴及び中和活性

マウスＩＬ－１２に対して特異的なモノクローナル抗体を用いた炎症及び自己免疫のマウスモデルにおけるＩＬ－１２治療研究の、ヒト疾病における類似のアプローチへの妥当性を評価するために、Ｃ１７．１５（ラット抗マウスＩＬ－１２モノクローナル抗体）のマウスＩＬ－１２との相互作用を調べた。Ｃ１７．１５－マウスＩＬ－１２結合相互作用の速度論を評価しながら、ＰＨＡ芽球増殖アッセイ中でＣ１７．１５がマウスＩＬ－１２活性を中和する能力及び細胞表面受容体へのマウスＩＬ－１２結合を遮断する能力を評価した

ヒトＰＨＡ芽球増殖アッセイ（実施例３参照）において、Ｃ１７．１５又はラットＩｇＧ２ａ（対照抗体）の系列希釈を、２３０ｐｇ／ｍＬマウスＩＬ－１２とともに、３７℃で１時間予め温置した。ＰＨＡによって刺激された芽球細胞を抗体－ＩＬ－１２混合物へ添加し、３７℃で３日間温置した。続いて、１μＣｉ／ウェル［^{3}Ｈ］－チミジンで、細胞を６時間標識した。培養物を採取し、［^{3}Ｈ］－チミジンの取り込みを測定した。添加されたマウスＩＬ－１２の不存在下で、バックグラウンド非特異的増殖を測定した。全ての試料は、二つ組みでアッセイを行った。同じ条件下で、組換えヒトＩＬ－１２に対して、Ｊ６９５に対して観察された５．８×１０$^{-12}$のＩＣ$_{50}$値と比べて、このアッセイにおける組換えマウスＩＬ－１２に対するＣ１７．１５のＩＣ$_{50}$（Ｍ）は１．４×１０$^{-11}$であることが明らかとなった（表１１参照）。

【０４８５】

【表１２】

表１１：抗ヒトIL-12モノクローナル抗体J695とラット抗マウスIL-12モノクローナル抗体C17.15の特性の比較

抗体	エピトープ	生物分子相互作用アッセイ			受容体結合アッセイ	PHA芽球アッセイ
		K_a, on速度	K_d, off速度	K_d (M)	IC_{50} (M)	IC_{50} (M)
J695	Hu p40	3.81×10^{5}	3.71×10^{-5}	9.74×10^{-11}	1.1×10^{-11}	5.8×10^{-12}
C17.15	Mu p40	3.80×10^{5}	1.84×10^{-4}	4.80×10^{-10}	1.5×10^{-10}	1.4×10^{-11}

【０４８６】

Ｃ１７．１５が細胞の受容体へのマウスＩＬ－１２の結合を阻害する能力も測定した。Ｃ１７．１５の系列希釈を、結合緩衝液中の１００ｐＭ［^{125}Ｉ］－マウスＩＬ－１２とともに、３７℃で１時間、予め温置された。２Ｄ６細胞（２ｘ１０^{6}）を抗体／［^{125}Ｉ］－マウスＩＬ－１２混合物に添加し、室温で２時間温置した。細胞に結合された放射能を遊離の［^{125}Ｉ］－ＩＬ－１２から分離し、残りの細胞に結合された放射能を測定した。抗体の不存在下で、２Ｄ６細胞上の受容体への標識されたマウスＩＬ－１２の総結合を測定し、アッセイ中に２５ｎＭ非標識マウスＩＬ－１２を含めることによって、非特異的結合を測定した。特異的結合は、全結合－非特異的結合として計算した。温置は、

二つ組みで行った。結果は、細胞受容体へのマウスＩＬ－１２の結合の阻害に対して、Ｃ１７．１５が１．５×１０$^{-10}$のＩＣ$_{50}$（Ｍ）を有することを示した。

【０４８７】

組換えマウスＩＬ－１２に対するＣ１７．１５の親和性は、生物分子相互作用分析によって評価した。ヤギ抗ラットＩｇＧ抗体をバイオセンサーチップ上に固定化した後、Ｃ１７．１５抗体の固定された量を注入して、チップの表面上へＣ１７．１５を捕捉させた。組換えマウスＩＬ－１２の変動する濃度をＣ１７．１５表面に適用し、固定化されたＣ１７．１５へのマウスＩＬ－１２の結合を時間の関数として測定した。ゼロ次解離及び一次会合速度論並びに固定化されたＣ１７．１５とマウスＩＬ－１２間での単純な１対１分子相互作用を仮定して、見かけの解離及び会合速度定数を計算した。これらの測定から、見かけの解離（Ｋ$_{d}$、ｏｆｆ速度）及び会合（Ｋ$_{a}$、ｏｎ速度）速度定数を計算した。相互作用に対するＫ$_{d}$値を計算するために、これらの結果を使用した。組換えマウスＩＬ－１２－Ｃ１７．１５相互作用に対して、３．８×１０^{5}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$のｏｎ速度、１．８４５×１０$^{-4}$ｓ$^{-1}$のｏｆｆ速度及び４．８×１０$^{-10}$のＫ$_{d}$が観察された。

【０４８８】

マウスＩＬ－１２活性の中和及び細胞表面受容体への結合におけるＣ１７．１５の観察された活性並びにマウスＩＬ－１２へのＣ１７．１５の結合の速度論は、Ｊ６９５－ｒｈＩＬ－１２相互作用に対する類似の測定と相関する。これは、ｏｎ速度、ｏｆｆ速度、Ｋ$_{d}$、ＩＣ$_{50}$及びＰＨＡ芽球アッセイに基づくと、ラット抗マウスＩＬ－１２抗体Ｃ１７．１５及び抗ヒトＩＬ－１２抗体Ｊ６９５の作用様式がほぼ同一であることを示している。従って、これらのモデル動物での疾病の開始又は進行に対するＩＬ－１２封鎖の効果を研究するための炎症及び自己免疫疾患のマウスモデルにおけるＪ６９５に対する相同的抗体として、Ｃ１７．１５を使用した（実施例８参照）。

【実施例８】

【０４８９】

α－マウスＩＬ－１２抗体投与による、マウス中の自己免疫又は炎症をベースとする疾病の治療

Ａ．αＩＬ－１２抗体Ｃ１７．１５によるマウス中のコラーゲン誘導性関節炎の抑制

ＩＬ－１２濃度と関節リウマチ（ＲＡ）との相関が示されている。例えば、健康な対照と比べて、ＲＡ患者の滑液中にＩＬ－１２ｐ７０の上昇した濃度が検出されている（Ｍｏｒｉｔａ ｅｔ ａｌ（１９９８）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ａｎｄ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ．４１：３０６－３１４）。従って、ラット抗マウスＩＬ－１２抗体であるＣ１７．１５が、マウス中のコラーゲン誘導性関節炎を抑制する能力を評価した。

【０４９０】

雄のＤＢＡ／１マウス（１０匹／群）を、第０日目にＩＩ型コラーゲンで免疫化し、第－１日目（コラーゲン免疫化の１日前）から第１２日目まで、隔日に、腹腔内に、１０ｍｇ／ｋｇのＣ１７．１５又は対照ラットＩｇＧで処理した。９０日目まで、足の関節炎の発達に関して、動物を臨床的に監視した。関節炎は、以下のように等級付けした。０－正常、１－１つの関節に局在化された関節炎、２－２以上の関節が冒されるが、足全体には及ばない、３－足全体が冒される、４－足の変形、５－関与した関節の強直。マウスの関節炎スコアは、マウスのそれぞれの各足中の関節炎等級の合計であった（最大＝２０）。結果は、各群における平均±平均の標準誤差として表されている。

【０４９１】

図４に示されているように、結果は、処理から５０日後でなければ、Ｃ１７．１５処理されたマウスにおいて関節炎スコアが測定可能ではないこと、及びＣ１７．１５で処理されたマウスで得られたピーク平均関節炎スコアは、ＩｇＧ処理されたマウス中で測定されたものより少なくとも５倍低いことを示している。これは、ラット抗マウスＩＬ－１２抗体Ｃ１７．１５がコラーゲンによって誘導されるマウス中の関節炎の発達を抑制したことを示した。

【０４９２】

Ｂ．ラットα－マウスＩＬ－１２抗体Ｃ１７．１５によるマウス中の腸炎の抑制

ＩＬ－１２は、腸炎の発達／病変においても役割を果たすことが示されている。例えば、抗ＩＬ－１２抗体は、腸炎のマウスモデル（例えば、ＴＮＢＳによって誘導された腸炎ＩＬ－２ノックアウトマウス）中で疾病を抑制することが示されている（Ｓｉｍｐｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８７（８）：１２２５－３４）。同様に、抗ＩＬ－２抗体は、ＩＬ－１０ノックアウトマウス中での腸炎の形成を抑制することが示されている。ラット抗マウスＩＬ－１２抗体であるＣ１７．１５がマウス中のＴＮＢＳ腸炎を抑制する能力は、２つの研究で評価された（Ｄａｖｉｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６１（６）：３１４３－９）。

【０４９３】

第一の研究では、小児用臍帯動脈カテーテルを介して直腸内に送達された、２．０ｍｇＴＮＢＳを含有する５０％エタノール溶液１５０μＬの投与によって、無病原体ＳＪＬマウス中に腸炎を誘導した。対照動物は、５０％エタノール溶液１５０μＬのみで処理した。１１日目に、尾静脈を介して、Ｃ１７．１５の０．７５、０．５、０．２５又は０．１ｍｇ又は対照ラットＩｇＧ２ａの０．７５ｍｇの単回投薬を与え、第１１日目及び１７日目に動物の体重を測定し、第１７日目に組織学的なスコアをつけることによって、処理の治療効果を評価した。抗体処理の４８時間以内に、Ｃ１７．１５で処理されたマウスの体重が増加し、処理から６日後に正常な状態になった。Ｃ１７．１５での治療の効果は、組織学的に確認された。さらに、処理されたマウスの脾臓及び大腸からのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ分泌及び処理されたマウスからの脾臓又は大腸由来のマクロファージからのＩＬ－１２濃度の評価も行った（表１２参照）。

【０４９４】

第二の研究では、投薬を最適化し、それぞれ、Ｃ１７．１５の０．１ｍｇ若しくは０．５ｍｇ又は対照ＩｇＧ２ａの０．１ｍｇの全用量でマウスを処理し、１２日と１４日の間に分割した。０．１ｍｇ／マウス又は０．２５ｍｇ／マウスの投薬量での単回投薬におけるＣ１７．１５の投与は、非処理対照と比べて、ＴＮＢＳによって誘導された大腸炎の部分的な改善をもたらしたに過ぎず、インビトロでのＩＦＮ－γのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞産生の著しい低下をもたらさなかったが、ＩＬ－１２の分泌の著しい減少をもたらした。０．５ｍｇ／マウス又はそれ以上の単回用量では、応答が観察された。検査された抗体の最低用量を採用し、２回の分割した注射で（１２日目及び１４日目に）これを投与すると、投薬計画が改善され、複数の低用量が単一の大量瞬時投薬より効果的であり得ることを示している。得られたデータは、表１２に示されている。

【０４９５】

【表１３】

表１２：抗マウスIL-12mAb C17.15は、マウス中の確立された大腸炎を抑制する

疾病誘導0日目	処理11日目	体重(g)		IFN-γ脾臓CD4+細胞(U/mL)	IL-12脾臓マクロファージ(pg/mL)
		11日目	17日目		
TNBS+エタノール	対照IgG2a 0.75mg	16.0	15.26	3326	300
TNBS+エタノール	C17.15 0.75mg	16.0	20.21	1732	0
TNBS+エタノール	C17.15 0.5mg	16.36	19.94	1723	0
TNBS+エタノール	C17.15 0.25mg	16.28	17.7	3618	7
TNBS+エタノール	C17.15 0.1mg	16.2	17.98	3489	22
エタノール対照	－	20.76	21.16	1135	0

【０４９６】

排泄物及び大腸の巨視的外観によって評価すると、１日の間隔を空けて２つの分割された合計０．１ｍｇ／マウス又は０．０５ｍｇ／マウスの用量でＣ１７．１５モノクローナル抗ＩＬ－１２を投与することによって、大腸炎の完全な回復がもたらされた。さらに、

この投薬スケジュールは、ＩＬ－１２がＴＮＢＳ大腸炎を持たないエタノール処理された対照マウスで見られた濃度と同等であるように、固有板Ｔ細胞によるＩＦＮ－γ産生及びＩＬ－１２のマクロファージ産生の著しい下方制御をもたらした。従って、ＴＮＢＳ大腸炎のマウスモデルへのＣ１７．１５の投与は、用量依存的様式で、この疾病の進行を回復させた。

【０４９７】

Ｃ．αＩＬ－１２抗体によるマウス中の実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）の抑制

ＩＬ－１２は、多発性硬化症（ＭＳ）の発病に役割を果たしていると一般に考えられている。誘導性ＩＬ－１２ｐ４０メッセージは、ＭＳ患者の急性プラーク中に発現されるが、炎症性脳梗塞病変中には発現されないことが示されている（Ｗｉｎｄｈａｇｅｎ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８２：１９８５－１９９６）。ＭＳ患者由来のＴ細胞は、制御されていないＣＤ４０Ｌ発現を通じて、抗原提示細胞からのＩＬ－１２産生を刺激する（但し、対照Ｔ細胞は刺激しない）（Ｂａｌａｓｈｏｖ，Ｋ．Ｅ．ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４：５９９－　６０３）。ＭＳ患者は増強されたＩＦＮ－γ分泌を有し、増強されたＩＦＮ－γ分泌は、α－ＩＬ－１２抗体によって、インビトロで遮断され得る（Ｂａｌａｓｈｏｖ，Ｋ．Ｅ．ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４：５９９－６０３）。ＭＳ患者中では、血清ＩＬ－１２の上昇した濃度が検出されるが、他の神経疾患では検出されない（Ｎｉｃｏｌｅｔｔｉ，Ｆ．ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ．７０：８７－９０）。増加したＩＬ－１２産生は、ＭＳ患者中の疾病活性と相関することが示されている（Ｃｏｒｍａｂｅｌｌａ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１０２：６７１－６７８）。多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）のマウスモデルの発病におけるＩＬ－１２の役割が研究されてきた（Ｌｅｏｎａｒｄ，Ｊ．Ｐ．ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８１：２８１－３８６；Ｂａｎｅｒｊｅｅ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍ．（１９９８）４１：Ｓ３３；ａｎｄ　Ｓｅｇａｌ，Ｂ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８７：５３７－５４６）。このモデルにおけるこの疾患は、TH_1サブセットのＴ細胞によって誘導されることが知られている。従って、急性ＥＡＥの発症を抑制するα－ＩＬ－１２抗体の能力を評価した。

【０４９８】

α－ＩＬ－１２抗体は、急性ＥＡＥの発症を阻害し、発症後にこの疾病を抑制し、及び自己抗原であるミエリン塩基性タンパク質で免疫されたマウスでの再発の重度を減少させ得ることが見出された（Ｂａｎｅｒｊｅｅ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍ．（１９９８）４１：Ｓ３３）。マウスでのα－ＩＬ－１２抗体治療の有益な効果は、治療を停止した後、２ヶ月にわたって持続した。抗ＩＬ－１２抗体は養子免疫伝達による脳炎生成Ｔ細胞ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｏｇｅｎｉｃのレシピエントであるマウスにおいてこの疾病を抑制する（Ｌｅｏｎａｒｄ，Ｊ．Ｐ．ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８１：２８１－３８６）。

【実施例９】

【０４９９】

Ｊ６９５の臨床薬理学

二重盲検クロスオーバー試験において、６４人の健康な男性ヒト被験者に、Ｊ６９５又はプラセボの漸増用量を投与した。投薬前及び投薬の０．２５時間後における補体断片Ｃ３ａの測定は、補体系の活性化を示さなかった。同時感染の症候が観察された被験者中において、ＣＲＰ及びフィブリノーゲン濃度のみが増加していた。

【０５００】

全ての被験者は生存し、Ｊ６９５の全般的な耐容性は極めて良好であった。有害な現象（ＡＥ）のために、治療を停止しなければならない事例はなかった。最も一般的に観察されたＡＥは頭痛及び通常の風邪／気管支炎であり、これらは何れも重症と分類されなかった。

【０５０１】
研究の被験者の一人である３３歳の独身男性は、研究の開始時に滴状乾癬に罹患していた。無作為化された研究計画に従って、この被験者には、皮下投与によって、５ｍｇ／ｋｇＪ６９５が偶然与えられた。抗体の投与の１０日前に、この被験者は、腕及び足の上に、僅かに小さい不連続な丘疹状病変を示した。抗体投与の時点で、この被験者は、増加した発赤、紅斑性プラークの肥厚及び増大した角質増殖症を示した。Ｊ６９５投与から１週後に、この被験者は、病変の平坦化及び鱗屑の減少を含む皮膚症状の改善を報告した。Ｊ６９５の第二の投与（５ｍｇ／ｋｇ静脈内）直後に、被験者の皮膚からは、何らの局所的治療なしに、乾癬性病変が完全に消失した。抗体の第二の投与後に、Ｊ６９５の予想された排除と付随して、白い鱗屑で覆われた紅斑性プラークが再度出現した。

【実施例１０】
【０５０２】
２つのＣＨＯ細胞株によって産生されたＪ６９５の比較
Ｊ６９５の組換え発現のために、リン酸カルシウム媒介性形質移入によって、ｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞中に、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを導入する（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ａｎｄ　Ｃｈａｓｉｎ，Ｌ．Ａ．（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７７：４２１６－４２２０）。組換え発現ベクター内で、遺伝子の転写の高い濃度を誘導するために、抗体の重鎖及び軽鎖遺伝子はそれぞれ、（ＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター制御要素又はＳＶ４０エンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター制御要素などの、ＳＶ４０、ＣＭＶ、アデノウイルスなどに由来する）エンハンサー／プロモーター制御要素へ作用可能に連結されている。組換え発現ベクターは、メトトレキサート選択／増幅を用いてベクターで形質移入されたＣＨＯ細胞の選択を可能にするＤＨＦＲ遺伝子も担持する。
【０５０３】
ヒト抗体Ｊ６９５のペプチド配列をコードする発現ベクターの１５０μｇを、５０ｍＬの円錐チューブ中の水２．７ｍＬ中に溶解した。２．５ＭＣａＣｌ$_2$３００μＬを添加し、５０ｍＬの円錐チューブ中の２×ＨＥＰＥＳ緩衝化された生理的食塩水３ｍＬへ、このＤＮＡ混合物を滴加した。５秒間渦巻き撹拌し、室温で２０分間温置した後、各プレート（なお、Ｆ１２培地中）上へ１ｍＬを均一に分配し、プレートを３７℃で４時間温置した。吸引によって液体を除去し、Ｆ１２中の１０％ＤＭＳＯ２ｍＬを各プレートに添加した。ＤＭＳＯショックは１分間継続し、その後、ＰＢＳ５ｍＬを各プレートへ添加することによって、ＤＭＳＯを希釈した。ＰＢＳ中でプレートを２回洗浄した後、Ｈ／Ｔ及び５％ＦＳＢ（ＤＨＦＲを発現する細胞に対して選択的）が補充されたαＭＥＭ１０ｍＬを添加し、３７℃で一晩温置した。１００細胞／ウェルの密度で、細胞を９６ウェルプレート中に播種し、毎週１回培地を交換しながら、３７℃、５％ＣＯ$_2$で２週間、プレートを温置した。
【０５０４】
最後の培地交換から５日後に、培養上清を１：５０希釈し、ヒトＩｇＧγ鎖に対して特異的なＥＬＩＳＡを用いて検査した。最も高いＥＬＩＳＡシグナルを与えるクローンを、９６ウェルプレートからαＭＥＭ＋５％透析された血清の１．５ｍＬ／ウェル中の１２ウェルプレートに移した。３日後、ヒトＩｇＧγ鎖に対して特異的な別のＥＬＩＳＡを実施し、最大の活性を有する１２のクローンを、αＭＥＭ＋５％透析された血清及び２０ｎＭＭＴＸ中に分割した。細胞株０３１８９８２１８は、明白な細胞死又は増殖速度の低下なしに、２０ｎＭＭＴＸの存在下で増殖し、３日アッセイにおいて１．８μｇ／ｍＬＨＩｇＧを産生した。ＭＴＸを含有する培地中で増殖している０３１８９８２１８のＴ－２５培養物は、Ｊ６９５の平均１１．９μｇ／ｍＬを産生した。ＡＬＰ９０３と表記される株は、無血清条件下の懸濁液中で増殖に適合され、７．５ｐｇＪ６８５／細胞／２４時間を産生した。
【０５０５】
αＭＥＭ／５％ＦＢＳ／２０ｎＭＭＴＸ培地中での最初の選択後、ＡＬＰ９０３細胞を

、２０ｎＭＭＴＸ中で再度継代させた。１００ｎＭＭＴＸ選択下で細胞を培養した後、次の３０日間、５０ｎＭＭＴＸ中で２回継代させた。この時点で、培養物は３２μｇＪ６９５／ｍＬ／２４時間を産生していた。限界希釈によって、培養物のサブクローニングを行った。サブクローン２１８－２２は、２日で、９６ウェルプレート中にＪ６９５の１６．５μｇ／ｍＬ及び２日で、１２ウェル皿中にＪ６９５の５０．３μｇ／ｍＬを産生した。αＭＥＭ／５％透析されたＦＢＳ／５００ｎＭＭＴＸ中でクローン２１８－２２を３８日間培養した後、上述のように、無血清撹拌培養へ適合させた。ＡＬＰ９０５と表記された無血清懸濁培養の平均細胞特異的生産性は、５８ｐｇ／細胞／２４時間であった。

【０５０６】

Ｊ６９５を産生するために使用される第一の細胞株（ＡＬＰ９０３）は、第二の細胞株ＡＬＰ９０５より少ない培養からの抗体の収量をもたらした。ＡＬＰ９０５によって産生されたＪ６９５がＡＬＰ９０３から産生されたものと機能的に同一であることを確認するために、ＩＬ－１２親和性、細胞受容体へのＩＬ－１２結合の遮断能、ＩＬ－１２によるＩＦＮ－γ誘導の阻害能及びＩＬ－１２媒介性ＰＨＡ芽球増殖の阻害能に関して、抗体の両バッチを評価した。

【０５０７】

表面プラズモン共鳴研究（ＢＩＡｃｏｒｅ分析）によって、ＩＬ－１２への結合の速度論的速度定数を測定することによって、Ｊ６９５バッチＡＬＰ９０３及びＡＬＰ９０５のＩＬ－１２に対する親和性を測定した。ｒｈＩＬ－１２への結合に対する抗体バッチＡＬＰ９０３及びＡＬＰ９０５のｏｆｆ速度定数（K_d）及びｏｎ速度定数（K_a）を、（実施例３に記載されているように）３つの実験において測定した。ＩＬ－１２への結合の親和性K_dは、ｏｆｆ速度定数をｏｎ速度定数によって割ることによって計算した。

【０５０８】

各別個の実験に対してK_dを計算し、次いで、平均した。結果は、ｒｈＩＬ－１２への結合の速度論的パラメータ及び親和性がＪ６９５バッチＡＬＰ９０３及びＡＬＰ９０５に対して極めて似ていることを示した。計算されたK_dは、バッチＡＬＰ９０３に対して１．１９±０．２２×10^{-10}Ｍ及びバッチＡＬＰ９０５に対して１．４９±０．４７ｘ10^{-10}Ｍであった（表１３参照）。

【０５０９】

ＡＬＰ９０３及びＡＬＰ９０５由来のＪ６９５がヒトＰＨＡによって活性化されたＴリンパ芽球上のＩＬ－１２受容体へのｒｈＩＬ－１２の結合を遮断する能力を評価した（実施例３参照）。１０倍系列希釈を用いて、１×10^{-8}の出発濃度でＪ６９５の各試料を検査した。結合緩衝液中で、５０ｐＭ［^{125}Ｉ］－ヒトＩＬ－１２とともに、３７℃で１時間、抗体を予め温置した。ＰＨＡ芽球細胞を抗体／［^{125}Ｉ］－ヒトＩＬ－１２混合物に添加し、室温で２時間温置した。遠心及び洗浄段階によって、細胞に結合された放射能を遊離の［^{125}Ｉ］－ＩＬ－１２から分離し、％阻害を計算した。４パラメータの曲線フィッティングを用いて、阻害曲線からＪ６９５に対するIC_{50}値を求め、２つの独立した実験によって確認した。温置は、二つ組みで行った。Ｊ６９５の２つのバッチに対する結果は、極めて似通っていた（表１３参照）。

【０５１０】

ＡＬＰ９０３及びＡＬＰ９０５細胞由来のＪ６９５が、ｒｈＩＬ－１２によって誘導される、ヒトＰＨＡ活性化されたリンパ芽球によるＩＦＮ－γ産生をインビトロで阻害する能力を評価した。Ｊ６９５の系列希釈を、２００ｐｇ／ｍＬｒｈＩＬ－１２とともに、３７℃で１時間予め温置した。ＰＨＡリンパ芽球細胞を添加し、３７℃で１８時間温置した。温置後、無細胞上清を取り出し、ＥＬＩＳＡによってヒトＩＦＮ－γの濃度を測定した。阻害曲線から得られたIC_{50}値を、４パラメータの曲線フィッティングを用いて抗体濃度に対してプロットした。結果は、２つのバッチがＩＦＮ－γ産生を阻害する能力は極めて似通っていることを示している。

【０５１１】

ＡＬＰ９０３及びＡＬＰ９０５Ｊ６９５のｒｈＩＬ－１２に対する中和能を測定するた

めに、インビトロＰＨＡ芽球細胞増殖アッセイを使用した。各種類のＪ６９５の系列希釈を、２３０ｐｇ／ｍＬヒトＩＬ－１２とともに、３７℃で１時間予め温置した。次に、ＰＨＡ芽球細胞を添加し、３７℃で３日間温置した。次いで、１γＣｉ／ウェル［^{3}Ｈ］－チミジンで、細胞を６時間標識した。培養物を採取し、［^{3}Ｈ］－チミジンの取り込みを測定した。ｒｈＩＬ－１２の不存在下で、非特異的増殖（バックグラウンド）を測定した。ＡＬＰ９０３及びＡＬＰ９０５Ｊ６９５に対するＩＣ$_{50}$値は極めて似通っていることが明らかとなり、表１３に示されている。

【０５１２】

ｒｈＩＬ－１２活性を中和し、細胞表面受容体へのＩＬ－１２の結合を遮断し、及びｒｈＩＬ－１２へ結合するＪ６９５抗体の活性は、バッチＡＬＰ９０３とＡＬＰ９０５では有意に異なっておらず、従って、これらの２つの異なる細胞種から産生された抗体は等しかった。

【０５１３】

【表１４】

表１３：J695 ロット ALP903 と ALP905 の特性の比較

抗体	K_a, On 速度 (M^{-1}, s^{-1})	K_d, Off 速度 (s^{-1})	K_d (M)	RB アッセイ IC_{50} (M)	PHA 芽球アッセイ IC_{50} (M)	IFN-γ アッセイ IC_{50} (M)
J695 ALP903	3.75×10^{5}	4.46×10^{-5}	1.19×10^{-10}	3.4×10^{-11}	5.5×10^{-12}	5.8×10^{-12}
J695 ALP905	3.91×10^{5}	5.59×10^{-5}	1.49×10^{-10}	3.0×10^{-11}	4.4×10^{-12}	4.3×10^{-12}

【実施例１１】

【０５１４】

Ｂｉａｃｏｒｅによる抗ｒｈＩＬ１２モノクローナル抗体エピトープマップの測定

Ｊ６９５及び可溶性組換えヒトＩＬ１２に対する他の４つのモノクローナル抗体のエピトープ特異性パターンのマップを作成するために、表面プラズモン共鳴技術に基づくリアルタイム生物特異的相互作用分析（ＢＩＡ）を使用した。この技術は、抗体又は抗原の何れかの標識を必要としない。別個の及び異なるエピトープに対して誘導された抗体は抗原へ同時に結合するのに対して、密接に関連したエピトープに対して誘導された抗体は多義の結合を妨害する。さらに、第二の抗体が結合できない場合には、２つの抗体によって規定されるエピトープは同一であり若しくは重複し得、又は第一の抗体の結合が標的分子中の立体構造の変化によって引き起こされたアロステリック阻害を通じた第二の抗体の結合を抑制し得る。

【０５１５】

Ｂｉａｃｏｒｅを用いてエピトープマッピングアッセイを行った。まず、４つの異なるフローセルにわたって、１００ｍＭＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）及び４００ｍＭＮ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）を用いて、デキストランマトリックス上のカルボキシル基を活性化した。次に、活性化されたマトリックスを横切って、抗体１を注入した。次いで、抗ｒｈＩＬ－１２抗体の約５０μＬ（２５μｇ／ｍＬ）を酢酸ナトリウムｐＨ４．５中に希釈し、活性化されたバイオセンサーを横切って注入し、タンパク質上の遊離アミンを活性化されたカルボキシル基へ直接結合させる。典型的には、５０００共鳴単位が固定化された。１Ｍエタノールアミンの注入によって、反応しなかったマトリックスＥＤＣ－エステルを不活化した。標準的なアミンカップリングキットは市販されている（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ，カタログ番号ＢＲ－１０００－５０，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）。ＣＭバイオセンサーチップ（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ，カタログ番号ＢＲ－１０００－１４，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を用いて、ＳＰＲ測定を行った。バイオセンサー表面上の分析すべき全ての抗体及び抗原を、ＨＢＳ－ＥＰ走行緩衝液（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ，カタログ番号ＢＲ－１００１－８８，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）中に希釈した。

【０５１６】
次に、２５μＬ／分の流速で、ＣＭ５バイオセンサー表面上に共有結合で固定化された抗体を横切って、ｒｈＩＬ－１２（１００ｎＭ）を注入した。抗原の注入の前に及び直後に、ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液のみを各フローセルを通して流した。
【０５１７】
次いで、捕捉されたｒｈＩＬ－１２を横切って、過剰な可溶性抗体２（２５μｇ／ｍＬ）を注入した（５分の接触時間）。抗体２の注入の前に及び直後に、ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液のみを各フローセルを通して流した。最終の結合値を表すために、ベースラインとＭａｂ注入完了から約３０秒後に対応する点との間のシグナルの正味の差を取る。再び、共鳴単位で応答を測定した。次の試料の注入前に、１０ｍＭＨＣｌを用いて、バイオセンサーマトリックスを再生した（５分の接触時間）。
【０５１８】
ＡｂｂｏｔｔＢｉｏｒｅｓｅａｒｃｈＣｅｎｔｅｒ及び／又は市販の業者によって供給された抗体及び抗原は、以下のとおりであった（ヒトＪ６９５；マウスＣ８．６．２Ｍａｂ；ヒト１Ｄ４．７Ｍａｂ；ヒトＣ３４０Ｍａｂ；マウス７Ｇ３Ｍａｂ；ヒトＩｇＧｌｃｏｎｔｒｏｌ（１．０ｍｇ／ｍＬ、Ｓｉｇｍａカタログ番号１－３８８９））。この研究において使用される抗体の各々は、ヒトＩＬ－１２のｐ４０サブユニットのエピトープへ結合する。抗体ＩＤ４．７及び７Ｇ３は、２００５年６月２９日に出願された米国仮特許出願第６０／６９５，６７９号及び２００６年６月２９日に出願された米国特許出願第１１／４７８，０９６号に記載されている。抗体Ｃ３４０は、米国特許第７，０６３，９６４号及び米国特許第６，９０２，７３４号に記載されている。先述の特許及び特許出願のそれぞれの全内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。抗体Ｃ８．６．２は、「Ａ．Ｄ’Ａｎｄｒｅａ　ｅｔ　ａｌ，１９９２Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ１７６：１３８７－１３９８」（その内容全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）に記載されている抗体Ｃ８．６のサブクローンであり、従って、抗体Ｃ８．６と同じ特徴を有する。組換えヒトインターロイキン１２（ｒｈＩＬ－１２、Ｗｙｅｔｈによって市販されている。）。
【０５１９】
検査されるモノクローナル抗体に対する反応性のパターンが、表１４に示されている。これらの実験において、Ｊ６９５及び７Ｇ３モノクローナル抗体は、組換えヒトＩＬ－１２を同時に結合することができた。この事例では、組換えヒトＩＬ－１２との同時結合は、抗体が異なる部位を占めることを確認する。マッピング実験から得られたセンサーグラムは、１Ｄ４．７及び７Ｇ３モノクローナル抗体が独立のエピトープを認識することを明らかにした。モノクローナル抗体の別の対は、［Ｃ３４０］－［ｒｈＩＬ１２］－［７Ｇ３］という順序で同時に結合することを示した。同じく、この配列中の陽性結果は、これらの２つの抗体に対する異なる、独立のエピトープを示唆した。試験抗体は、［Ｃ８．６．２］－［ｒｈＩＬ１２］－［Ｃ８．６．２］、［Ｃ３４０］－［ｒｈＩＬ１２］－［Ｃ８．６．２］及び［Ｃ３４０］－［ｒｈＩＬ１２］－［１Ｄ４．７］の順で使用された場合に、負の結果を与えた。第二の抗体の結合の欠如は、おそらく、エピトープの占有によるものである。負の対照では、正常なＢｉａｃｏｒｅアッセイ系列から組換えヒトＩＬ－１２を省略することによって、バックグラウンド濃度に対する第二の抗体からの応答を低下させた。さらに、マウス及びヒトＩｇＧの合致されたイソタイプ対照は、配向に関わらず、負の結果を与えた。
【０５２０】

【表１５】

試料		直接固定された抗ヒトIL-12Mab（約5000RU）			
		FC1	FC2	FC3	FC4
1	2°可溶性抗ヒトIL-12Mab	マウスIgG1 C8.6.2	J695	ヒトIgG1 C340	ヒトIgG1 ID4.7
2	マウスIgG C8.6.2	−	遅いrhIL-12の置換	−	−
3	J695	迅速なrhIL-12の置換	−	迅速なrhIL-12の置換	迅速なrhIL-12の置換
4	ヒトIgG1 C340	−	遅いrhIL-12の置換	−	−
5	ヒトIgG1 1D4.7	−	遅いrhIL-12の置換	−	−
6	マウスIgG1 7G3	+	+	+	+

両方の抗ヒトIL-12抗体が標的分子（rhIL-12）へ同時に結合することが可能であれば、それらは、別個の独立したエピトープを規定する。

第二の抗体が結合できなければ、２つの抗体によって規定されるエピトープは同一若しくは重複しており、又は第一の抗体の結合が標的分子中の立体構造の変化を通じて第二の結合を妨害し得る。

可溶性抗原＝組換えＩＬ－１２（p40/p35）

【０５２１】

この実施例に記載されている結果は、モノクローナル抗体エピトープを性質決定するためにＢｉａｃｏｒｅを使用できることを示している。ＳＰＲシグナルに平衡状態に達するまで、長期間にわたって、各抗体及び抗原を注入した。センサーグラムの調査は、カルボキシメチルデキストラン表面を横切って直接固定化されたときに、全てのヒト抗ｒｈＩＬ１２モノクローナル抗体がｒｈＩＬ１２へ特異的に結合することを示した。この実施例に挙げられている結果は、ＩＬ－１２へ同時に結合することができる抗体が非重複エピトープへ結合していることを示している。特に、７Ｇ３は、Ｊ６９５、Ｃ８．６．２、Ｃ３４０又は１Ｄ４．７によって共有されていない異なるエピトープへ結合する。これらの結果は、ＩＬ－１２へ同時に結合できない（ＩＬ－１２が抗体１へ結合されているときに抗体２の結合が観察されない。）検査された抗体が重複するエピトープへ結合していることをさらに示す。特に、ＩＬ－１２へのこれらの抗体の１つの結合は全ての事例で第二の抗体を結合させないので、Ｃ８．６．２、Ｃ３４０及び１Ｄ４．７はの重複するエピトープへ結合する。最後に、これらの結果は、ＩＬ－１２へ同時に結合できない抗体は、抗体が同時に結合できないようにするアロステリック相互作用によって（すなわち、抗体２は抗体１からＩＬ－１２を放出する。）、結合できないようにされることを示す。特に、Ｊ６９５はｒｈＩＬ－１２はＣ８．６．２、Ｃ３４０又は１Ｄ４．７と同時に結合できない。これらの抗体がＩＬ－１２を同時に結合できないことは、同じ結合部位に対する抗体間での単純な競合を示すものではなく、結合の際に、標的分子ＩＬ－１２中に立体構造の変化が起こることを示す。可溶性Ｊ６９５が固定化されたＣ８．６．２、Ｃ３４０又は１Ｄ４．７へ結合されたＩＬ－１２を素早く置換したという観察において、この一般的でないアロステリック機構が明白である。逆に、Ｃ８．６．２、Ｃ３４０及び１Ｄ４．７は、固定化されたＪ６９５へ結合されたＩＬ－１２をゆっくり置換した。

【実施例１２】

【０５２２】

ｐ４０サブユニットを含有するインターロイキンの立体構造を変化させることができる抗体の同定

インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットに結合し、その立体構造を変化させることができる抗体が、リアルタイム生物特異的相互作用分析（ＢＩＡ）を使用することによって同定される。実験のプロトコールは、実質的に、実施例１１に上述されているとおりである。

【０５２３】

具体的には、デキストランマトリックス上のカルボキシル基は、典型的には１００ｍＭＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）及び４００ｍＭＮ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）を用いて活性化される。次に、次いで、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットへ特異的に結合する第一の抗体を、活性化されたマトリックスを横切って注入する。特に、活性化されたマトリックスを横切って注入された第一の抗体は、抗体Ｃ８．６．２、Ｃ３４０又は１Ｄ４．７が結合するＩＬ－１２のｐ４０サブユニットのエピトープへ結合する抗体である。好ましくは、第一の抗体は、Ｃ８．６．２、Ｃ３４０又は１Ｄ４．７の何れかである。次いで、活性化されたバイオセンサーを横切って、第一の抗体の約５０μＬ（例えば、酢酸ナトリウムｐＨ４．５中に希釈された２５μｇ／ｍＬで）を注入し、タンパク質上の遊離アミンを活性化されたカルボキシル基へ直接結合させる。典型的には、５０００共鳴単位が固定化される。反応しなかったマトリックスＥＤＣ－エステルは、１Ｍエタノールアミンの注入によって不活化する。実施例１１に上述されているように、ＣＭバイオセンサーチップ（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ，カタログ番号ＢＲ－１０００－１４，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を用いて、ＳＰＲ測定を行う。バイオセンサー表面上の分析すべき全ての抗体及び抗原を、ＨＢＳ－ＥＰ走行緩衝液（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ，カタログ番号ＢＲ－１００１－８８，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）中に希釈する。

【０５２４】

次に、典型的には約２５μＬ／分の流速で、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニット（例えば、１００ｎＭ）を、ＣＭ５バイオセンサー表面上の共有結合によって固定化された抗体を横切って注入する。インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットは、例えば、単離された単一のサブユニット（又はその断片）として注入することが可能であり、又はヘテロ二量体（ヘテロ二量体は、ｐ４０サブユニット及び第二のサブユニット、例えば、ヘテロ二量体ｐ４０／ｐ３５（ＩＬ－１２）又はＩＬ－１２のｐ４０サブユニットとｐｌ９サブユニットを含む別のヘテロ二量体（ｐ４０／ｐｌ９；ＩＬ－２３））を含む。）の形態で注入することが可能である。抗原の注入の前に及び直後に、ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液のみを各フローセルを通して流す。この後、典型的には、約５分の一定の時間にわたって、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の捕捉されたｐ４０サブユニットを横切って、可溶性試験抗体の過剰（例えば、２５μｇ／ｍＬの濃度で）を注入する。試験抗体の注入の前に及び直後に、ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液のみを、各フローセルを通して再度流す。最終の結合値を表すために、ベースラインと抗体注入完了から約３０秒後に対応する点との間のシグナルの正味の差を取り、共鳴単位で測定する。インターロイキンの立体構造、例えば、インターロイキンのｐ４０サブユニットを変化させることができる抗体として、ＣＭ５バイオセンサー表面上に固定化された第一の抗体からインターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）のｐ４０サブユニットを素早く移動させる抗体が同定される。

【０５２５】

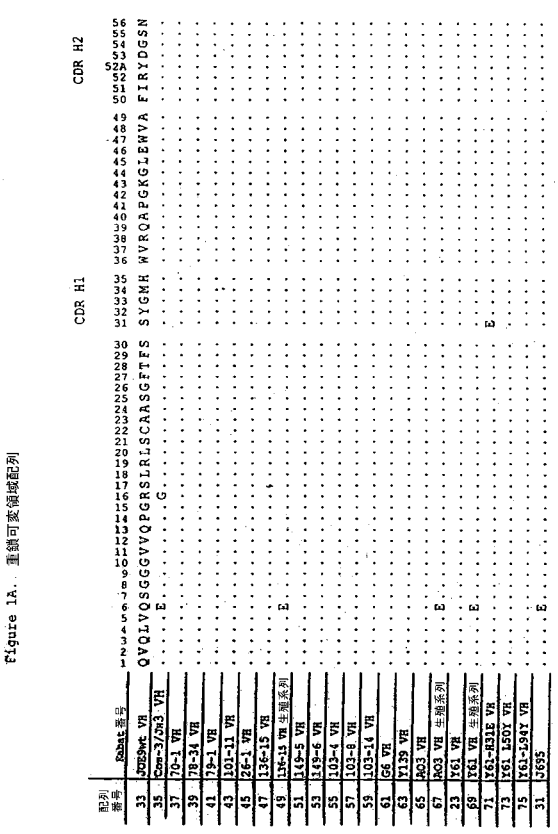
インターロイキン（例えば、ＩＬ－１２又はＩＬ－２３）の構造におけるこの立体構造の変化は、タンパク質の三次元構造をモニターするための本分野において周知の技術の何れによっても確認され得る。例えば、Ｘ線結晶学又は円二色性を使用し得る。

【０５２６】

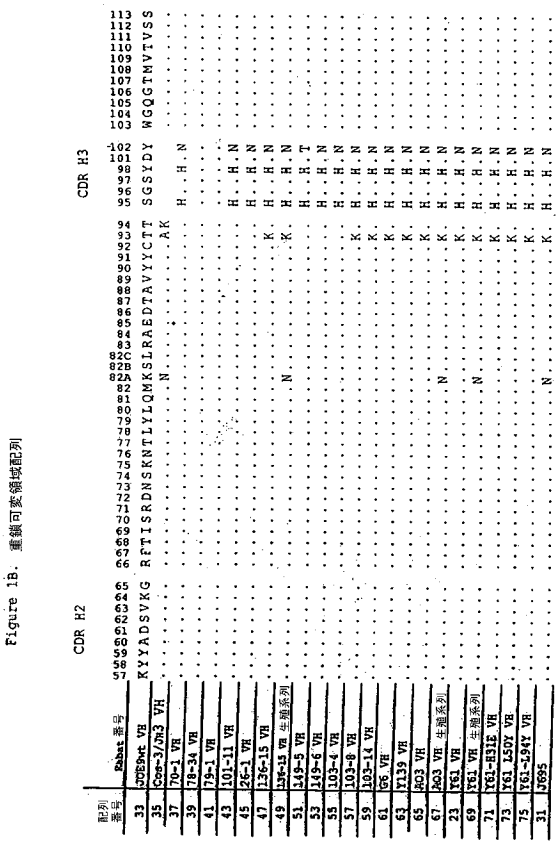
均等物

当業者は、定型的な実験操作のみを用いて、本明細書に記載されている本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識し、又は確認することができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるものとする。

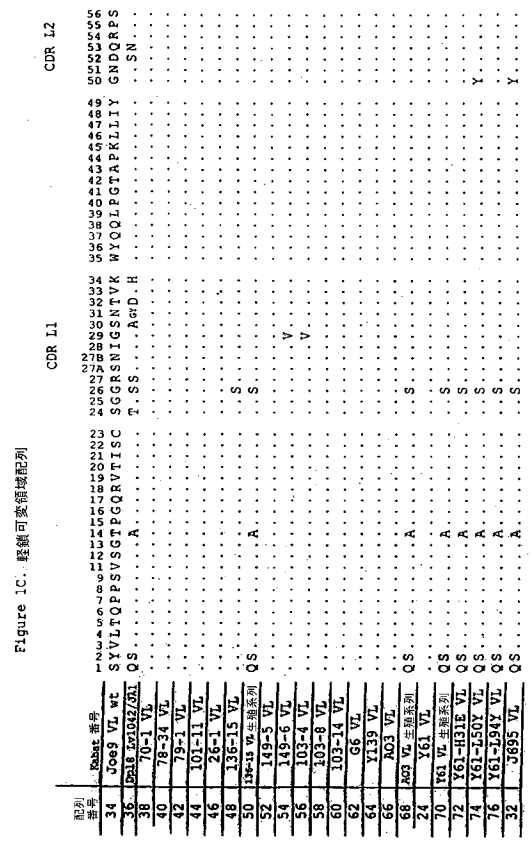
【図１Ａ】



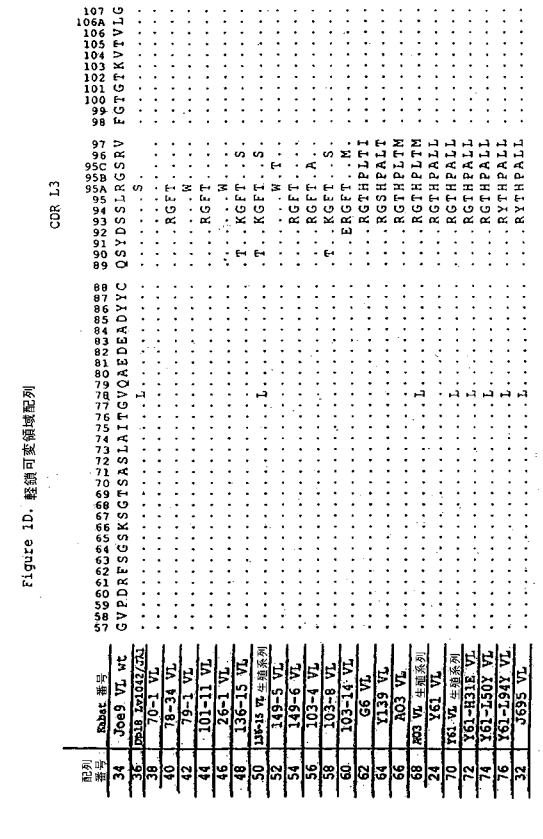
【図１Ｂ】



【図１Ｃ】



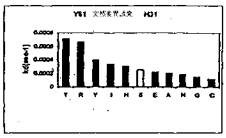
【図１Ｄ】

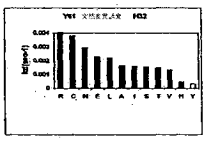


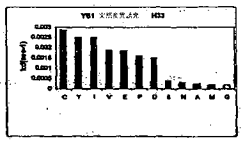
【図２Ａ】

Figure 2A. Y61重鎖ＣＤＲＨ１突然変異誘発

配列番号		CDR H1										k_{off} ($\times 10^3$)
		27	28	29	30	31	32	33	34	35		
21	Y61	F	T	F	S	S	Y	G	M	H		
288		.	.	.	E	.	.	.	.	.		22.8
289		.	.	.	S	.	.	.	.	.		16.8
290		.	.	.	Y	.	.	.	.	.		31.9
291		.	.	.	H	.	.	.	.	.		29.6
292		.	.	.	K	.	.	.	.	.		22.5
293		.	.	.	R	.	.	.	.	.		24.5
294		.	.	.	N	.	.	.	.	.		30.1
295		.	.	.	T	.	.	.	.	.		32.0
296		.	.	.	G	.	.	.	.	.		23.3
297		.	.	.	V	.	.	.	.	.		39.9
298		.	.	.	I	.	.	.	.	.		20.7
299		.	.	.	M	.	.	.	.	.		21.6
300		.	.	.	.	E	.	.	.	.		21.9
301		.	.	.	.	C	.	.	.	.		12.0
302		.	.	.	.	S	.	.	.	.		24.9
303		.	.	.	.	Y	.	.	.	.		39.8
304		.	.	.	.	H	.	.	.	.		30.9
305		.	.	.	.	R	.	.	.	.		66.4
306		.	.	.	.	N	.	.	.	.		19.1
307		.	.	.	.	Q	.	.	.	.		15.2
308		.	.	.	.	T	.	.	.	.		71.6
309		.	.	.	.	A	.	.	.	.		20.5
310		.	.	.	.	I	.	.	.	.		33.4
311		.	.	.	.	.	E	.	.	.		229.0
312		.	.	.	.	.	C	.	.	.		383.0
313		.	.	.	.	.	S	.	.	.		157.5
314		.	.	.	.	.	Y	.	.	.		33.7
315		.	.	.	.	.	H	.	.	.		46.1
316		.	.	.	.	.	R	.	.	.		448.5
317		.	.	.	.	.	N	.	.	.		297.0
318		.	.	.	.	.	T	.	.	.		148.0
319		.	.	.	.	.	A	.	.	.		165.5
320		.	.	.	.	.	V	.	.	.		133.5
321		.	.	.	.	.	L	.	.	.		226.0
322		.	.	.	.	.	I	.	.	.		160.5
323		.	.	.	.	.	.	D	.	.		152.0
324		.	.	.	.	.	.	E	.	.		189.0
325		.	.	.	.	.	.	C	.	.		286.5
326		.	.	.	.	.	.	S	.	.		39.9
327		.	.	.	.	.	.	Y	.	.		250.5
328		.	.	.	.	.	.	N	.	.		30.8
329		.	.	.	.	.	.	G	.	.		17.0
330		.	.	.	.	.	.	A	.	.		27.3
331		.	.	.	.	.	.	V	.	.		191.0
332		.	.	.	.	.	.	M	.	.		21.5
333		.	.	.	.	.	.	I	.	.		250.0
334		.	.	.	.	.	.	P	.	.		159.5



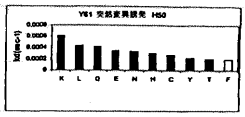


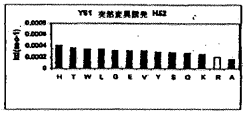


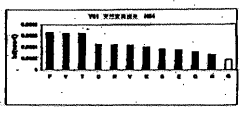
【図２Ｂ】

Figure 2B. Y61重鎖ＣＤＲＨ２突然変異誘発

配列番号		CDR H2															k_{off} ($\times 10^3$)
		50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
19	Y61	F	I	R	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
335		.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	34.7
336		.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28.5
337		.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	23.0
338		.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	30.9
339		.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	61.2
340		.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	34.4
341		.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	42.0
342		.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	20.5
343		.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	44.0
344		.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	20.4
345		.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	31.8
346		.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	29.2
347		.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	29.8
348		.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	40.7
349		.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	26.2
350		.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	20.6
351		.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	28.5
352		.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	37.4
353		.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	32.1
354		.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	17.1
355		.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	31.7
356		.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	34.7
357		.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	35.1
358		.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	15.1
359		.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	39.9
360		.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	36.0
361		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	61.1
362		.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	158.0
363		.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	166.5
364		.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	72.7
365		.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	79.2
366		.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	50.0
367		.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	40.4
368		.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	44.0
369		.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	109.5
370		.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	94.4
371		.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	168.5
372		.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	45.5
373		.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	35.1
374		.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	37.3
375		.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	64.6
376		.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	40.7
377		.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2.5
378		.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	44.7
379		.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	31.6
380		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	64.4
381		.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	17.8
382		.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	43.5



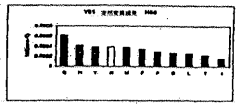


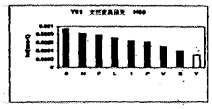


【図２Ｃ】

Figure 2C. Y61重鎖ＣＤＲＨ２突然変異誘発

配列番号		CDR H2															k_{off} ($\times 10^3$)
		50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
19	Y61	F	I	R	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
383		.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	66.3
384		.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	62.4
385		.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	39.0
386		.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	42.0
387		.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	38.5
388		.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	23.5
389		.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	27.2
390		.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	38.3
391		.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	26.4
392		.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	16.9
393		.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	29.9
394		.	.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	34.5
395		.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	41.5
396		.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	94.1
397		.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	31.0
398		.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	83.1
399		.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	52.4
400		.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	73.0
401		.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	65.7
402		.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	62.8
403		.	.	.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	79.4

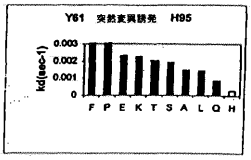


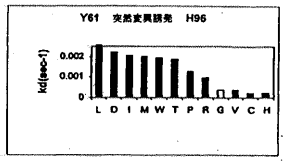


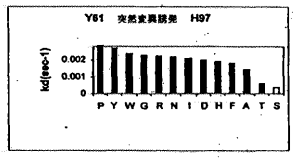
【図２Ｄ】

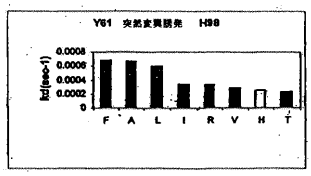
Figure 2D. Y61重鎖ＣＤＲＨ３突然変異誘発

配列番号		CDR H3						K_{off} ($\times 10^3$)
		95	96	97	98	101	102	
17	Y61	H	G	S	H	D	N	
404		E	.	.	.	.	.	231.5
405		S	.	.	.	.	.	193.0
406		H	.	.	.	.	.	28.7
407		K	.	.	.	.	.	227.5
408		Q	.	.	.	.	.	85.9
409		T	.	.	.	.	.	202.0
410		A	.	.	.	.	.	150.0
411		L	.	.	.	.	.	147.5
412		P	.	.	.	.	.	471.0
413		F	.	.	.	.	.	514.0
414		.	D	.	.	.	.	223.5
415		.	C	.	.	.	.	24.2
416		.	H	.	.	.	.	23.7
417		.	R	.	.	.	.	96.2
418		.	T	.	.	.	.	186.0
419		.	G	.	.	.	.	39.7
420		.	V	.	.	.	.	38.2
421		.	M	.	.	.	.	204.5
422		.	L	.	.	.	.	261.0
423		.	I	.	.	.	.	207.5
424		.	P	.	.	.	.	129.0
425		.	W	.	.	.	.	197.0
426		.	.	D	.	.	.	202.0
427		.	.	S	.	.	.	37.5
428		.	.	Y	.	.	.	273.0
429		.	.	H	.	.	.	190.5
430		.	.	R	.	.	.	224.0
431		.	.	N	.	.	.	221.5
432		.	.	T	.	.	.	58.8
433		.	.	G	.	.	.	229.0
434		.	.	A	.	.	.	143.0
435		.	.	I	.	.	.	208.0
436		.	.	P	.	.	.	300.0
437		.	.	W	.	.	.	239.0
438		.	.	F	.	.	.	180.5
439		.	.	.	R	.	.	25.5
440		.	.	.	R	.	.	34.0
441		.	.	.	T	.	.	22.7
442		.	.	.	A	.	.	67.3
443		.	.	.	V	.	.	29.3
444		.	.	.	L	.	.	59.8
445		.	.	.	I	.	.	34.3
446		.	.	.	F	.	.	68.8
447		.	.	.	.	D	.	14.4
448		.	.	.	.	S	.	44.9
449		.	.	.	.	Y	.	469.0
450		.	.	.	.	H	.	327.0
451		.	.	.	.	R	.	110.0





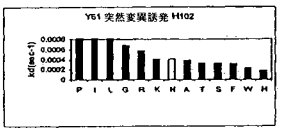




【図２Ｅ】

Figure 2E. Y61重鎖ＣＤＲＨ３突然変異誘発

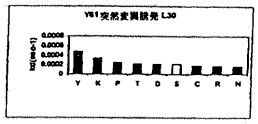
配列番号		CDR H3 95	96	97	98	101	102	K_{off} ($\times 10^3$)
17	Y61	H	G	S	H	D	N	
452		.	.	.	.	N	.	223.0
453		.	.	.	.	G	.	375.0
454		.	.	.	.	A	.	106.5
455		.	.	.	.	V	.	163.0
456		.	.	.	.	I	.	162.5
457		.	.	.	.	.	S	32.5
458		.	.	.	.	.	H	18.0
459		.	.	.	.	.	K	40.5
460		.	.	.	.	.	R	57.5
461		.	.	.	.	.	N	40.3
462		.	.	.	.	.	T	33.3
463		.	.	.	.	.	G	69.2
464		.	.	.	.	.	A	38.2
465		.	.	.	.	.	L	95.6
466		.	.	.	.	.	I	99.6
467		.	.	.	.	.	P	181.5
468		.	.	.	.	.	W	23.5
469		.	.	.	.	.	F	31.8

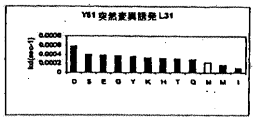


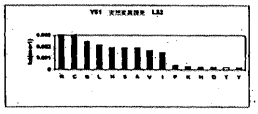
【図２Ｆ】

Figure 2F. Y61軽鎖ＣＤＲＬ１突然変異誘発

配列番号		CDR L1 24	25	26	27	27A	27B	28	29	30	31	32	33	34	$-K_{off}$ ($\times 10^3$)
22	Y61	S	G	G	R	S	N	I	G	S	N	T	V	K	
470		.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	22.0
471		.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	18.6
472		.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	21.1
473		.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	48.3
474		.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	34.6
475		.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	18.2
476		.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	16.6
477		.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	22.6
478		.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	25.0
479		.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	58.0
480		.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	38.4
481		.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	39.2
482		.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	35.7
483		.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	31.5
484		.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	33.1
485		.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	22.9
486		.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	23.2
487		.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	30.9
488		.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	36.6
489		.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	17.4
490		.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	9.7
491		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	25.2
492		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	381.5
493		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	191.0
494		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	21.3
495		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	26.0
496		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	31.8
497		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	690.0
498		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	196.5
499		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	247.0
500		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	24.1
501		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	190.5
502		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	164.5
503		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	215.5
504		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	154.0
505		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	42.4



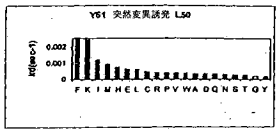




【図２Ｇ】

Figure 2G. Y61軽鎖ＣＤＲＬ２突然変異誘発

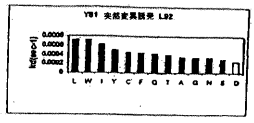
配列番号		CDR L2 50	51	52	53	54	55	56	K_{off} ($\times 10^3$)
20	Y61	G	N	D	Q	R	P	S	
506		D	.	.	.	.	.	.	34.8
507		E	.	.	.	.	.	.	61.7
508		C	.	.	.	.	.	.	46.7
509		S	.	.	.	.	.	.	28.6
510		Y	.	.	.	.	.	.	17.4
511		H	.	.	.	.	.	.	76.1
512		K	.	.	.	.	.	.	242.5
513		R	.	.	.	.	.	.	44.4
514		N	.	.	.	.	.	.	30.5
515		Q	.	.	.	.	.	.	34.8
516		T	.	.	.	.	.	.	27.2
517		G	.	.	.	.	.	.	21.5
518		A	.	.	.	.	.	.	37.2
519		V	.	.	.	.	.	.	38.5
520		M	.	.	.	.	.	.	95.3
521		L	.	.	.	.	.	.	61.6
522		I	.	.	.	.	.	.	120.5
523		P	.	.	.	.	.	.	41.0
524		W	.	.	.	.	.	.	38.2
525		F	.	.	.	.	.	.	3,476.7
526		.	.	.	S	.	.	.	86.6
527		.	.	.	Y	.	.	.	73.3
528		.	.	.	R	.	.	.	61.4
529		.	.	.	Q	.	.	.	29.7
530		.	.	.	T	.	.	.	83.4
531		.	.	.	A	.	.	.	55.4
532		.	.	.	I	.	.	.	85.5
533		.	.	.	P	.	.	.	97.4

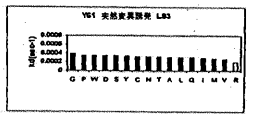


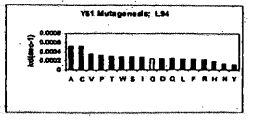
【図２Ｈ】

Figure 2H. Y61軽鎖ＣＤＲＬ３突然変異誘発

配列番号		CDR L3 89	90	91	92	93	94	95	95A	95B	95C	96	97	k_{off} ($\times 10^3$)
18	Y61	Q	S	Y	D	R	G	T	H	P	A	L	L	
534		.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	25.9
535		.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	45.3
536		.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	30.7
537		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	51.1
538		.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	34.7
539		.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	42.7
540		.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	40.8
541		.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	34.9
542		.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	35.7
543		.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	72.8
544		.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	61.8
545		.	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	72.0
546		.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	44.9
547		.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	34.3
548		.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	32.0
549		.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	34.1
550		.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	33.5
551		.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	19.9
552		.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	31.6
553		.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	30.0
554		.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	31.6
555		.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	39.2
556		.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	31.0
557		.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	26.9
558		.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	27.5
559		.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	30.0
560		.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	29.5
561		.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	34.9
562		.	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	.	34.9
563		.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	25.3
564		.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	52.0
565		.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	20.7
566		.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	13.1
567		.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	18.7
568		.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	23.1
569		.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	13.7
570		.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	25.0
571		.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	30.5
572		.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	25.6
573		.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	52.6
574		.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	35.1
575		.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	24.4
576		.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	27.6
577		.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	33.2
578		.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	29.3
579		.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	23.6







【図３】

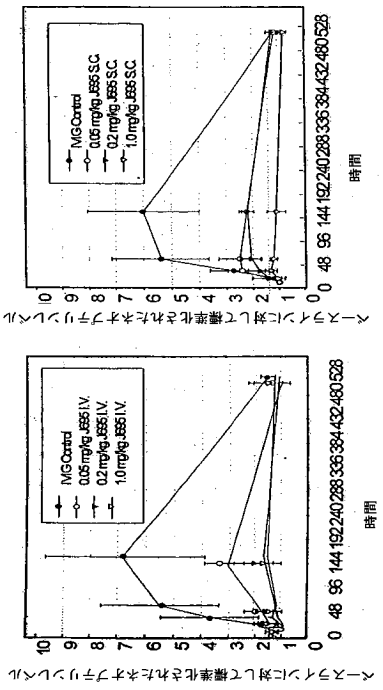


Figure 3: カニクイザルにおけるＪ６９５のインビボでの効力

【図４】

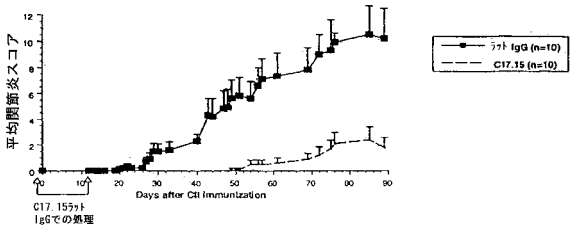


FIGURE 4

【配列表】

2010513529000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/26212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: **A61K 8/18**(2006.01);**A61Q 13/00**(2006.01);**C12P 21/06**(2006.01)

USPC: 435/7.1;514/12;530/350,300
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. : 435/7.1; 514/12; 530/350,300

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
EAST: IL-12, antibody, immunoglobulin, P40 subunit, rheumatoid arthritis

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Medline, Biosis, Embase, Caplus: IL-12, antibody, immunoglobulin, P40 subunit, rheumatoid arthritis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,650,492 (GATELY et al.) 22 July 1997 (22.07.1997), column 8, lines 3-4.	1
X	US 6,914,128 B1 (SALFELD et al) 05 July 2005 (05.07.2005), column 74, lines 5-65, column 81, lines 35-61, column 386, lines 47-68, column 387, lines 1-8.	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 June 2008 (18.06.2008)	11 JUL 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer Ian Dang Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61P 1/00	*(2006.01)*		A61P	43/00	111	
A61P 1/04	*(2006.01)*		A61P	1/00		
A61P 25/00	*(2006.01)*		A61P	1/04		
A61P 3/10	*(2006.01)*		A61P	25/00		
A61P 5/14	*(2006.01)*		A61P	3/10		
A61P 11/06	*(2006.01)*		A61P	5/14		
A61P 37/08	*(2006.01)*		A61P	11/06		
A61P 17/06	*(2006.01)*		A61P	37/08		
A61P 17/00	*(2006.01)*		A61P	17/06		
A61P 9/10	*(2006.01)*		A61P	17/00		
A61P 7/02	*(2006.01)*		A61P	9/10		
A61P 13/12	*(2006.01)*		A61P	7/02		
A61P 1/16	*(2006.01)*		A61P	13/12		
A61P 27/02	*(2006.01)*		A61P	1/16		
A61P 11/00	*(2006.01)*		A61P	27/02		
A61P 31/04	*(2006.01)*		A61P	11/00		
A61P 21/04	*(2006.01)*		A61P	31/04		
A61P 25/14	*(2006.01)*		A61P	21/04		
A61P 25/16	*(2006.01)*		A61P	25/14		
A61P 25/28	*(2006.01)*		A61P	25/16		
A61P 35/00	*(2006.01)*		A61P	25/28		
A61P 9/04	*(2006.01)*		A61P	35/00		
G01N 33/53	*(2006.01)*		A61P	9/04		
C12P 21/08	*(2006.01)*		G01N	33/53	P	
C12N 15/02	*(2006.01)*		C12P	21/08		
			C12N	15/00	C	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(72)発明者 ザルフエルト，ヨツヘン・ゲー
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１５３６、ノース・グラフトン、オールド・ウエストボロ・ロード・１７７
(72)発明者 ログスカ，マイケル
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１７２１、アシユランド、ヒルサイド・ロード・１６
(72)発明者 パスキンド，マイケル
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１５６４、スターリング、リデンプシヨン・ロツク・トレイル・２５３
(72)発明者 バナージー，サブハシス

アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０６５１４、ハムデン、ダンバー・レイン・７７
(72)発明者 トレイシー，ダニエル・エドワード
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１４５１、ハーバード、シエイカー・ロード・１４９
(72)発明者 ホワイト，マイケル
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１７０１、フラミンガム、アンジエリカ・ドライブ・３０
(72)発明者 カイマークカラン，ゼーラ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１５８１、ウエストボロ、ピカデリー・ウエイ・４
(72)発明者 ラブコフスキー，ボリス
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１７５２、マールボロ、ブロードメドウ・ロード・１０７・エイ－５
(72)発明者 サコラフアス，ポール
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０２４６１、ニユートン・ハイランズ、オールド・ウインチエスター・ストリート・２５
(72)発明者 フエルトマン，ヘールトライダ・エム
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１７７６、サドベリー、ウツドメア・ドライブ・６０
(72)発明者 ベンチユリーニ，エイミー
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０２４２０、レキシントン、ウーバーン・ストリート・２０７
(72)発明者 ウイダム，アンジエラ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１７２０、アクトン、チエロキー・ロード・１９
(72)発明者 フリードリツヒ，スチユアート
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・２７５１１、ケーリー、クロケツト・レイン・１１
(72)発明者 ウオーン，ニコラス・ダブリユ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１８１０、アンドーバー、フアーウツド・ドライブ・２７
(72)発明者 マイルズ，アンジエラ
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１８１０、アンドーバー、クレセンツ・ドライブ・１１、アパートメント・７
(72)発明者 エルビン，ジヨン・ガウエイン
イギリス国、ケンブリツジ・シー・ビー・１・２・エイ・ワイ、パーウオン・ストリート・３６
(72)発明者 ダンカン，アレクサンダー・ロバート
イギリス国、ケンブリツジ・シー・ビー・２・５・エイチ・エイチ、リトル・シエルフオード、ガーデン・フイールズ・８
(72)発明者 ダービシヤー，エレーン・ジエイ
イギリス国、ハートフオードシヤー・エス・ジイ・８・９・エヌ・キユー、ロイストン、スタツドランズ・ライズ、ザ・ブラムブルズ・１５
(72)発明者 カルメン，サラ
イギリス国、ケンブリツジ・シー・ビー・１・２・キユー・エフ、スタートン・ストリート・１３６
(72)発明者 ホルテツト，トール・ラス
イギリス国、ハートフオードシヤー、ロイヤルストン、モルテイマー・ロード・１３
(72)発明者 デユフー，サラ・レイラ
イギリス国、ハートフオードシヤー・エス・ジー・５・１・テイー・エル、ヒツチエン、イツクルフオード・ロード・７６
(72)発明者 スミス，ステイーブン
イギリス国、ケンブリツジシヤー・シー・ビー・７・５・エツクス・テイー、イーリー、ウイツケン、チヤーチ・ロード・３３

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA44 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
4C085 AA13 AA14 BB17 CC21 CC23 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA22 EA27 FA74

专利名称(译)	人抗体结合人IL-12和生产方法		
公开(公告)号	JP2010513529A	公开(公告)日	2010-04-30
申请号	JP2009542947	申请日	2007-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	基于EM的雅培门硬UND公司汽车游戏		
申请(专利权)人(译)	雅培GMBH UND有限公司卡格		
[标]发明人	ザルフエルトヨツヘンゲー ログスカマイケル パスキンドマイケル バナージーサブハシス トレイシーダニエルエドワード ホワイトマイケル カイマークカランゼーラ ラブコフスキーボリス サコラフアスポール フエルトマンヘールトライダエム ベンチユリーニエイミー ウイダムアンジエラ フリードリツヒスチユアート ウオーンニコラスダブリユ マイルズアンジエラ エルビンジヨンガウエイン ダンカンアレクサンダーロバート ダービシヤーエレーンジエイ カルメンサラ ホルテツトトールラス デユフーサラレイラ スミスステイーブン		
发明人	ザルフエルト,ヨツヘン·ゲー ログスカ,マイケル パスキンド,マイケル バナージー,サブハシス トレイシー,ダニエル·エドワード ホワイト,マイケル カイマークカラン,ゼーラ ラブコフスキー,ボリス サコラフアス,ポール フエルトマン,ヘールトライダ·エム ベンチユリーニ,エイミー ウイダム,アンジエラ フリードリツヒ,スチユアート ウオーン,ニコラス·ダブリユ マイルズ,アンジエラ エルビン,ジヨン·ガウエイン ダンカン,アレクサンダー·ロバート ダービシヤー,エレーン·ジエイ カルメン,サラ ホルテツト,トール·ラス デユフー,サラ·レイラ スミス,ステイーブン		

IPC分类号	C07K16/24 A61K39/395 A61P29/00 A61P19/02 A61P43/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P25/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/06 A61P17/00 A61P9/10 A61P7/02 A61P13/12 A61P1/16 A61P27/02 A61P11/00 A61P31/04 A61P21/04 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P35/00 A61P9/04 G01N33/53 C12P21/08 C12N15/02
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/14 A61P33/00 A61P35/00 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/30 C07K2317/33 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92
FI分类号	C07K16/24.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P29/00.101 A61P19/02 A61P43/00.111 A61P1/00 A61P1/04 A61P25/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/06 A61P17/00 A61P9/10 A61P7/02 A61P13/12 A61P1/16 A61P27/02 A61P11/00 A61P31/04 A61P21/04 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P35/00 A61P9/04 G01N33/53.P C12P21/08 C12N15/00.C
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA27 4H045/FA74
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎
优先权	11/645287 2006-12-22 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

公开了特异性结合人白细胞介素-12（hIL-12）的人抗体，优选重组人抗体。优选的抗体对hIL-12具有高亲和力并在体外和体内中和hIL-12活性。本发明的抗体可以是全长抗体或其抗原结合部分。本发明的抗体或抗体部分可用于检测hIL-12和抑制hIL-12活性，例如，在患有hIL-12活性有害的病症的人类受试者中。用于表达本发明的重组人抗体的核酸，载体和宿主细胞，以及合成重组人抗体的方法也包括在本发明中。

配列番号	抗体鎖	領域	配 列
1	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR H3	(H/S)-G-S-(H/Y)-D-(N/T/Y)
2	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR L3	Q-(S/T)-Y-(D/E)-(S/R/K)-(S/G/Y)-(L/F/T/S)-(R/S/T/W/H)-(G/P)-(S/T/A/L)-(R/S/M/T/L)-(V/I/T/M/L)
3	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR H2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G
4	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR L2	(G/Y)-N-(D/S)-(Q/N)-R-P-S
5	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR H1	F-T-F-S-(S/E)-Y-G-M-H
6	コンセンサス Joe 9 to J695	CDR L1	(S/T)-G-(G/S)-(R/S)-S-N-I-(G/V)-(S/A)-(N/G/Y)-(T/D)-V-(K/H)
7	コンセンサス Joe 9 to J695	VH	（完全なＶＨ配列：配列表参照）
8	コンセンサス Joe 9 to J695	VL	（完全なＶＬ配列：配列表参照）
9	コンセンサス Y61 to J695	CDR H3	H-(G/V/C/H)-(S/T)-(H/T/V/R/I)-(D/S)-(N/K/A/T/S/F/W/H)
10	コンセンサス Y61 to J695	CDR L3	Q-S-Y-(D/S)-(Xaa)-(G/D/Q/L/F/R/H/N/Y)-T-H-P-A-L-L
11	コンセンサス Y61 to J695	CDR H2	(F/T/Y)-I-(R/A)-Y-(D/S/E/A)-(G/R)-S-(Xaa)-K-(Y/E)-Y-A-D-S-V-K-G
12	コンセンサス Y61 to J695	CDR L2	(G/Y/S/T/N/Q)-N-D-Q-R-P-S
13	コンセンサス Y61 to J695	CDR H1	F-T-F-(Xaa)-(Xaa)-(Y/H)-(G/M/A/N/S)-M-H
14	コンセンサス Y61 to J695	CDR L1	S-G-G-R-S-N-I-G-(S/C/R/N/D/T)-(N/M/I)-(T/Y/D/H/K/P)-V-K
15	コンセンサス Y61 to J695	VH	（完全なＶＨ配列：配列表参照）
16	コンセンサス Y61 to J695	VL	（完全なＶＬ配列：配列表参照）
17	Y61	CDR H3	H-G-S-H-D-N
18	Y61	CDR L3	Q-S-Y-D-R-G-T-H-P-A-L-L
19	Y61	CDR H2	F-I-R-Y-D-G-S-N-K-Y-Y-A-D-S-V-K-G
20	Y61	CDR L2	G-N-D-Q-R-P-S
21	Y61	CDR H1	F-T-F-S-S-Y-G-M-H
22	Y61	CDR L1	S-G-G-R-S-N-I-G-S-N-T-V-K
23	Y61	VH	（完全なＶＨ配列：配列表参照）