

(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2016-503293

(P2016-503293A)

(43) 公表日 平成28年2月4日(2016.2.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-540154 (P2015-540154)
 (86) (22) 出願日 平成25年11月5日 (2013.11.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月30日 (2015.4.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/073009
 (87) 国際公開番号 W02014/068132
 (87) 国際公開日 平成26年5月8日 (2014.5.8)
 (31) 優先権主張番号 12007503.1
 (32) 優先日 平成24年11月5日 (2012.11.5)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/722, 532
 (32) 優先日 平成24年11月5日 (2012.11.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

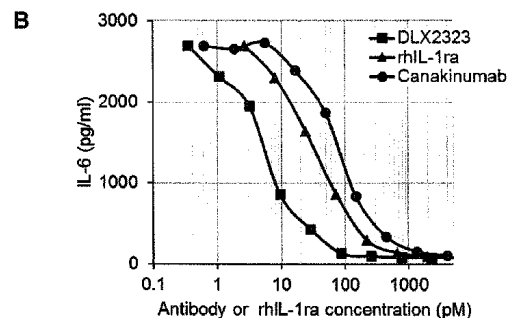
(71) 出願人 510213255
 デレネックス セラピューティクス アー
 ゲー
 スイス国 8952 シュリーレン, ヴ
 ァーギシュトラーセ 27
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74) 代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-1βへの結合メンバー

(57) 【要約】

本発明は、抗IL-1結合メンバーに、および特に、高安定性および可溶性である一価の高効力IL-1結合抗体断片に関する。そのような結合メンバーは、炎症および他の疾患の処置ならびに診断にも使用することができる。関連核酸、ベクター、細胞および組成物も提供する。ヒト線維芽細胞からのIL-6のIL-1刺激性放出を阻害することによって決定して、ヒトIL-1の生物学的作用を阻害することに関して5pMより低い、好ましくは約1pMより低い効力(IC₅₀)を有する、IL-1に対する一価抗体断片。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト線維芽細胞からの IL - 6 の IL - 1 刺激性放出を阻害することによって決定して、ヒト IL - 1 の生物学的作用を阻害することに関して 5 p M より低い、好ましくは約 1 p M より低い効力 (I C ₅₀) を有する、IL - 1 に対する一価抗体断片。

【請求項 2】

IL - 1 に対する抗体であって、

- a . (i) それぞれ配列番号 1、2 および 3、もしくはそれらのバリエーション、または
(i i) それぞれ配列番号 155、156 および 157、もしくはそれらのバリエーション

ト
で示される可変重鎖 (V H) C D R 配列 C D R - H 1、C D R - H 2 または C D R - H 3 のうちの少なくとも 1 つ；および / または

- b . (i) それぞれ配列番号 4、5 および 6、もしくはそれらのバリエーション；または
(i i) それぞれ配列番号 161、162 および 163、もしくはそれらの変異型

で示される可変軽鎖 (V L) C D R 配列 C D R - L 1、C D R - L 2 または C D R - L 3 のうちの少なくとも 1 つ

を含む、抗体。

【請求項 3】

ヒト線維芽細胞からの IL - 6 の IL - 1 刺激性放出を阻害することによって決定して、ヒト IL - 1 の生物学的作用を阻害することに関して 50 p M より低い効力 (I C ₅₀) を有する、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記 I C ₅₀ が、約 30、20、10、5、4、3、2 p M より低い、好ましくは約 1 p M より低い、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

請求項 1 の一価抗体断片である、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

F a b、F a b'、s c F v、F v 断片、ナノボディ、V H H または最小認識単位である、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

完全長免疫グロブリンまたは二価抗体断片、好ましくは F (a b')₂ である、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

a . 全体として見ると前記バリエーションの V H C D R 配列が、

- (i) 配列番号 1、2 および 3 で示されるか；もしくは
(i i) 配列番号 155、156 および 157 で示される

V H C D R 配列に少なくとも 85 % 類似している；および / または

b . 全体として見ると前記バリエーションの V L C D R 配列が、

- (i) 配列番号 4、5 および 6 で示されるか；もしくは
(i i) 配列番号 161、162 および 163 で示される

V L C D R 配列に少なくとも 85 % 類似している、

請求項 2 から 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

a . 全体として見ると前記バリエーションの V H C D R 配列が、

- (i) 配列番号 1、2 および 3 で示され；もしくは
(i i) 配列番号 155、156 および 157 で示される

V H C D R 配列と少なくとも 80 % 同一である；および / または

b . 全体として見ると前記バリエーションの V L C D R 配列が、

- (i) 配列番号 4、5 および 6 で示され；もしくは
(i i) 配列番号 161、162 および 163 で示される

10

20

30

40

50

V L C D R 配列と少なくとも75%同一である、
請求項2から8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項10】

前記バリエーションが、

(a) 以下のアミノ酸配列を有する、可変重鎖(VH)CDR配列CDR-H1、CDR-H2またはCDR-H3のうちの少なくとも1つ：

CDR-H1：F S L S X₁ X₂ A M A (配列番号11) (ここで、

X₁は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WもしくはYであり；および/または

X₂は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYである)；

CDR-H2：I I X₁ X₂ S A S T X₃ Y A S W A K G (配列番号12) (ここで、

X₁は、A、C、G、MもしくはYであり；

X₂は、D、NもしくはPであり；および/または

X₃は、A、D、E、G、F、H、I、K、L、M、N、P、S、T、WもしくはYである)；

CDR-H3：E X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ (配列番号13)

(ここで、

X₁は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WもしくはYであり；

X₂は、A、C、D、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYであり；

X₃は、A、C、F、H、I、L、M、N、Q、S、T、VもしくはYであり；

X₄は、FもしくはIであり；

X₅は、A、C、E、G、S、TもしくはVであり；

X₆は、A、G、MもしくはNであり；

X₇は、A、D、E、H、N、SもしくはTであり；

X₈は、A、C、F、G、H、I、L、M、N、Q、S、T、V、WもしくはYであり；

X₉は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYであり；および/または

X₁₀は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYである)；および/または

(b) 以下のアミノ酸配列を有する、可変軽鎖(VL)CDR配列CDR-L1、CDR-L2またはCDR-L3のうちの少なくとも1つ：

CDR-L1：Q A S Q S I X₁ X₂ X₃ L S (配列番号14) (ここで、

X₁は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYであり；

X₂は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、S、T、V、WもしくはYであり；および/または

X₃は、E、F、G、M、N、Q、S、WもしくはYである)；

CDR-L2：X₁ A S X₂ L A S (配列番号15) (ここで、

X₁は、A、C、D、E、F、G、H、(I)、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、WもしくはYであり；および/または

X₂は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、WもしくはYである)；

CDR-L3：Q N X₁ G X₂ X₃ X₄ X₅ I A (配列番号16) (ここで、

X₁は、A、C、I、N、S、TもしくはVであり；

X₂は、A、G、PもしくはSであり；

X₃は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T

、 V、 Wもしくは Yであり；

X₄ は、 A、 C、 D、 E、 F、 G、 H、 I、 K、 L、 M、 N、 P、 Q、 R、 S、 T

、 V、 Wもしくは Yであり；および/または

X₅ は、 A、 C、 D、 E、 F、 G、 H、 I、 L、 M、 N、 P、 Q、 R、 S、 T、 V

、 Wもしくは Yである)

を含む、請求項 2 から 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 1】

少なくとも 1 つの、配列番号 1 8 の軽鎖可変フレームワーク領域 F R - L 1、配列番号 1 9 の軽鎖可変フレームワーク領域 F R - L 2、配列番号 2 0 の軽鎖可変フレームワーク領域 F R - L 3 および/または配列番号 2 1 の軽鎖可変フレームワーク領域 F R - L 4 を含む、請求項 2 から 1 0 のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項 1 2】

少なくとも 1 つの、配列番号 2 2、2 6 もしくは 3 0 の重鎖可変フレームワーク領域 F R - H 1；配列番号 2 3、2 7 もしくは 3 1 の重鎖可変フレームワーク領域 F R - H 2；配列番号 2 4、2 8 もしくは 3 2 の重鎖可変フレームワーク領域 F R - H 3；および/または配列番号 2 5、2 9 もしくは 3 3 の重鎖可変フレームワーク領域 F R - H 4 を含む、請求項 2 から 1 1 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 3】

a. 配列番号 7 および配列番号 1 4 6 から成る群より選択される配列との少なくとも 8 5 % の同一性を有する V H 配列；および/または

20

b. 配列番号 8、配列番号 1 3 6 および配列番号 1 4 5 から成る群より選択される配列との少なくとも 8 5 % の同一性を有する V L 配列

を含む、I L - 1 に対する抗体、特に請求項 2 から 1 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 4】

a. 配列番号 7 および配列番号 1 4 6 から成る群より選択される配列との少なくとも 8 5 % の類似性を有する V H 配列；および/または

b. 配列番号 8、配列番号 1 3 6 および配列番号 1 4 5 から成る群より選択される配列との少なくとも 8 5 % の類似性を有する V L 配列

を含む、請求項 2 から 1 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 5】

a. 配列番号 1 0 6、配列番号 1 0 7、配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0、配列番号 1 2 1、配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 6、配列番号 1 2 8、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 2、配列番号 1 3 4、配列番号 1 3 8、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 6、配列番号 1 4 8、配列番号 1 5 0、配列番号 1 5 2 から成る群より選択される V H 配列；および/または

30

b. 配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 5、配列番号 1 2 7、配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 3、配列番号 1 3 5、配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7、配列番号 1 3 9、配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 7、配列番号 1 4 9、配列番号 1 5 1 および配列番号 1 5 3 から成る群より選択される V L 配列

40

を含む、請求項 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 6】

配列番号 9 のリンカー配列を含む、請求項 2 から 1 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 7】

配列番号 1 0、配列番号 7 3 および配列番号 8 2 から成る群より選択される配列との少なくとも 8 5 % の配列類似性を有する、請求項 2 から 1 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 8】

50

配列番号 10、配列番号 73 および配列番号 82 から成る群より選択される配列との少なくとも 85% の配列同一性を有する、請求項 2 から 17 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 19】

配列番号 34 から 63、配列番号 64、配列番号 65、配列番号 66、配列番号 67、配列番号 68 から 70、配列番号 71 から 76、配列番号 77 から 88、配列番号 89 から 95 および配列番号 154 から成る群より選択される配列を含む、請求項 17 または 18 に記載の抗体。

【請求項 20】

以下の残基：

a．重鎖アミノ酸位置 12 (A H o 番号付けによる) におけるセリン (S) ；

b．重鎖アミノ酸位置 103 (A H o 番号付けによる) におけるセリン (S) またはトレオニン (T) ；および / または

c．重鎖アミノ酸位置 144 (A H o 番号付けによる) におけるセリン (S) またはトレオニン (T)

の少なくとも 1 つを含む、請求項 2 から 19 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 21】

ヒト化されている、請求項 2 から 20 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 22】

カニクイザル IL - 1、アカゲザル L - 1 および / またはラット IL - 1 と交差反応性である、請求項 2 から 21 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 23】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の抗体の可変軽鎖および重鎖の配列を含む結合メンバー。

【請求項 24】

ヒト IL - 1 への結合について請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 23 に記載の結合メンバーと競合する結合メンバー。

【請求項 25】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の抗体とヒト IL - 1 上の同じまたはオーバーラップするエピトープに結合する結合メンバー。

【請求項 26】

一価または多価である、特に、多価および多重特異性である、請求項 23 から 25 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

【請求項 27】

F a b、F a b'、s c F v、F v 断片、ナノボディまたは V H H である、請求項 26 に記載の一価結合メンバー。

【請求項 28】

完全長免疫グロブリン、ダイアボディまたはビス - S c F v である、請求項 26 に記載の多価結合メンバー。

【請求項 29】

請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバーを含む T ボディ。

【請求項 30】

化学的にまたは生物学的に改変される、請求項 2 から 22 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバー、または請求項 29 に記載の T ボディ。

【請求項 31】

血清中でのインビボ半減期滞留時間を延長するように改変される、請求項 30 に記載の抗体、請求項 30 に記載の結合メンバーまたは請求項 30 に記載の T ボディ。

【請求項 32】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバー、または請求項 29 に記載の T ボディをコードする、単離された核酸配

10

20

30

40

50

列。

【請求項 3 3】

配列番号 1 7 を含む、請求項 3 2 に記載の核酸配列。

【請求項 3 4】

請求項 3 2 または 3 3 に記載の核酸配列を含むベクター。

【請求項 3 5】

クローニングベクターまたは発現ベクターである、請求項 3 4 に記載のベクター。

【請求項 3 6】

請求項 3 2 もしくは 3 3 に記載の核酸配列または請求項 3 4 もしくは 3 5 に記載のベクターを含む宿主細胞。

10

【請求項 3 7】

原核細胞または真核細胞である、請求項 3 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 8】

請求項 1 から 2 2、3 0 もしくは 3 1 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 2 3 から 2 8 のいずれか一項に記載の結合メンバー、請求項 2 9 に記載の T ボディ、請求項 3 2 もしくは 3 3 に記載の核酸配列、請求項 3 4 もしくは 3 5 に記載のベクターまたは請求項 3 6 もしくは 3 7 に記載の宿主細胞を含み、適するキャリア、希釈剤または賦形剤をさらに含む組成物。

【請求項 3 9】

化粧品組成物、診断用組成物または医薬組成物である、請求項 3 8 に記載の組成物。

20

【請求項 4 0】

医薬的に許容され得るキャリア、希釈剤または賦形剤を含み；好ましくは、非経口、経口、直腸、尿生殖器、局所、硝子体内、静脈内、眼内、耳、鼻腔内、吸入、皮膚、舌下または口腔での投与用に製剤化される、請求項 3 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 1】

- (i) I L - 1 媒介疾患の処置に使用するための、
- (i i) 診断に使用するための、
- (i i i) 化粧品に使用するための、および / または
- (i v) 検出目的のための、

請求項 1 から 2 2、3 0 もしくは 3 1 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 2 3 から 2 8 のいずれか一項に記載の結合メンバー、請求項 2 9 に記載の T ボディ、請求項 3 2 もしくは 3 3 に記載の核酸配列、請求項 3 4 もしくは 3 5 に記載のベクターまたは請求項 3 6 もしくは 3 7 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 4 2】

前記 I L - 1 媒介疾患が、増殖性糖尿病性網膜症、通風性関節炎、シュニッツラー症候群、全身性若年性特発性関節炎、関節リウマチ、急性通風性関節炎、慢性通風性関節炎、蕁麻疹、脈管炎、1 型糖尿病、2 型糖尿病、強直性脊椎炎、再発性多巣性骨髄炎、再発性多発性軟骨炎、クリオピリン関連周期性症候群 (C A P S)、ベーチェット病、家族性地中海熱、慢性閉塞性肺疾患、リウマチ性多発性筋痛症、N A L P 3 - 変異、壊疽性膿皮症、慢性特発性蕁麻疹、変形性関節症、滲出型加齢性黄斑変性、ドライアイ症候群、膿疱性乾癬、滑膜炎 - ざ瘡 - 膿疱症 - 骨化過剰症 - 骨炎症候群、マクロファージ活性化症候群、周期性発熱・腺炎・咽頭炎・アフタ性潰瘍症候群、成人発症スティル病、メパロン酸キナーゼ欠損症、アテローム性動脈硬化症、T N F 受容体関連周期性症候群 (T R A P S)、尋常性ざ瘡および / または反対型ざ瘡である、請求項 4 1 に記載の抗体、結合メンバー、T ボディ、核酸配列、ベクターまたは宿主細胞。

40

【請求項 4 3】

請求項 1 から 2 2、3 0 もしくは 3 1 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 2 3 から 2 8 のいずれか一項に記載の結合メンバーまたは請求項 2 9 に記載の T ボディの生成方法であって、

- (i) 前記抗体、前記結合メンバーまたは T ボディを発現するように、請求項 3 6 また

50

は 37 に記載の宿主細胞を培養する工程；

(i i) 回収する工程；および

(i i) 前記抗体、前記結合メンバーまたは前記 T ボディをそれぞれ精製する工程を含む方法。

【請求項 44】

請求項 1 から 22、30 もしくは 31 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバーまたは請求項 29 に記載の T ボディの生成方法であって、

(i) 無細胞系を供給する工程；

(i i) 核酸産物テンプレートを供給する工程；

(i i i) 前記核酸産物テンプレートの転写および翻訳を可能にする工程；

(i v) 回収する工程；および

(v) 必要に応じて、前記抗体、前記結合メンバーまたは前記 T ボディをそれぞれ精製する工程

を含む方法。

【請求項 45】

化学合成の少なくとも 1 つの工程を含む、請求項 1 から 22、30 もしくは 31 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバーまたは請求項 29 に記載の T ボディの生成方法。

【請求項 46】

前記化学合成の工程が、請求項 44 に記載の方法に含まれる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

治療有効量の請求項 1 から 22、30 もしくは 31 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバーまたは請求項 29 に記載の T ボディ、請求項 32 もしくは 33 に記載の核酸配列、請求項 34 もしくは 35 に記載のベクターまたは請求項 36 もしくは 37 に記載の宿主細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む、IL - 1 関連疾患の処置方法。

【請求項 48】

前記 IL - 1 媒介疾患が、増殖性糖尿病性網膜症、通風性関節炎、シュニッツラー症候群、全身性若年性特発性関節炎、関節リウマチ、急性通風性関節炎、慢性通風性関節炎、蕁麻疹、脈管炎、1 型糖尿病、2 型糖尿病、強直性脊椎炎、再発性多巣性骨髄炎、再発性多発性軟骨炎、クリオピリン関連周期性症候群 (C A P S)、ベーチェット病、家族性地中海熱、慢性閉塞性肺疾患、リウマチ性多発性筋痛症、NALP3 - 変異、壊疽性膿皮症、慢性特発性蕁麻疹、変形性関節症、滲出型加齢性黄斑変性、ドライアイ症候群、膿疱性乾癬、滑膜炎 - ざ瘡 - 膿疱症 - 骨化過剰症 - 骨炎症候群、マクロファージ活性化症候群、周期性発熱・腺炎・咽頭炎・アフタ性潰瘍症候群、成人発症スティル病、メバロン酸キナーゼ欠損症、アテローム性動脈硬化症、TNF 受容体関連周期性症候群 (T R A P S)、尋常性ざ瘡および / または反対型ざ瘡である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記被験体がヒトである、請求項 47 または 48 に記載の方法。

【請求項 50】

請求項 1 から 22、30 もしくは 31 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバーまたは請求項 29 に記載の T ボディ、請求項 32 もしくは 33 に記載の核酸配列、請求項 34 もしくは 35 に記載のベクターまたは請求項 36 もしくは 37 に記載の宿主細胞が、請求項 39 または 40 のいずれか一項に記載の医薬組成物で提供される、請求項 47 から 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記抗体、前記結合メンバー、前記 T ボディ、前記核酸配列、前記ベクターまたは前記宿主細胞が、非経口投与、経口投与、直腸投与、尿生殖器投与、局所投与、硝子体内投与、静脈内投与、眼内投与、耳投与、鼻腔内投与、吸入により投与、皮膚投与、舌下投与また

10

20

30

40

50

は口腔投与される、請求項 47 から 50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記抗体、前記結合メンバー、前記 T ボディ、前記核酸配列、前記ベクターまたは前記宿主細胞が、それぞれ、少なくとも 1 つのさらなる治療有効化合物とともに提供される、請求項 47 から 51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記化合物が、前記抗体、前記結合メンバー、前記 T ボディ、前記核酸配列、前記ベクターまたは前記宿主細胞と同時にまたは逐次的に投与される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

生体試料中の IL - 1 の存在を検出する方法であって、

a . IL - 1 への結合を許容する条件下で、前記生体試料を請求項 1 から 22、30 もしくは 31 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバーまたは請求項 29 に記載の T ボディと接触させるステップ、および

b . IL - 1 との複合体が形成されるかどうかを検出するステップを含む方法。

【請求項 55】

インビトロまたはインビボでの方法である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記生体試料が、ヒト起源のものである、請求項 54 または 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記生体試料が、血液、尿、脳脊髄液、生検材料および / またはリンパ液である、請求項 54 から 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

請求項 1 から 22、30 もしくは 31 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバーまたは請求項 29 に記載の T ボディでの治療に適格である被験体を選択するために用いられる、請求項 54 から 57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

パッケージ化された組み合わせの試薬および使用のための説明書とともに、請求項 1 から 22、30 もしくは 31 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の結合メンバーまたは請求項 29 に記載の T ボディを含むキット。

【請求項 60】

約 12500 ng / l 以下の関数 K についての値を有する、IL - 1 に対するナイーブ結合メンバー。

【請求項 61】

1250 ng / l より低い K 値を有する、請求項 60 に記載の結合メンバー。

【請求項 62】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の抗体である、請求項 60 または 61 に記載の結合メンバー。

【請求項 63】

s c F v である、請求項 60 から 62 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト化抗 IL - 1 抗体、特に、一価の非常に強力な抗 IL - 1 抗体断片に関する。本発明は、そのような抗体をコードする核酸、ベクター、そのような配列を含有する宿主細胞、前記抗体または核酸を含む医薬組成物および診断用組成物、およびそれらの使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

発明の背景

インターロイキン - 1 (I L - 1) は、活性化マクロファージによって前駆体として生成される炎症促進性サイトカインである。タンパク質分解切断されると、その活性形態が I L - 1 受容体 I 型 (I L - 1 R 1) に結合し、次にはまた膜貫通型 I L - 1 受容体アクセサリタンパク質 (I L - 1 R A P) と会合することにより、シグナル伝達を開始される。形成される複合体は、シグナル伝達能力がある。炎症応答における重要な媒介因子であるサイトカインは、多数の細胞活性、例えば、細胞増殖、分化およびアポトーシスに影響を及ぼす。したがって、I L - 1 は、様々な医薬の重要な標的と考えられている。

【 0 0 0 3 】

ヒト I L - 1 に対する、高い治療可能性を有する抗体が、当該技術分野において必要とされている。治療に成功するためには、そのような抗体が、望ましい生物物理学および生化学的特性を提示することが重要である。例えば、標的 I L - 1 は、極低濃度で強力である非常に効率のよいインターロイキンであり、それ故、包括的に遮断する必要があるため、そのような抗体は、非常に強力であるとともに非常に安定かつ可溶性である必要がある。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 4 】

発明の概要

第一の態様において、本発明は、ヒト I L - 1 の生物学的作用を阻害することに関して最大半量阻害濃度 $I C_{50}$ によって決定して、50 ピコモル濃度 (p M) より低い効力を有する I L - 1 に対する一価抗体断片を提供する。

【 0 0 0 5 】

ヒト化されていようと、いなかろうと、p M 範囲の効力値を有する一価抗体断片は特殊であり、日常的に得られない。加えて、および典型的に、抗体は、親非ヒト抗体と比較したとき、ヒト化によりその標的に対する親和性を失う。したがって、親和性パラメータが親抗体に近くなるまたは親抗体に等しくなるように抗体をヒト化することは、難題である。これは、1 本の可変軽鎖および重鎖しか含まず、したがって、2 本の軽鎖および重鎖を提示する二価抗体ほど強くは標的に結合しない一価抗体断片に、特に当てはまる。

【 0 0 0 6 】

さらに、完全長抗体をより小さい断片に変換すると、その効力は、通常、減少されることになる。これは、付随する結合価変化 (例えば、抗体断片は一価でしかないが、完全長免疫グロブリンは二価または多価である) のためであるばかりでなく、立体的理由に起因することもあり得る。

【 0 0 0 7 】

強力な抗体は、患者へのより少ない薬量の投与を可能にし、その結果、処置費用全般を減少させるので、特に有用である。加えて、疾患の分子標的のより完全な中和を実行可能にする。

【 0 0 0 8 】

さらに、最高効力の抗体を適用するとき、動物モデルならびにヒト治療において様々な適用経路を構想することができる。例えば、局所薬については、上皮層のバリア機能のため送達が限定されることがあるが、この生理的バリアを通過する限られた量の薬物分子の高い効力によって処置の有効性を回復する。

【 0 0 0 9 】

多くの場合、同様の薬力学的効果を達成するために投与する必要がある、効力の低い薬物の多い量は、効力の高い薬を用いるよりはるかに多い静脈内または皮下適用体積になる。そのようなより多い適用体積は、次の 2 つの理由から動物およびヒトでの使用に不利である：第一に、多い薬物体積で患者を処置することの非実際性、および第二に、抗体は質量単位あたり非常に高価であるため。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

したがって、処置に使用される抗体の量が少ないほど、薬の生産費用が安くなる。特に、抗体断片は、例えば、I g Gなどの完全長免疫グロブリンの生成に典型的に使用される哺乳動物発現系より比較的低い費用のものである細菌または酵母培養系を使用する生産に適している。投与すべきより少ない薬量とより安価な製造プロセスの組み合わせは、患者1人あたりの費用効率がより高い医薬品の可能性を開く。したがって、より大量の患者がそのような薬物の恩恵に浴することができる。

【 0 0 1 1 】

安定性および溶解度パラメータは、実行可能な医薬を提供するために非常に重要な別の因子である。抗体薬の安定性および溶解度が高いほど、投与体積は少なく、有効期間の半減期は長くなる。本明細書に提供する抗体は、高安定性かつ可溶性である。すなわち、それらは、長期間にわたっておよび高濃度でも単量体のままである。

10

【 0 0 1 2 】

1つの態様では、

(a) それぞれ配列番号 1、2 および 3 またはそれらのバリエーションで示される可変重鎖 (V H) 相補性決定領域 (C D R) 配列 C D R - H 1、C D R - H 2 もしくは C D R - H 3 のうちの少なくとも 1 つ ; および / または

(b) それぞれ配列番号 4、5 および 6 またはそれらのバリエーションで示される可変軽鎖 (V L) C D R 配列 C D R - L 1、C D R - L 2 もしくは C D R - L 3 のうちの少なくとも 1 つ

20

を含む抗体、特に、上記一価抗体断片を提供する。

【 0 0 1 3 】

別の実施形態において、前記抗体、および特に前記一価抗体断片は、

(a) それぞれ配列番号 1 5 5、1 5 6 および 1 5 7 またはそれらのバリエーションで示される可変重鎖 (V H) 相補性決定領域 (C D R) 配列 C D R - H 1、C D R - H 2 もしくは C D R - H 3 のうちの少なくとも 1 つ ; および / または

(b) (i) それぞれ配列番号 1 5 8、1 5 9 および 1 6 0、もしくはそれらのバリエーションで示されるか、または

(i i) それぞれ配列番号 1 6 1、1 6 2 および 1 6 3、もしくはそれらのバリエーションで示される、可変軽鎖 (V L) C D R 配列 C D R - L 1、C D R - L 2 もしくは C D R - L 3 のうちの少なくとも 1 つ

30

を含む。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、前記抗体は、

(a) 配列番号 7 および配列番号 1 4 6 から成る群より選択される配列との少なくとも 8 5 % の同一性を有する V H ; および / または

(b) 配列番号 8、配列番号 1 3 6 および配列番号 1 4 5 から成る群より選択される配列との少なくとも 8 5 % の同一性を有する V L

を含む。

40

【 0 0 1 5 】

前記抗体は、配列番号 9 であるまたは配列番号 9 から誘導されるリンカー配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、そのような抗体は、配列番号 1 0、配列番号 7 3 および配列番号 8 2 から成る群より選択される配列との少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する抗体断片である。

【 0 0 1 6 】

1つの態様において本発明は、I L - 1 に結合する結合メンバーであって、本明細書に記載する抗体と結合について競合する結合メンバーを提供する。前記結合メンバーは、一価または多価であることができる。好ましい多価結合メンバーは、二価である。多価結合メンバーは、二重特異性であることができる。

【 0 0 1 7 】

50

1つの態様において、本発明は、本明細書に開示する抗体または結合メンバーをコードする、単離された核酸配列を提供する。

【0018】

1つの態様では、前記核酸配列を含むベクターを提供する。

【0019】

1つの態様において、本発明は、上記核酸配列または上記ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0020】

1つの態様では、上記抗体、上記結合メンバー、上記核酸配列、上記ベクターまたは上記宿主細胞を含み、および適するキャリア、希釈剤または賦形剤をさらに含む組成物。前記組成物は、好ましくは、医薬的に許容され得るキャリア、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物である。そのような医薬組成物は、好ましくは、局所、皮内、経皮、静脈内、皮下、筋肉内、非経口、舌下、口腔、経口、鼻、鼻腔内、直腸、局部または眼投与に適する形態でのものである。

10

【0021】

IL-1 媒介疾患の処置方法をさらに提供し、この方法は、それを必要とする被験体に上記医薬組成物を投与することを含む。

【0022】

(i) IL-1 媒介疾患の処置に使用するための、

(ii) 診断に使用するための、

(iii) 化粧品に使用するための、および/または

(iv) 検出目的のための、

20

上記抗体、上記結合メンバー、上記核酸配列、上記ベクター、または本明細書に開示する宿主細胞も提供する。

【0023】

さらに別の態様において、本発明は、本明細書に記載する抗体または結合メンバーの生成方法を提供し、この方法は、(i) それぞれ、上記宿主細胞を培養する工程ならびに抗体断片もしくは結合メンバーを回収する工程および精製する工程；または(ii) 無細胞系の使用、のいずれかを含む。加えて、または代替的に、前記方法は、少なくとも1つの化学的タンパク質合成工程を含むことができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、様々な濃度でのDLX2323の組換えヒト(rh)IL-1 への結合を決定するためのELISAの結果を示す。ng/mlで与えたscFvの濃度に対して450nmの波長での吸光度差をプロットする。四角：DLX2323；丸：対照。

【0025】

【図2】図2は、rhIL-1 への結合との比較で天然ヒトIL-1 へのDLX2323結合の結果を描写するグラフである。天然ヒトIL-1 は、活性化THP-1細胞の上清から得た。ng/mlで与えたIL-1 の濃度に対して450nmの波長での吸光度差をプロットする。四角：rIL-1 ；丸：天然IL-1 。

40

【0026】

【図3】図3は、2回の独立した実験からのヒト線維芽細胞アッセイにおけるrhIL-1 の中和についてのDLX2323と数種の市販IL-1 阻害剤の比較を示す。図3Aは、DLX2323およびMAB201についての結果を示す。Y軸は、ヒト線維芽細胞からのIL-6の放出をpg/mlで示し；x軸は、抗体濃度をpMで示す。四角：DLX2323；丸：対照MAB201。図3Bは、DLX2323、rhIL-1受容体アンタゴニスト(ra)およびカナキヌマブ(ilaris(登録商標))についてのデータの要約である。Y軸は、ヒト線維芽細胞からのIL-6の放出をpg/mlで示し；x軸は、抗体またはrhIL-1raの濃度をpMで示す。四角：DLX2323；丸：カナキヌマブ；三角：rhIL-1ra。

50

【0027】

【図4】図4は、ヒトIL-1誘導マウス炎症モデルにおけるDLX2323のインビボ有効性を示す。ヒトIL-1と、a) 5 mg/mlのDLX2323; b) 15 mg/mlのDLX2323; c) カナキマブ; d) 対照scFv; またはd) PBSのいずれかとして処置した後、血清中のIL-6 (pg/ml)を定量した。

【0028】

【図5】図5は、本明細書において用いる場合のCDR-H1の定義を図示する。矢印は、Kabatt定義による(上)または本明細書において用いる場合の(下)CDR-H1残基を示す。

【0029】

【図6】図6は、大腸菌(E. coli)細胞において発現されたDLX2323バリエーションの清澄化細胞溶解産物が、コーティングされているrhIL-1に結合する、ELISAアッセイの結果を図示する。示されているscFvタンパク質試料について観察された450nmの波長での吸光度差をプロットする。アッセイ緩衝液での1:2倍(灰色カラム)または1:10倍(黒色カラム)の試料希釈物を分析した。

【発明を実施するための形態】

【0030】

詳細な説明

本発明がより容易に理解され得るように、ある一定の用語を最初に定義する。本明細書中に別段の定義がない限り、本明細書において用いるすべての技術用語および科学用語は、それらの技術分野において認知されている意味を持つ。本明細書に記載するものと同様または等価の方法および材料を本発明の実施または試験の際に使用することはできるが、適する方法および材料を下に記載する。本明細書において言及するすべての出版物、特許出願、特許および他の参考文献は、それら全体を参照により援用している。矛盾がある場合、定義を含めて、本明細書が優先する。材料、方法および例は、単に例示のためのものであり、限定する意図はない。

【0031】

本発明の範囲内で、用語「抗体」は、完全長免疫グロブリンならびにそれらの断片も指す。そのような完全長免疫グロブリンは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ベニアリングされた(veneered)抗体またはヒト抗体であってよい。

【0032】

「抗体断片」は、前記免疫グロブリンのターゲティング特異性を保持する、完全長免疫グロブリンの部分を含む。すべてではないが多くの抗体断片には完全長免疫グロブリンの定常領域(Fc領域)が少なくとも部分的に無い。いくつかの実施形態では、抗体断片を完全長免疫グロブリンの消化によって生成する。抗体断片は、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン鎖の一部を含む合成または組換え構築物であってもよい(例えば、HOLLIGER, P. およびHudson, J. 著、「Engineered antibody fragments and the rise of single domains」、Nature Biotechnology 2005年、第23巻、第9号、1126-1136頁を参照されたい)。抗体断片の例としては、これらに限定されないが、scFv、Fab、Fv、Fab'、F(ab')₂断片、dAb、VHH、ナノボディ、V(NAR)または最小認識単位が挙げられる。

【0033】

「一本鎖可変断片」または「一本鎖抗体」または「scFv」は、抗体断片の1つのタイプである。scFvは、リンカーによって接続された免疫グロブリンのVHとVLを含む融合タンパク質である。したがって、それらには完全長免疫グロブリン中に存在する定常Fc領域が無いが、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。

【0034】

本明細書において用いる場合の「結合メンバー」は、完全長免疫グロブリン、抗体断片

10

20

30

40

50

、非抗体スカフォールド、および/または他の結合化合物を指す。そのような結合メンバーは、一価または多価であることができ、すなわち、1つまたはそれより多くの抗原結合部位を有することができる。一価結合メンバーの非限定的な例としては、scFv、Fab断片、dAb、VHH、DARPin、アフィリンおよびナノボディが挙げられる。多価結合メンバーは、2つ、3つ、4つまたはそれより多くの抗原結合部位を有ことができ、その結果、1つまたはそれより多くの異なる抗原を認識することができる。完全長免疫グロブリン、F(ab')₂断片、ビス-scFvおよびダイアボディは、多価結合メンバーの非限定的な例である。前記例示的多価結合メンバーには2つの結合部位が存在する、すなわち、前記結合メンバーは二価である。

【0035】

1つの実施形態において、多価結合メンバーは、二重特異性であり、すなわち、前記結合メンバーは、2つの異なる標的に対して、または1つの標的分子上の2つの異なる標的部位に対して指向される。二重特異性抗体は、例えば、MUELLER, D. および Kontermann, R. E. 著、「Bispecific antibodies」、DUEBEL, S. 編集 Weinheim: Wiley-VCH、2007年、ISBN 3527314539、345-378頁に総説されている。別の実施形態において、多価結合メンバーは、2つより多くの異なる結合部位を含み、例えば、3つまたは4つの異なる抗原のための、それぞれ、3つまたは4つの異なる結合部位を含む。そのような結合メンバーは、多価であり、多重特異性、特に、それぞれ、三重または四重特異性である。

【0036】

「非抗体スカフォールド」は、例えば、FIELDER, M. および Skerra, A. 著、「Non-antibody scaffolds」、DUEBEL, S. 編集 Weinheim: Wiley-VCH、2007年、ISBN 3527314539、467-500頁；またはGILBRETH, R. N. および Koide, S. 編集、「Structural insights for engineering binding proteins based on nonantibody scaffolds」、Current Opinion in Structural Biology 2012年、第22巻、413-420頁に記載されている、抗原結合ポリペプチドである。非限定的な例としては、アフィボディ、アフィリン分子、アドネクチン、アンチカリン、DARPin、ノッチン、クニッツ型ドメイン、アビマー、テトラネクチンおよびトランスボディが挙げられる。

【0037】

「結合化合物」は、標的に結合する化学的または生物学的分子であって、上で定義のクラスの完全長免疫グロブリン、抗体断片および非抗体スカフォールドに属していない分子である。結合化合物の例としては、これらに限定されないが、マクロライド(GUNDLURU, M. K. 著、「Design, synthesis and initial biological evaluation of a novel pladienolide analog scaffold」、Medchemcomm、2011年、第2巻、904-908頁；Paterson, I. 著、「Total synthesis and biological evaluation of a series of macrocyclic hybrids and analogies of the antimetabolic natural products dictyostatin, discodermolide and taxol」、Chem Asian J. 2011年、第6巻、459-473頁；Morita, H. 著、「Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase」、PNAS 2011年、第108巻、13504-13509頁)、分子鋳型ポリマー(HOSHINO, Y. 著、「Recognition, neutralization and clearance of target peptides

10

20

30

40

50

in the blood stream of living mice by molecular imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody」、Journal of the American Chemical Society、2010年、第19巻、664 - 6645頁)、アプタマー(STREHLITZ, B.ら著、「Aptamers for pharmaceuticals and their application in environmental analytics」、Bioanalytical reviews 2012年、第4巻、1 - 30頁; YE, M.ら著、「Generating Aptamers by Cell-SELEX for Applications in Molecular Medicine」、International Journal of Molecular Sciences 2012年、第13巻、3341 - 3353頁)、シューベゲルマー(例えば、MAASCH, C.ら著、「Polyethylenimine-Polyplexes of Spiegelmer NOX-A50 directed against intracellular high mobility group protein A1(HMGA1) reduce tumor growth in vivo」、JBC 2010年、第285巻、40012 - 40018頁を参照されたい)、またはペプチド(環状もしくは線状; 例えば、GOULD, A.ら著、「Cyclotides, a novel ultra stable polypeptide scaffold for drug discovery」、Curr Pharm Des、2011年、第17巻、4294 - 4307頁を参照されたい)が挙げられる。

【0038】

「IC₅₀」または「最大半量阻害濃度」は、アンタゴニスト薬効の尺度であり、生物学的または生化学的機能を阻害する化合物の有効性を定量的に記述するものである。この尺度は、ある一定の生物学的または生化学的プロセスを50%阻害するためにどれ程の量の化合物が必要とされるかを示す。親和性の直接的指標ではないが、両方の値は相関し、チェン-プルソフ式によって決定することができる(CHENG Y. および Prusoff W. H. 著、「Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction」、Biochemical Pharmacology 1973年、第22巻、3099 - 3108頁; RAMMES, G.ら著、「Identification of a domain which affects kinetics and antagonistic potency of clozapine at 5-HT₃ receptors」、PLOS one 2009年、第4巻、1 - 14頁; ZHEN, J.ら著、「Concentration of receptor and ligand revisited in a modified receptor binding protocol for high-affinity radioligands: [³H]spiperone binding to D₂ and D₃ dopamine receptors」、Journal of Neuroscience Methods 2010年、第188巻、32 - 38頁)。

【0039】

本発明において用いる場合の用語「IL-1 特異的結合」は、結合メンバーが、抗IL-1 結合メンバーが結合する、IL-1 エピトープを含まない構造的に異なる抗原に対するよりも高い親和性でIL-1 に結合することを記述する。特異的結合は、1マイクロモル濃度より低い解離平衡定数(K_D)によって表される。この定数は、例えば、Attana計器の水晶振動子マイクロバランス(QCM)、またはBIACORE計器の表面プラズモン共鳴(SPR)技術を用いて決定することができる。

【0040】

本明細書において用いる場合、「IL-1」は、例えば、Dinarellio C. A. 著、「Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases」、Nature reviews 2012年、第11巻、633-652頁に記載されているような分子を指す。本明細書において用いる場合の「hIL-1」は、ヒトIL-1を指す。「rIL-1」は、組換えIL-1を指す。組換えIL-1は、それを調製する方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有することもあり、または有さないこともある。「rhIL-1」は、組換えヒトIL-1を指す。rhIL-1を、例えば、Peprotech、米国(カタログ番号200-01B)から得てもよい。IL-1をヒトまたは非ヒト由来の生体試料からの単離によって得てもよい。

10

【0041】

「ヒト化」抗体は、非ヒト親抗体またはそのバリエーションの1つまたはそれより多くの、典型的には6つすべてのCDR領域を含む抗体、およびフレームワークが、例えば、(i)非ヒト親抗体の1つまたはそれより多くのフレームワーク残基を潜在的に含む、ヒトフレームワークまたは(ii)天然に生成するヒトフレームワークとの類似性を増加させるように改変された非ヒト抗体からのフレームワークである抗体を指す。抗体をヒト化する方法は、当該技術分野において公知である。例えば、LEGER, O. および Saldanha, J. 著、「Antibody Drug Discovery」、WOOD, C. 編集 London: Imperial College Press、2011年、ISBN 1848166281、1-23頁を参照されたい。

20

【0042】

「フレームワーク」(FR)は、それぞれのCDRを取り囲む、可変軽鎖(VL)または可変重鎖(VH)いずれかの、可変免疫グロブリンドメインのスcaffoldingを指す。VLおよび/またはVHフレームワークは、典型的に、CDR領域に隣接する4つのフレームワークの部分、FR1、FR2、FR3およびFR4を含む。したがって、当該技術分野において公知であるように、VLは、一般構造:(FR-L1)-(CDR-L1)-(FR-L2)-(CDR-L2)-(FR-L3)-(CDR-L3)-(FR-L4)を有し、これに対してVHは、一般構造:(FR-H1)-(CDR-H1)-(FR-H2)-(CDR-H2)-(FR-H3)-(CDR-H3)-(FR-H4)を有する。

30

【0043】

「CDR」は、抗原結合に主として寄与する抗体の超可変領域を指す。典型的に、抗原結合部位は、フレームワークscaffoldingに組み込まれた6つのCDRを含む。本明細書では、VLのCDRをCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3と呼び、これに対してVHのCDRをCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3と呼ぶ。これらを、Kabat, E. A. 著、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、アメリカ合衆国保健福祉省(U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)編、NIH Publications、1991年、91-3242頁に記載されているように同定することができる。しかし、本明細書において用いる場合のCDR-H1は、位置27で開始して位置36の前に終わるという点でKabat定義とは異なる(実例については図5を参照されたい)。

40

【0044】

本明細書において用いる場合、抗体のVHおよびVL内のアミノ酸残基位置を同定するための番号付けシステムは、HONEGGER, A. および Plueckthun, A. 著、「Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: An automatic modelling and analysis tool」、Journal of Molecular Biology 2001年、第309巻、657-670頁に

50

記載されている「A H o」システムに対応する。この出版物は、A H oとK a b a tシステム (K A B A T, E. A. ら著、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、アメリカ合衆国保健福祉省 (U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 編、NIH Publications、1991年、91-3242頁) の間の変換表をさらに提供している。

【0045】

「単離された」抗体または核酸は、その天然環境の少なくとも1つの成分から同定ならびに分離および/または回収されたものである。

【0046】

本明細書において用いる場合の用語「同一性」は、2つのタンパク質または核酸間の配列マッチを指す。比較すべきタンパク質または核酸配列を、例えば、バイオインフォマテイクスツール、例えばEMBOSS Needle (ペアワイズアラインメント: www.ebi.ac.ukで利用可能) を使用して、最大同一性が得られるようにアラインする。比較すべき配列内の同じ位置が、同じ核酸塩基またはアミノ酸残基によって占有されている場合には、それぞれの分子は、まさしくその位置で同一である。したがって、「同一性パーセント」は、比較した位置数で割って100%を掛けたマッチング位置数の関数である。例えば、10配列位置のうち6位置が同一である場合には、その同一性は60%である。2つのタンパク質配列間の同一性パーセントは、例えば、EMBOSS Needleに組み込まれているニードルマンとウンシュのアルゴリズム (NEEDLEMAN, S. B. およびWunsch, C. D., 「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」、Journal of Molecular Biology」1970年、第48巻、443-453頁) を使用して、BLOSUM62行列、10の「ギャップ開始ペナルティ」、0.5の「ギャップ伸長ペナルティ」、誤りの「エンドギャップペナルティ」、10の「エンドギャップ開始ペナルティ」および0.5の「エンドギャップ伸長ペナルティ」を用いて、決定することができる。同じ一次アミノ酸配列または核酸配列を有する2つの分子は、一切の化学的および/または生物学的変化に関係なく同一である。例えば、同じ一次アミノ酸配列を有するが、異なるグリコシル化パターンを有する2つの抗体は、この定義により同一である。核酸の場合、例えば、同じ配列を有するが、ホスフェートではなくチオホスフェートなどの異なる連結成分を有する2つの分子は、この定義により同一である。

【0047】

「類似」タンパク質配列は、アラインしたとき、比較すべき配列の同じ位置に類似アミノ酸残基および、必須ではないが殆どの場合、同一アミノ酸残基を共有するものである。類似アミノ酸残基は、側鎖の化学特性によってファミリーに分類される。前記ファミリーは、下で「保存的アミノ酸置換」について記載する。配列間の「類似性パーセント」は、比較する位置の合計数で割って100%を掛けた、比較すべき配列の同じ配列位置に同一または類似残基を含有する位置の数である。例えば、10配列位置のうち6位置が、同一アミノ酸残基を有し、10位置のうち2位置が類似残基を含有する場合には、その配列は、80%類似性を有する。2配列間の類似性は、例えば、EMBOSS Needleを使用して決定することができる。

【0048】

「バリエーション」は、1つまたはそれより多くのアミノ酸残基または核酸塩基の付加 (挿入を含む)、欠失および/または置換に基づいて親配列とは異なるが、本明細書に開示する親配列の少なくとも1つの所望の活性を保持している、アミノ酸配列または核酸配列を指す。抗体の場合、そのような所望の活性は、特異的抗原結合を含み得る。類似して、バリエーション核酸配列は、1つまたはそれより多くの核酸塩基の付加、欠失および/または置換に基づいて親配列と比較したとき変更されていることがあるが、コードされた抗体は、

10

20

30

40

50

上記の所望の活性を保持する。バリエーションは、天然に存在するもの、例えば対立遺伝子バリエーションまたはスプライスバリエーション、であることもあり、または人工的に構築されることもある。

【0049】

本明細書において用いる場合、用語「保存的変換」は、対応する基準 (reference) に物理的に、生物学的に、化学的にまたは機能的に類似している、例えば、類似のサイズ、形状、電荷、化学的特性 (共有結合または水素結合を形成する能力を含む) などを有する、変換を指す。そのような保存的変換としては、1つまたはそれより多くの核酸塩基およびアミノ酸置換、付加および欠失が挙げられるが、これらに限定されない。

【0050】

例えば、保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が、類似側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられるものを含む。例えば、抗原への結合に関して非必須であるアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置き換えることができ、例えば、セリンをトレオニンで置換してもよい。アミノ酸残基は、通常、共通の類似側鎖特性、例えば、

1. 非極性側鎖 (例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン)、
2. 無電荷極性側鎖 (例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、プロリン、システイン、トリプトファン)、
3. 塩基性側鎖 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン、プロリン)、
4. 酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、
5. 分岐側鎖 (例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン) および
6. 芳香族側鎖 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)

に基づいてファミリーに分けられる。保存的置換は、非天然アミノ酸の使用を含むこともある。

【0051】

非保存的置換、すなわち、あるファミリーのメンバーの別のファミリーのメンバーに対する交換は、例えば結合メンバーの電荷、双極子モーメント、サイズ、親水性、疎水性または高次構造に関して、実質的変化をもたらすことがあり、これは、特に、標的分子への結合について必須であるアミノ酸に作用する場合、結合活性の有意な降下をもたらすことがある。非保存的置換も非天然アミノ酸の使用を含み得る。

【0052】

当該技術分野において公知の様々な標準的技法、例えば、コンビナトリアルケミストリー、部位特異的DNA変異誘発、PCR媒介および/またはカセット変異誘発、ペプチド/タンパク質化学合成、親結合メンバー中の反応性基を特異的に変換する化学反応によって、保存的および非保存的変換を親結合メンバーに導入することができる。バリエーションをそれらの化学的、生物学的、生物物理学的および/または生化学的特性について常習的方法により試験することができる。

【0053】

核酸ハイブリダイゼーション反応を異なるストリンジェンシーの条件下で行うことができる。「ストリンジェントな条件」は、当該技術分野において周知であり、発表されている。典型的に、ハイブリダイゼーション反応中、SSC系緩衝液を使用することができ、SSCは、7.0のpHを有する、0.15M NaClと15mMクエン酸塩の緩衝液である。緩衝液濃度の増加および変性剤の存在は、ハイブリダイゼーション工程のストリンジェンシーを増大させる。例えば、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、(i) 42 の、50% (体積/体積) ホルムアミド、5xSSC (0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xデンハルト溶液、超音波処理済みサケ精子DNA (50µg/ml)、0.1%SDSおよび10%硫酸デキストランと、0.2xSSCおよび0.1%SDS中での42 の洗浄; (ii) 42 の、50% (体積/体積) ホ

10

20

30

40

50

ルムアミドと、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)と、750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム、または(iii)55の、10%硫酸デキストラン、2xSSCおよび50%ホルムアミド、続いて、55のEDTAを含有する0.1xSSCから成る高ストリンジェンシー洗浄の使用を含むことができる。加えて、または代替的に、低イオン強度かつ高温の洗浄溶液を使用する1工程、2工程またはそれより多くの洗浄工程を、例えば50の0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを使用するハイブリダイゼーションプロトコルに含めることができる。

【0054】

本発明の様々な態様を後続のサブセクションでさらに詳細に記載する。様々な実施形態、選好および範囲を思いのままに組み合わせてもよいことは理解される。さらに、具体的な実施形態に依存して、選択された定義、実施形態または範囲が当てはまらないこともある。

【0055】

第一の態様において、本発明は、50pMより低いIC₅₀でヒトIL-1の生物学的作用を阻害する、IL-1に結合する一価抗体断片を提供する。前記IC₅₀は、好ましくは約40pMより低く、さらに好ましくは約30、20、10、5、4、3、2または1pMより低い。

【0056】

好ましくは、前記一価抗体断片は、約50kDa以下、例えば、約45kDa、40kDa、35kDaまたはそれより小さく、好ましくは約25kDa、例えば、23、24、25、26または27kDaの分子量を有する。

【0057】

1つの態様において、本発明は、

(a)それぞれ配列番号1、2および3またはそれらのバリエーションで示されるVH CDR配列CDR-H1、CDR-H2もしくはCDR-H3のうちの少なくとも1つ；および/または

(b)それぞれ配列番号4、5および6またはそれらのバリエーションで示されるVL CDR配列CDR-L1、CDR-L2もしくはCDR-L3のうちの少なくとも1つを含む抗体を提供する。

【0058】

そのような抗体は、

(a)それぞれ配列番号155、156および157またはそれらのバリエーションで示されるVH CDR配列CDR-H1、CDR-H2もしくはCDR-H3のうちの少なくとも1つ；および/または

(b)

(i)それぞれ配列番号158、159および160、もしくはそれらのバリエーションで示されるか、または

(ii)それぞれ配列番号161、162および163、もしくはそれらの変異型で示される、VL CDR配列CDR-L1、CDR-L2もしくはCDR-L3のうちの少なくとも1つを含む得る。

【0059】

好ましくは、前記抗体は、それぞれ、少なくとも、配列番号3のCDR-H3および配列番号6もしくは配列番号157のCDR-L3またはそのバリエーションを含む。さらにいっそう好ましくは、前記抗体は、

(i)配列番号1から6もしくはそれらのバリエーション；

(ii)配列番号155から160もしくはそれらのバリエーション；または

(iii)配列番号155から157および配列番号161から163もしくはそれら

10

20

30

40

50

のバリエーション

の6つすべてのCDRを含む。

【0060】

そのような抗体は、50 pMより低い、さらに好ましくは約40 pM、30、20、10より低い、さらにいっそう好ましくは5 pMより低い、および最も好ましくは約1 pM以下のIC₅₀でヒトIL-1に対する非常に高い阻害効力を有する。

【0061】

好ましくは、前記抗体は、少なくとも2 pM、さらに好ましくは少なくとも1 pMのIC₅₀でヒトIL-1に対する阻害効力を有する。

【0062】

前記IC₅₀は、例えば、細胞ベースの効力アッセイを用いて決定することができる。1つの実施形態では、上記IC₅₀値を、ヒト線維芽細胞からのIL-6のIL-1誘導放出の阻害によって決定する。そのようなアッセイは、IL-1で刺激された線維芽細胞がIL-6を放出するという観察に基づく。IL-1阻害抗体の存在下では、放出されるIL-6の濃度が低減される。好ましい実施形態では、正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF-Neo、例えば、Lonza、米国ウォーカーズビルから入手可能、カタログ番号CC-2509)細胞を使用する。hIL-1と対象の抗体との混合物をインキュベートして、上清を回収し、IL-6 ELISA、例えば、R&D Systems Human IL-6 DuoSet ELISAキット(R&D Systems、カタログ番号DY206)によって検査する。1つの実施形態において、前記アッセイは、実施例3において記載するようなIL-1中和アッセイである。好ましくは、IC₅₀値は、そのようなアッセイの少なくとも3回の独立した反復から得られる平均値である。

【0063】

本明細書に記載する抗体は、完全長免疫グロブリンであることもあり、または抗体断片、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv断片、ナノボディ、VHもしくは最小認識単位であることもある。

【0064】

好ましい実施形態において、上記抗体および特に一価抗体断片は、scFvである。VHドメインおよびVLドメインを柔軟なリンカーにより、VL-リンカー-VHまたはVH-リンカー-VL、いずれかの配向で接続することができる。好ましい実施形態において、前記配向は、VL-リンカー-VHであり、すなわち、軽鎖可変領域がそのポリペプチドのN末端にあり、重鎖可変領域がC末端にある。

【0065】

前記抗体は、好ましくは、ヒト化されている。そのようなヒト化抗体は、例えば、可変軽鎖に配列番号18のFR-L1、配列番号19のFR-L2、配列番号20のFR-L3および/もしくは配列番号21のFR-L4、またはそれらのバリエーションを含み得る。加えて、または代替的に、前記ヒト化抗体は、配列番号22、26もしくは30の重鎖可変フレームワーク領域FR-H1；配列番号23、27もしくは31の重鎖可変フレームワーク領域FR-H2；配列番号24、28もしくは配列番号32の重鎖可変フレームワーク領域FR-H3；および/または配列番号25、29もしくは33の重鎖可変フレームワーク領域FR-H4を含むことができる。

【0066】

したがって、好ましい実施形態において、前記抗体は、それぞれ配列番号7もしくは配列番号146のVH配列、またはそのバリエーションを含む。そのようなバリエーションは、配列番号7または配列番号146との少なくとも85%、さらに好ましくは90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および最も好ましくは100%の配列同一性を有する。そのようなバリエーションVH配列の例としては、これらに限定されないが、配列番号121、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150または配列番号1

10

20

30

40

50

52が挙げられる。

【0067】

加えて、または代替的に、本明細書に開示する抗体は、それぞれ配列番号8、配列番号136および配列番号145から成る群より選択されるVL配列、またはそのバリエーションを含む。そのようなバリエーションは、配列番号8、配列番号136または配列番号145との少なくとも85%、さらに好ましくは90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および最も好ましくは100%の配列同一性を有する。そのようなバリエーションVL配列の例としては、これらに限定されないが、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号139または配列番号153が挙げられる。

10

【0068】

1つの実施形態において、前記抗体は、配列番号7または配列番号146との少なくとも85%、さらに好ましくは90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および最も好ましくは100%の配列類似性を有するVH配列を含む。さらに、または代替的に、前記抗体は、配列番号8、配列番号136または配列番号145との少なくとも85%、さらに好ましくは90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および最も好ましくは100%の配列類似性を有するVL配列を含む。

【0069】

非常に好ましい実施形態において、前記抗体は、配列番号7で示されるVHおよび配列番号8で示されるVLを含む。配列番号7および配列番号8両方のフレームワーク配列は、国際公開第03/097697号A(ESBATech AG)に記載されているヒト免疫グロブリンに由来する。そのVHおよびVLフレームワーク配列は、ウサギ抗体のヒト化および安定性のために改変されている。例えば、国際公開第2009/155726号A(ESBATech、ANALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC); BORRAS, L.ら著、「Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies」、Journal of Biological Chemistry 2010年、第285巻、第12号、9054-9066頁を参照されたい。1つの実施形態において、本明細書に開示する抗体のVLフレームワークは、配列番号18~21またはそれらのバリエーションを含む。加えて、または代替的に、前記抗体のVHフレームワークは、それぞれ配列番号22~25、配列番号26~29もしくは配列番号30~33またはそれらのバリエーションを含む。

20

30

【0070】

別の好ましい実施形態において、前記抗体は、配列番号146で示されるVHおよび配列番号8または配列番号145で示されるVLを含む。

【0071】

別の好ましい実施形態において、前記抗体は、配列番号146で示されるVHおよび配列番号136で示されるVLを含む。

40

【0072】

抗体は、特にscFvの場合、リンカー配列を含み得る。そのようなリンカー配列は、典型的に10から約25のアミノ酸を有する。通常、そのようなリンカーペプチドは、柔軟性を付与するグリシン、ならびに溶解度向上のためのセリンおよび/またはトレオニンを多く含む。好ましい実施形態では、(GGGGS)₄リンカー(配列番号9)またはそのバリエーションを使用する。3から5リピートを有する前記モチーフの異形(variation)を使用してもよい。さらなる適するリンカーは、例えば、ALFTHAN, K.著、「Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides」、P

50

rotein Engineering 1995年、第8巻、第7号、725 - 731
頁に記載されている。

【0073】

ある一定の実施形態では、本明細書に提供する抗体のパリアントが企図される。例えば、抗体の、抗原結合、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性 (ADCC)、補体依存性細胞傷害性 (CDC) を改善すること、安定性もしくは溶解度を増加させること、免疫原性を減少させることおよび/または他の生物学的、生化学的もしくは生物物理学特性を変更することが望ましいこともある。いくつかの実施形態において、前記パリアントは、親抗体を上回る改善を一切示さない。

【0074】

本明細書に提供する抗体のパリアントを、タンパク質工学および/もしくは化学工学により、その抗体をコードする核酸配列への適切な変更の導入により、またはタンパク質/ペプチド合成により調製してよい。欠失、置換、付加および挿入の任意の組み合わせ (単数または複数) をフレームワークにまたはCDRに施すことができるが、但し、産生される抗体が、適切な方法を用いてスクリーニングすることができる所望の特性を有することを条件とする。置換、好ましくは、上記の保存的置換は、特に興味深い。好ましい保存的置換は、

1. バリン (V) によるアラニン (A) の置換 ;
2. リジン (K) によるアルギニン (R) の置換 ;
3. グルタミン (Q) によるアスパラギン (N) の置換 ;
4. グルタミン酸 (E) によるアスパラギン酸 (D) の置換 ;
5. セリン (S) によるシステイン (C) の置換 ;
6. アスパラギン酸 (D) によるグルタミン酸 (E) の置換 ;
7. アラニン (A) によるグリシン (G) の置換 ;
8. アルギニン (R) またはリジン (K) によるヒスチジン (H) の置換 ;
9. ロイシン (L) によるイソロイシン (I) の置換 ;
10. ロイシン (L) によるメチオニン (M) の置換 ;
11. チロシン (Y) によるフェニルアラニン (F) の置換 ;
12. アラニン (A) によるプロリン (P) の置換 ;
13. トレオニン (T) によるセリン (S) の置換 ;
14. チロシン (Y) によるトリプトファン (W) の置換 ;
15. トリプトファン (W) によるフェニルアラニン (F) の置換 ; および/または
16. ロイシン (L) によるバリン (V) の置換

を含み、逆もまた含む。

【0075】

本明細書に記載する抗体は、1つまたはそれより多く、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはそれより多くのそのような保存的置換を含み得る。

【0076】

非保存的置換は、例えばそのポリペプチドの電荷、双極子モーメント、サイズ、親水性、疎水性または高次構造に関して、より実質的な変化をもたらすし得る。1つの実施形態において、前記抗体は、1つまたはそれより多く、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはそれより多くのそのような非保存的置換を含む。

【0077】

変更は、CDRに存在してもよいし、またはフレームワーク配列に存在してもよい。例えば、本明細書に提供するCDRは、1、2、3、4、5またはさらにそれより多くの変更を含み得る。例えば、全体として見るとCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3配列は、本明細書に提供するCDRと、特に、(i)配列番号4、5および6と、または(ii)配列番号161、162および163と、少なくとも75%、好ましくは少なくとも76%、77%、78%、79%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%またはさらに好ましくは99%同一であ

10

20

30

40

50

る。加えて、または代替的に、全体として見るとCDR - H 1、CDR - H 2およびCDR - H 3配列は、本明細書に提供するCDRと、特に、(i)配列番号1、2および3と、または(ii)配列番号155、156および157と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%、82%、83%、84%、95%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%またはさらに好ましくは99%同一である。

【0078】

1つの実施形態において、全体として見るとCDR - L 1、CDR - L 2、CDR - L 3、CDR - H 1、CDR - H 2およびCDR - H 3は、本明細書に提供するCDRに、少なくとも85%、好ましくは90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%またはさらに好ましくは99%類似している。加えて、または代替的に、全体として見るとCDR - L 1、CDR - L 2、CDR - L 3、CDR - H 1、CDR - H 2およびCDR - H 3は、本明細書に提供するCDRに、少なくとも85%、好ましくは90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%またはさらに好ましくは99%類似している。

10

【0079】

したがって、バリエーションは、例えば、配列番号4に1、2、3、4または5つの置換を含み得る。配列番号14におけるXで印されている位置での置換は、非常に好ましい。前記バリエーションは、例えば、

(i)可変軽鎖のA H o位置32にアラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)；

20

(ii)可変軽鎖のA H o位置33にアラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)；および/または

(iii)可変軽鎖のA H o位置40にグルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)

30

を含み得る。

【0080】

加えて、または代替的に、バリエーションは、配列番号5に1、2、3、または4つの置換を含む。配列番号15におけるXで印されている位置での置換は、非常に好ましい。そのようなバリエーションは、例えば、

(i)可変軽鎖のA H o位置58にアラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)；および/または

40

(ii)可変軽鎖のA H o位置69にアラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)

を含み得る。

【0081】

加えて、または代替的に、バリエーションは、配列番号6に1、2、3、4、5または6つ

50

の置換を含む。配列番号 16 における X で印されている位置での置換は、非常に好ましい。例えば、そのようなバリエーションは、

(i) 可変軽鎖の A H o 位置 109 にアラニン (A)、システイン (C)、イソロイシン (I)、アスパラギン (N)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V) ;

(ii) 可変軽鎖の A H o 位置 111 にアラニン (A)、グリシン (G)、プロリン (P)、セリン (S) ;

(iii) 可変軽鎖の A H o 位置 112 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) ;

(iv) 可変軽鎖の A H o 位置 135 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) ; および / または

(v) 可変軽鎖の A H o 位置 136 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)

を含み得る。

【0082】

加えて、または代替的に、バリエーションは、配列番号 1 または配列番号 155 に 1、2、3 または 4 つの置換を含む。配列番号 11 における X で印されている位置での置換は、非常に好ましい。そのようなバリエーションは、例えば、

(i) 可変重鎖の A H o 位置 33 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) ; および / または

(ii) 可変重鎖の A H o 位置 39 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)

を含み得る。

【0083】

加えて、または代替的に、バリエーションは、配列番号 2 または配列番号 156 に 1、2、3、4、5 または 6 つの置換を含む。配列番号 12 における X で印されている位置での置換は、非常に好ましい。例えば、前記バリエーションは、

(i) 可変重鎖の A H o 位置 59 にアラニン (A)、システイン (C)、グリシン (G)、メチオニン (M) もしくはチロシン (Y) ;

(ii) 可変重鎖の A H o 位置 60 にアスパラギン酸 (D)、アスパラギン (N) もしくはプロリン (P) ; および / または

(iii) 可変重鎖の A H o 位置 69 にアラニン (A)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、グリシン (G)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)

、プロリン (P)、セリン (S)、トレオニン (T)、トリプトファン (W) もしくはチロシン (Y)
を含み得る。

【 0 0 8 4 】

加えて、または代替的に、バリエーションは、配列番号 3 または配列番号 1 5 7 に 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 の置換を含む。配列番号 1 3 における X で印されている位置での置換は、非常に好ましい。そのようなバリエーションは、例えば、

(i) 可変重鎖の A H o 位置 1 1 0 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) ;

(i i) 可変重鎖の A H o 位置 1 1 1 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) ;

(i i i) 可変重鎖の A H o 位置 1 1 2 にアラニン (A)、システイン (C)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、チロシン (Y) ;

(i v) 可変重鎖の A H o 位置 1 1 3 にフェニルアラニン (F) もしくはイソロイシン (I) ;

(v) 可変重鎖の A H o 位置 1 1 4 にアラニン (A)、システイン (C)、グルタミン酸 (E)、グリシン (G)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V) ;

(v i) 可変重鎖の A H o 位置 1 1 5 にアラニン (A)、グリシン (G)、メチオニン (M) もしくはアスパラギン (N) ;

(v i i) 可変重鎖の A H o 位置 1 3 5 にアラニン (A)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、ヒスチジン (H)、アスパラギン (N)、セリン (S)、トレオニン (T) ;

(v i i i) 可変重鎖の A H o 位置 1 3 6 にアラニン (A)、システイン (C)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) ;

(i x) 可変重鎖の A H o 位置 1 3 7 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y) ; および / または

(x) 可変重鎖の A H o 位置 1 3 8 にアラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)
を含み得る。

【 0 0 8 5 】

バリエーションの特に好ましいタイプは、1 つまたはそれより多くの全 C D R が置き換えられているものである。典型的に、C D R - H 3 および C D R - L 3 は、抗原結合に最も有意に寄与する。例えば、全 C D R - L 1、C D R - L 2、C D R - H 1 および / または C

10

20

30

40

50

D R - H 2 を、天然または人工起源の異なる C D R によって置き換えてもよい。いくつかの実施形態では、1つまたはそれより多くの C D R をアラニン - カセットによって置き換える。

【0086】

1つの実施形態において、本明細書に記載するバリエーションは、配列番号10、配列番号73および配列番号82から成る群より選択される配列との少なくとも85%、さらに好ましくは90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および最も好ましくは100%の配列同一性を有する。

【0087】

1つの実施形態において、本明細書に記載するバリエーションは、配列番号10、配列番号73および配列番号82との少なくとも85%、さらに好ましくは90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および最も好ましくは100%の配列類似性を有する。

10

【0088】

加えて、または代替的に、前記抗体のVHは、溶解度向上性点変異を含む。国際公開第2009/155725号(ESBATech, a Novartis company)には、抗体の全体の溶解度を増加させることが立証されたモチーフが記載されている。それらの残基は、抗体の可変ドメインと定常ドメインの界面にある位置に配置され、定常ドメインを欠く抗体断片、特にs c F vを安定させる。詳細には、以下の残基の1つ、好ましくは3つすべてが存在する：

20

(i) 重鎖アミノ酸位置12(AH0番号付けによる)にセリン(S)；

(ii) 重鎖アミノ酸位置103(AH0番号付けによる)にセリン(S)もしくはトレオニン(T)；および/または

(iii) 重鎖アミノ酸位置144(AH0番号付けによる)にセリン(S)もしくはトレオニン(T)。

【0089】

好ましい実施形態において、前記抗体は、VH位置12にセリン；VH位置103にセリン；およびVH位置144にトレオニン(すべてAH0番号付け)を有する。

【0090】

したがって、1つの実施形態において、本明細書に開示する抗体は、配列番号30~33のVHフレームワーク配列またはそれらのバリエーションを含む。

30

【0091】

好ましくは、本明細書において用いる場合のバリエーション抗体は、

(i) IL-1への、特に、hIL-1への特異的結合を保持する；

(ii) ヒトIL-1の生物学的作用を阻害することに関して500pMより低い、好ましくは400pM、300pM、200pM、100pM、50pMより低い、さらに好ましくは25pMより低い効力(IC₅₀)を有する；

(iii) カニクイザルIL-1、アカゲザルIL-1および/またはラットIL-1と交差反応性である；および/または

(iv) IL-1、好ましくは、ヒトIL-1、カニクイザルIL-1、アカゲザルIL-1および/またはラットIL-1、最も好ましくはhIL-1への結合について、本明細書に開示する抗体と競合する。

40

【0092】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149、配列番号151および配列番号153から成る群より選択されるVL配列を含む。

50

【 0 0 9 3 】

加えて、または代替的に、前記バリエーションは、配列番号 1 0 6、配列番号 1 0 7、配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0、配列番号 1 2 1、配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 6、配列番号 1 2 8、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 2、配列番号 1 3 4、配列番号 1 3 8、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 6、配列番号 1 4 8、配列番号 1 5 0、配列番号 1 5 2 から成る群より選択される V H 配列を含む。

【 0 0 9 4 】

バリエーションを軽鎖および重鎖の鎖シャッフリングによって調製してもよい。単一軽鎖を重鎖のライブラリーと組み合わせて、バリエーションのライブラリーを生じさせることができる。1つの実施形態において、前記単一軽鎖は、上に列挙した V L 配列の群から選択され、および/または前記重鎖ライブラリーは、上に列挙した V H 配列の1つまたはそれより多くを含む。同様に、単一重鎖を軽鎖のライブラリーと組み合わせることができる。好ましくは、前記単一重鎖は、上に列挙した V H 配列の群から選択され、および/または前記軽鎖ライブラリーは、上に列挙した V L 配列の1つまたはそれより多くを含む。

10

【 0 0 9 5 】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号 1 3 5 の V L および/または配列番号 7、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 6、配列番号 1 5 0 もしくは配列番号 1 5 2 の V H を含む。好ましくは、前記バリエーションは、配列番号 6 7、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7 または配列番号 8 8 を含む。

20

【 0 0 9 6 】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号 1 3 6 の V L および/または配列番号 7、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 6、配列番号 1 5 0 もしくは配列番号 1 5 2 の V H を含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号 6 8、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3 または配列番号 8 4 を含む。

【 0 0 9 7 】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号 1 3 7 の V L および/または配列番号 7、配列番号 1 3 8、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 6、配列番号 1 5 0 もしくは配列番号 1 5 2 の V H を含む。好ましくは、前記バリエーションは、配列番号 6 9、配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4 または配列番号 9 5 を含む。

30

【 0 0 9 8 】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号 1 3 9 の V L および/または配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 6、配列番号 1 5 0 もしくは配列番号 1 5 2 の V H を含む。好ましくは、前記変型は、配列番号 7 0、配列番号 7 7、配列番号 7 8、配列番号 7 9 または配列番号 8 0 を含む。

【 0 0 9 9 】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号 1 4 1 の V L および/または配列番号 1 4 2 の V H を含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号 7 1 を含む。

40

【 0 1 0 0 】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号 1 4 3 の V L および/または配列番号 1 4 4 の V H を含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号 7 2 を含む。

【 0 1 0 1 】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号 1 4 5 の V L および/または配列番号 1 4 6 の V H を含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号 7 3 を含む。

【 0 1 0 2 】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号 1 4 7 の V L および/または配列番号 1 4 8 の V H を含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号 7 4 を含む。

【 0 1 0 3 】

50

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号149のVLおよび/または配列番号150のVHを含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号75を含む。

【0104】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号151のVLおよび/または配列番号152のVHを含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号76を含む。

【0105】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号8のVLおよび/または配列番号121もしくは配列番号122のVHを含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号59または配列番号60を含む。

【0106】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号153のVLおよび/または配列番号142、配列番号146もしくは配列番号152のVHを含む。好ましくは前記バリエーションは、配列番号89、配列番号90または91を含む。

【0107】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号8のVLおよび/または配列番号121、配列番号122、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150もしくは配列番号152のVHを含む。

【0108】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号7のVHおよび/または配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号139もしくは配列番号153のVLを含む。

【0109】

1つの実施形態において、前記バリエーションは、配列番号34から95および配列番号154から成る群より選択される配列を含む。

【0110】

結合メンバーは、上述のVL配列および/またはVH配列のいずれかを含むことができる。単ドメイン形式を有する結合メンバー、例えば、ナノボディまたはVHHは、上述のVL配列またはVH配列のいずれか一方のみを含み、好ましくはVH配列を含む。多価結合メンバー、特に、 $F(ab')_2$ 断片、ビス-scFvまたはダイアボディ、好ましくは、二重特異性結合メンバーは、上述のVL配列の1つまたはそれより多くおよび/または上述のVH配列の1つまたはそれより多くを含み得る。

【0111】

本発明の抗体は、著しく安定である。本明細書において用いる場合、用語「安定性」は、長期インキュベーションおよび/または高温でのインキュベーション後に溶液中で単量体のままである抗体の生物物理学的特性を指す。不安定な抗体は、二量体化またはオリゴマー化およびさらには沈殿する傾向があり、その結果、有効期間を減少させ、薬学的応用にあまり適さなくなる。

【0112】

本明細書に提供する抗体および特に上記一価抗体断片は、1カ月間、37℃で、pH7.2のPBS中1mg/mlの濃度でインキュベートした後、少なくとも75%まで、好ましくは少なくとも80%、85%までおよび最も好ましくは93%まで単量体のままである。加えて、または代替的に、前記抗体は、1カ月間、室温で、pH7.2のPBS中1mg/mlの濃度でインキュベートした後、少なくとも90%まで、好ましくは少なくとも92%、94%、96%、98%までさらに好ましくは100%まで単量体のままである。

【0113】

単量体度は、例えば、SEC-HPLC（サイズ排除クロマトグラフィー - 高速液体クロマトグラフィー）によって決定することができる。そのような試験に適する移動相は、例えば、pH7.2のPBSである。単量体含有率は、タンパク質クロマトグラフィー中に測定されるUV280シグナルのピーク積分によって定量することができる。適するシ

10

20

30

40

50

ステムは、例えば、Chromleon（登録商標）6.5ソフトウェアによって制御されるDionex Summit HPLCであり、前記ソフトウェアは、その後のクロマトグラム分析およびピーク定量も可能にする。

【0114】

本明細書に開示する抗体および特に上記一価抗体断片は、より高濃度においても安定しており、例えば、それらは、2週間、室温および/または4℃で、pH 7.2のPBS中、約50 mg/mlの濃度でインキュベートした後、少なくとも50%まで、好ましくは少なくとも55%、60%、65%、70%までおよび最も好ましくは75%まで単量体のままである。

【0115】

さらに、本明細書に提供する抗体および特に上記一価抗体断片は、著しく可溶性であり、したがって、凝集体形成による沈殿がないまま高度に濃縮することができる。好ましくは、前記抗体を、沈殿することなく、pH 7.2のPBS中、20 mg/mlより高い濃度に、さらに好ましくは、pH 7.2のPBS中、30 mg/ml、40 mg/ml、50 mg/ml、60 mg/mlの濃度におよび最も好ましくは70 mg/mlに濃縮することができる。

【0116】

非常に好ましい実施形態において、前記抗体は、示差走査蛍光定量法(DSF)によって決定して約60℃、好ましくは65℃、70℃、71℃、72℃、73℃および最も好ましくは74℃の融解温度を有する。この方法は、疎水性環境においてのみ蛍光性である、ある一定の色素の特性に基づく。例えば、タンパク質アンフォールディングを、色素SYPRO（登録商標）オレンジの熱変性タンパク質への結合による蛍光の増加として検出することができる(NIESEN F.H.ら著、「The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability」、Nature Protocols 2007年、第2巻、2212-2221頁)。かくしてタンパク質の安定性を熱変性によって分析することができる。

【0117】

好ましくは、前記抗体は、5から10の範囲、好ましくは7から9の範囲、最も好ましくは約8.3の理論的等電点(pI)を有する。理論的pIは、例えば、EXPASYサーバー上のProtParamツール(<http://web.expasy.org/protparam/>)において利用可能; GASTEIGER E.ら著、「Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server」、The Proteomics Protocols Handbook、WALKER J.M.編集 Totowa: Humana Press Inc.、2005年、ISBN 9781588295934、571-607頁も参照されたい)を使用することにより算出することができる。

【0118】

前記抗体は、非ヒト種からのIL-1、例えば、これらに限定されないが、カニクイザルIL-1、アカゲザルIL-1、ラットIL-1、マウスIL-1、イヌIL-1、ネコIL-1、マーモセットIL-1、ブタIL-1および/またはモルモットIL-1と交差反応性であり得る。好ましくは、前記抗体は、カニクイザルIL-1（例えば、組換え生成される、およびSino Biological Inc.から入手可能、カタログ番号90010-CNAE）、アカゲザルIL-1（例えば、組換え生成される、およびR&D Systemsから入手可能、カタログ番号1318-RL/CF）および/またはラットIL-1（例えば、組換え生成される、およびPeprtechから入手可能、カタログ番号400-01B）と交差反応性である。

【0119】

好ましくは、インピボおよび/またはインピトロ設定で、本明細書に開示する抗体で中

10

20

30

40

50

和したとき、IL-1 の残留活性がない、すなわち、前記抗体がIL-1 の作用を完全に阻害する。本明細書において用いる場合の「残留活性がない」は、60 ng/ml の本明細書に記載する抗体の存在下で、同じ濃度の関連性のない特異性の抗体またはビクル対照と比較して、10 pg/ml のIL-1 によって誘導されたヒト線維芽細胞からのIL-6 放出に対応する2%未満の効力アッセイ（好ましくは、実施例3に記載のアッセイ）シグナルを指す。

【0120】

本発明は、ヒトIL-1 への結合について、本明細書に開示する抗体と競合する結合メンバーも提供する。

【0121】

本明細書において用いる場合、用語「競合すること」は、同じ標的への結合についての結合メンバー間の競合を指す。競合は、対象の結合メンバーが共通の抗原（ここではhIL-1 またはその断片）への本明細書に開示する抗体の特異的結合を防止または阻害または低減する競合結合アッセイによって、決定することができる。そのような競合結合アッセイは、当該技術分野において公知であり、そのようなアッセイとしては、これらに限定されないが、固相直接または間接放射免疫測定（RIA）および固相直接または間接酵素免疫測定（EIA）が挙げられる。典型的に、そのようなアッセイは、固体表面に結合した精製抗原、試験すべき結合メンバーおよび本明細書に記載の参照抗体の使用を伴う。（i）試験すべき結合メンバーの存在下で、固体表面に結合した参照抗体、または（ii）参照抗体の存在下で固体表面に結合した試験すべき結合メンバー、いずれかの量を決定することによって、競合阻害を測定する。競合結合メンバーは、（i）抗体と同じエピトープに結合することができ、（ii）オーバーラップしているエピトープに結合することができ、または（iii）同じ標的分子上の異なるエピトープに結合するが、その標的への抗体の結合を立体的に障害することができる。

【0122】

通常、競合結合メンバーが過剰に存在すると、それは、本明細書に記載の抗体のIL-1 への特異的結合を少なくとも40~45%、45~50%、50~55%、55~60%、60~65%、65~70%、70~75%、または75%もしくはそれより大きく低減する。好ましくは、抗体の結合を少なくとも80~85%、85~90%、90~95%、95~97%、または97%もしくはそれより大きく低減する。

【0123】

1つの実施形態において、前記競合結合メンバーは、少なくとも約1 pM、10 pM、100 pM、500 pM、1 nM、10 nMの親和性 K_D でhIL-1 に結合する。

【0124】

1つの実施形態において、前記結合メンバーは、一価、例えばscFv断片またはFab断片である。別の実施形態において、前記結合メンバーは、多価である。そのような多価分子は、二価（例えば、完全長免疫グロブリンまたはF(ab')₂断片）であることができ、または少なくとも3つの標的結合部位を含む。

【0125】

前記多価結合メンバーは、二重特異性抗体、例えば、ダイアボディ、一本鎖ダイアボディまたはタンデムscFv（例えば、KONTERMANN, R. E. 著、「Methods in Molecular Biology」、LO, B. 編集 Totowa, N. J.: Humana Press、2004年、ISBN 1588290921、227-242頁を参照されたい）であることができる。前記二重特異性抗体は、より短いリンカー、つまりscFvについて上に記載したものの、すなわち、配列番号14の基本モチーフの1から3リピートのみを有するものをうまく使用し得る（例えば、HOLLIGER, P. 著、「Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments」、PNAS 1993年、第90巻、第14号、6444-6448頁参照されたい）。別の実施形態において、前記多価結合メンバーは、トリアボディ、ミニボディまたはテトラボディである。

10

20

30

40

50

【0126】

本発明は、本明細書に記載する抗体を含むTボディも提供する。Tボディは、抗体の抗原認識とT細胞受容体複合体のシグナルおよびエフェクター特性とを併せ持つ免疫グロブリンT細胞受容体(cIgTCR)である。そのような構築物において、抗体は、好ましくは抗体断片、例えば、Fv、Fab、scFvまたはscFv-Fc、最も好ましくはscFvである。Tボディの一般設計およびそれらの適用のさらなる論考については、例えば、SCHIRRMANN, T. および Pecher, G. 著、「Handbook of Therapeutic Antibodies」、DUEBEL, S. 編集 Weinheim: Wiley-VCH、2009年、ISBN 3527314539、533-561頁を参照されたい。

10

【0127】

本発明は、

【数1】

$$\text{式: } K = \frac{\text{一価の効力 (mol/l)} \times \text{分子量 (g/mol)}}{\text{結合部位の数}}$$

によって決定されるような、結合メンバーあたりの結合部位の数への正規化後にある一定の分子量(g/mol)で(例えば、細胞ベースのアッセイ(IC₅₀)において親和性(K_D)または生物学的効力としてmol/lの単位で測定される)一価の効力を有する、IL-1に対するナイーブ(すなわち、親和性または効力増加について操作されていない)結合メンバーをさらに提供する。

20

【0128】

上に記載したように、ピコモル濃度範囲の効力値を有する一価抗体断片は特別であり、日常的に得られない。効力は、多くの場合、結合メンバーのサイズと相関する：ピコモル濃度範囲の高い効力を完全長免疫グロブリンから得ることができるが、非常に小さい抗体断片、例えばナノボディもしくは最小認識単位、または小さい非抗体スカフォールド、例えばアフィリンは、多くの場合、より少ない効力値、すなわちナノモル濃度範囲の効力値を示す。見たところ、本明細書に記載のscFvによって提供される前記関数Kには最小値がある：結合メンバーが小さいほど、およびその一価の効力または親和性が高いほど、および1分子あたりの結合部位が多いほど、Kは小さくなる。例えば、本明細書に記載のscFvについて、Kの下限は約50ng/lであるのに対して、Kの上限は約12,500ng/lであり；それぞれの完全長免疫グロブリンについて、下限は約150ng/lであり、K上限は約37,500ng/lであり；本明細書に記載のscFvより小さい分子量を有する他の結合メンバーについて、K値は、K > 500,000ng/lである。好ましい実施形態において、K値は、約50ng/l、100ng/l、200ng/l、500ng/l、750ng/l、1,000ng/l、1,250ng/l、1,500ng/l、1,750ng/l、2,000ng/l、2,250ng/l、または2,500ng/lである。

30

核酸、ベクター、宿主細胞および生成方法

【0129】

本明細書に記載する抗体は、単一の核酸または2つまたはそれより多くの核酸、例えば各々が少なくとも1つの可変領域をコードする核酸、によってコードされる。抗体またはその部分の配列が分かれば、ポリペプチド配列をコードするcDNAを、当該技術分野において周知の方法によって、例えば、遺伝子合成によって生成することができる。これらのcDNAを、標準的なクローニングおよび変異誘発法によって、適するベクター、例えば、発現ベクターまたはクローニングベクターにクローニングすることができる。必要に応じて、可変軽鎖は、その抗体の可変重鎖とは異なる核酸によってコードされる。さらに、追加の配列、例えば、タグ(例えば、Hisタグ)；Fabまたは完全長免疫グロブリンの生成のための定常ドメイン；リンカー；融合構築物または二重特異性分子を生成するための第二の結合特異性または別の機能性ポリペプチド、例えば酵素、のコード配列を、

40

50

遺伝子構築物に含めてもよい。

【0130】

選ばれるクローニング戦略に基づき、遺伝子構築物は、1つまたはそれより多くの追加の残基をN末端に有する抗体を産生してもよいし、またはC末端に有する抗体を産生してもよい。例えば、開始コドンに由来するN末端メチオニン、または追加のアラニンが、翻訳後に切除されてしまわない限り、発現されるポリペプチド中に存在し得る。したがって、本明細書に開示する抗体は、開示する配列から成るのではなく、開示する配列を含むことを理解されたい。

【0131】

1つの実施形態において、本発明は、少なくとも300の核酸塩基、さらに好ましくは少なくとも350、400、450または500の核酸塩基を含み、かつ、配列番号17との少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する、核酸配列を提供する。非常に好ましい実施形態において、前記核酸配列は、配列番号17である。

10

【0132】

加えて、または代替的に、本発明は、高ストリンジェンシー条件下で配列番号17の核酸とハイブリダイズする、少なくとも300の核酸塩基、さらに好ましくは少なくとも350、400、450または500の核酸塩基を含む核酸配列を提供する。

【0133】

標準的なクローニング、変異誘発および分子生物学技法の基本プロトコルは、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (GREEN, M. および Sambrook 著、J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual、第4版、Cold Spring Harbor Laboratory、2012年、ISBN 1936113422)に記載されている。

20

【0134】

遺伝子構築物の発現のための適切な宿主細胞は、原核性または真核性であることができる。適する原核宿主細胞は、グラム陰性またはグラム陽性であり、および *Escherichia*、*Erwinina*、*Enterobacter*、*Klebsiella*、*Pseudomonas* または *Bacillus* ファミリーの種を含む。大腸菌 (*Escherichia coli*)、特に、大腸菌 BL21 (DE3) 株 (Life Technologies (商標)、カタログ番号 C6000-03) および Origami (商標) 2 (DE3) 株 (Novagen、カタログ番号 71345) は、非常に好ましい。

30

【0135】

翻訳後修飾、例えばグリコシル化またはリン酸化が望まれる場合、真核宿主細胞が好ましい。例えば、真核微生物、例えば、一般に用いられている *Saccharomyces cerevisiae* または *Pichia pastoris* 株は、宿主細胞として役立つことができる。宿主細胞としては、植物細胞または動物細胞、特に、昆虫細胞または哺乳動物細胞も挙げることができる。適する哺乳動物細胞としては、これらに限定されないが、チャニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、ヒト胎児腎細胞 (HEK)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) または NS0 骨髄腫細胞が挙げられる。

40

【0136】

抗体を、適する宿主細胞における発現によって生成することができる。例えば、上記発現ベクターを標準的技法、例えば、エレクトロポレーションまたは化学的形質転換によって宿主細胞に導入する。その後、形質転換細胞を、組換えタンパク質発現に妥当な条件下で、典型的には、プロモーターの誘導、形質転換体の選択または対象のコード配列の増幅のために必要に応じて改変された適切な栄養培地において、培養する。抗体を培養物から回収し、必要に応じて、当該技術分野における標準的技法を用いて精製する。培地および培養条件、例えば温度または酸素供給量、を最適化することによって、組換えタンパク質の収率を改善し得る。原核生物の場合、抗体を周縁質において、細胞内に封入体として生

50

成することができ、または培地に分泌することができる。回収し次第、当該技術分野において周知の方法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用、混合モードクロマトグラフィーおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーを用いて、タンパク質を精製することができる。

【0137】

1つの実施形態では、抗体を無細胞系において生成する。これは、典型的に、本明細書に記載するタンパク質をコードする核酸産物テンプレート、例えば、プラスミドDNAまたはPCR産物テンプレートのインビトロ転写、それに続くインビトロ翻訳を含む。例えば、成長中の細胞からの粗溶解産物を使用し、それによって必要な酵素ならびに細胞のタンパク質合成機構も得る。必要な構築ブロック (building block)、例えば、アミノ酸または核酸塩基、ならびにエネルギー送達分子およびその他を外因的に供給することができる。無細胞発現系は、例えば、溶解ウサギ網状赤血球 (例えば、Rabbit Reticulocyte Lysate System、Promega、カタログ番号L4540)、HeLa細胞 (例えば、1-Step Human In Vitro Translation Kit、Thermo Scientific、カタログ番号88881)、昆虫細胞 (例えば、EasyXpress Insect Kit II、Qiagen、カタログ番号32561)、コムギ胚芽 (例えば、Wheat Germ Extract、Promega、カタログ番号L4380)、または大腸菌細胞 (例えば、PURExpress (登録商標) In Vitro Protein Synthesis Kit、NEB、カタログ番号E6800S) に基づくことができる。また、ジスルフィド結合生成改善のために最適化された無細胞抗体発現系を生成に使用することができる。市販のキットとしては、昆虫細胞溶解産物 (例えば、EasyXpress Disulfide Insect Kit、Qiagen、カタログ番号32582) または大腸菌細胞溶解産物 (例えば、EasyXpress Disulfide E. coli Kit、Qiagen、カタログ番号32572) が挙げられる。無細胞タンパク質合成には、例えば、迅速である、高生成収率を達成する、反応条件の容易な改変を可能にする、副産物を低度にしか形成しないまたはさらには全く形成しないという利点がある。無細胞タンパク質合成は、純生物学的または化学的生成系では行うことができない生物学的および/または化学的工程を含み得る。例えば、非天然または化学修飾アミノ酸をタンパク質の所望の位置に組み込むことができる。scFv-毒素融合タンパク質は、無細胞系での生成に成功している (NICHOLLS, P. J. 著、「Characterization of single-chain antibody (scFv)-toxin fusion proteins produced in vitro in rabbit reticulocyte lysate」、Journal of Biological Chemistry 1993年、第268巻、5302-5308頁)。したがって、1つの実施形態では、本明細書に記載する抗体、上記結合メンバーまたは上記Tボディを生成する方法を提供し、この方法は、(a) 無細胞系を提供する工程、(b) 本明細書に記載する抗体、上記結合メンバーまたは上記Tボディをコードする核酸産物テンプレートを提供する工程、(c) 前記核酸産物テンプレートの転写および翻訳を可能にする工程、(d) 回収する工程、および必要に応じて (e) 前記抗体、前記結合メンバーまたは前記Tボディをそれぞれ精製する工程を含む。

【0138】

加えて、または代替的に、本明細書に記載する抗体を生成する方法は、少なくとも1つの化学合成工程を含む。例えば、前記方法は、完全に化学的であってもよい。別の実施形態において、上に記載した細胞ベースまたは無細胞生成系は、そのような少なくとも1つの化学合成工程を含む。

【0139】

好ましい実施形態では、本明細書に記載する抗体を、大腸菌における細胞内発現のための発現ベクターを使用して細胞ベースの系で生成する。発現すると、ポリペプチドが細胞内で封入体として産生され、それらの封入体をさらなる細胞粒子から分離し、その後、グ

10

20

30

40

50

アニジン塩酸塩 (GndHCl) などの変性剤で可溶化し、当業者には周知の再生手順によってリフォールディングさせる。

【0140】

上に記載した核酸、ベクター、宿主細胞および生成方法が、本明細書に記載する結合メンバーにも（それらがタンパク質である限り）および/またはTボディにも適用されることを理解されたい。

【0141】

化学的および/または生物学的改変

1つの態様では、本発明の抗体を化学的におよび/もしくは生物学的に改変する。そのような改変は、グリコシル化、PEG化、HES化、アルブミン融合技術、PAS化、色素および/または放射性同位元素での標識付け、酵素および/もしくは毒素とのコンジュゲーション、リン酸化、ヒドロキシル化ならびに/または硫酸化を含み得るが、これらに限定されない。同様に、上に記載した任意の結合メンバー、核酸配列、ベクターおよび/または宿主細胞をしかるべく改変することができる。

【0142】

タンパク質の薬力学もしくは水溶性を最適化するために、またはその副作用を低下させるために、化学的および/または生物学的改変を行ってもよい。例えば、PEG化、PAS化および/またはHES化を利用して腎クリアランスを遅速させ、それによって抗体の血漿半減期の時間を増加させてもよい。加えて、または代替的に、改変により、タンパク質に異なる官能基が、例えば、より効率的に癌細胞と戦うための毒素、または診断目的のための検出分子が付加されることもある。

【0143】

グリコシル化とは、タンパク質に炭水化物を連結させるプロセスをいう。生物システムにおいて、このプロセスは、翻訳と同時および/または翻訳後の修飾の一形態として、細胞内で酵素的に行われる。タンパク質、ここでは抗体、を化学的にグリコシル化することもできる。典型的に、グリコシル化は、(i)アスパラギンもしくはアルギニン側鎖の窒素へのN結合型であるか；(ii)セリン、トレオニン、チロシン、ヒドロキシリジンもしくはヒドロキシプロリン側鎖のヒドロキシ酸素へのO結合型であるか；(iii)キシロース、フコース、マンノースおよびN-アセチルグルコサミンのホスホセリンへの連結を含むか；または(iv)特異的認識配列内で見いだされるトリプトファン残基にマンノース糖が付加されるC-マンノシル化の形態であるが、これらに限定されない。グリコシル化パターンは、例えば、適切な細胞系統、培養培地、タンパク質工学製造モードおよびプロセス戦略を選ぶことによって制御することができる (HOSSLER, P. 著、「Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture」、Glycobiology 2009年、第19巻、第9号、936-949頁)。

【0144】

グリコシル化パターンを制御または改変するためのタンパク質工学は、1つまたはそれより多くのグリコシル化部位の欠失および/または付加を伴うことがある。抗体のアミノ酸配列に対応する酵素認識配列を導入することにより、または上に列挙したアミノ酸残基のうちの一つもしくはそれより多くを付加または置換することにより、グリコシル化部位の作製を便利に達成することができる。

【0145】

抗体をPEG化することが望ましいこともある。PEG化は、タンパク質の薬力学的特性および薬物動態特性を改変することがある。適切な分子量のポリエチレングリコール (PEG) をタンパク質骨格に共有結合で連結させる (例えば、PASUT, G. および Veronese, F. 著、「State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research」、Journal of Controlled Release 2012年、第161巻、第2号、461-472頁

10

20

30

40

50

を参照されたい)。PEG化は、PEG化されたタンパク質を免疫系から守ることにより免疫原性をさらに低減することがあり、ならびに/またはその薬物動態を、例えば、抗体のインビボ安定を増加させること、それをタンパク質分解性分解から保護すること、その半減期の時間を延長すること、およびその生体内分布を改変することにより、改変することがある。

【0146】

同様の効果がPEGミメティックによって、例えば、抗体をHES化またはPAS化することによって達成されることもある。HES化は、ヒドロキシエチルデンブレン(「HES」)誘導体を利用するが、PAS化中に抗体は、アミノ酸プロリン、アラニンおよびセリンで構成されている立体配座無秩序化ポリペプチド配列に結合されることとなる。前記PEGミメティックおよび関連化合物は、例えば、BINDER, U.およびSkerra, A.著、「Half-Life Extension of Therapeutic Proteins via Genetic Fusion to Recombinant PEG Mimetics, in Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives」、KONTERMANN, R.編集、Weinheim, Germany: Wiley-VCH、2012年、ISBN: 9783527328499、63-81頁に記載されている。

10

【0147】

前記抗体は、エピトープおよび特にサルベージ受容体結合エピトープを含み得る。そのようなサルベージ受容体結合エピトープは、典型的に、IgG分子(例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4)のFc領域のエピトープを指し、前記分子のインビボ半減期を増加させる効果を有する。

20

【0148】

加えて、または代替的に、前記抗体を、標的結合後の補助機能の原因とされる第二の部分で標識するか、または前記第二の部分にコンジュゲーションする。前記第二の部分は、例えば、追加の免疫エフェクター機能を有することがあり、薬物標的化に有効であることがあり、または検出に有用であることがある。前記第二の部分は、例えば、当該技術分野において公知の方法を用いて前記抗体に化学的に結合または遺伝子的に融合させることができる。

30

【0149】

第二の部分としての機能を果たし得る分子としては、放射性同位元素(例えば、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{125}I)とも呼ばれる、放射性核種;アポ酵素;酵素(例えば、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアンジオゲニン);補因子;ペプチド(例えば、HISタグ);タンパク質(レクチンを含む);炭水化物(マンノース-6-リン酸タグを含む);フルオロフォア(フルオレセインイソチオシアネート(FITC));フィコエリトリン;緑色/青色/赤色および他の蛍光タンパク質;アロフィコシアニン(APC)を含む);発色団;ビタミン(ビオチンを含む);キレート剤;代謝拮抗物質(例えば、メトトレキサート);リボソーム;タキソール、グラミシジンDもしくはコルヒチンなどの細胞傷害性薬物を含む毒素;または放射性毒素が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0150】

標識抗体は、インビトロおよびインビボでの検出または診断の目的のために特に有用である。例えば、適する放射性同位元素、酵素、フルオロフォアまたは発色団で標識された抗体を、それぞれ、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)またはフローサイトメトリーベースの単一細胞分析(例えば、FACS分析)によって検出することができる。同様に、本明細書に開示する核酸および/またはベクターを、例えば、それらの標識断片をプローブとしてハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用して、検出または診断の目的のために使用することができる。標識付けプロトコルは、例えば、JOHNSON, I.およびSpence, M., T.Z. Molecula

50

r Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Life Technologies, 2010年、ISBN: 0982927916において見い出され得る。

【0151】

組成物

本発明の抗体、任意の結合メンバー、本明細書に開示する核酸配列またはベクターを、適するキャリア、賦形剤または希釈剤をさらに含む組成物において提供することができる。本明細書に記載する抗体を含む組成物は、非常に好ましい。

【0152】

そのような組成物は、例えば、診断用組成物、化粧品組成物または医薬組成物であることができる。治療または化粧品目的では、前記組成物は、医薬キャリア、賦形剤または希釈剤を含む医薬組成物であり、すなわち、用いられる投薬量および濃度で毒性でない。

【0153】

適する「キャリア」、「賦形剤」または「希釈剤」としては、(i)緩衝剤、例えば、リン酸塩、クエン酸塩もしくは他の有機酸；(ii)抗酸化物質、例えば、アスコルビン酸およびトコフェロール；(iii)保存薬、例えば、3-ペンタノール、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、アルキルパラベン、カテコールもしくはシクロヘキサノール；(iv)アミノ酸、例えば、ヒスチジン、アルギニンなど；(v)ペプチド、好ましくは、10残基以下のペプチド、例えばポリリジン；(vi)タンパク質、例えば、ウシもしくはヒト血清アルブミン；(vii)親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；(viii)単糖類、二糖類、多糖類および/もしくは他の炭水化物（グルコース、マンノース、スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、アミノデキストランもしくはポリアミドアミンを含む）；(ix)キレート剤、例えば、EDTA；(x)塩形成性イオン、例えば、ナトリウム；(xi)金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/または(xii)イオン性および非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）もしくはポリエチレングリコール（PEG）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0154】

前記例示的化合物の多くは、異なる機能を有し、例えば、キャリアとしておよび希釈剤として作用することがある。前記組成物が、各キャリア、希釈剤または賦形剤のうちの1つより多くを含み得ることも理解されたい。

前記抗体、結合メンバー、核酸配列またはベクターを、固体支持材、例えばビーズおよび微粒子上に備えさせてもよい。典型的には、前記分子を、そのようなキャリアに、共有結合により（必要に応じて、リンカーを伴う）、非共有結合的に、または混合により結合させる。前記ビーズおよび微粒子は、例えば、デンプン、セルロース、ポリアクリレート、ポリラクテートポリグリコレート（polylactate polyglycolate）、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）、ラテックスまたはデキストランを含み得る。

【0155】

治療的応用

本明細書に記載する分子、特に、抗体、結合メンバー、核酸またはベクターは、医薬として有用である。典型的に、かかる医薬は、治療有効量の本明細書に提供する分子を含む。したがって、前記分子を、IL-1 関連障害の処置に有用な医薬の生成のために使用することができる。

【0156】

1つの態様では、IL-1 関連障害を処置する方法を提供し、この方法は、薬学的に有効な量の本明細書に記載する分子、特に抗体を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。1つの実施形態では、そのような薬学的に有効な量の抗体を含む上記医薬組成物（すなわち、医薬）を前記被験体に投与する。

【0157】

10

20

30

40

50

本明細書において用いる場合の用語「処置する」または「処置」は、IL-1 関連障害を予防する、治療する、前記障害の発症および/または進行を遅らせる、前記障害の重症度を低下させる、前記障害の1つまたはそれより多くの症状を安定させる、調節する(modulate)、治療するまたは改善するための、それを必要とする被験体への薬学的に有効な量の本発明の抗体、結合メンバー、核酸、ベクターまたは宿主細胞の投与を指す。典型的に、前記抗体、結合メンバー、核酸、ベクターまたは宿主細胞を、本明細書において前に記載したものを含む医薬組成物において提供する。

【0158】

「治療有効量」は、適用される投薬レジメンで、所望の治療効果をもたらす量、すなわち、上で定義の処置目標への到達をもたらす量を指す。投薬量は、患者および臨床的因子(例えば、年齢、体重、性別、患者の病歴、障害の重症度および/または処置に対する応答)、処置する障害の性質、投与する特定の組成物、投与経路ならびに他の因子を含む、様々な因子に依存する。

10

【0159】

そのような処置を必要とする被験体は、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ウマ、ウシ、ニワトリ、モルモットもしくはブタであることができる。典型的に、前記被験体は、IL-1 関連障害と診断されるか、またはそのような障害を獲得し得る。

【0160】

IL-1 のアンタゴニストが治療効果を示したIL-1 関連障害の例としては、増殖性糖尿病性網膜症、通風性関節炎、シュニッツラー症候群、全身性若年性特発性関節炎、関節リウマチ、急性通風性関節炎、慢性通風性関節炎、蕁麻疹、脈管炎、1型糖尿病、2型糖尿病、強直性脊椎炎、再発性多巣性骨髄炎、再発性多発性軟骨炎、クリオピリン(cryopyrin)関連周期性症候群(CAPS)、ベーチェット病、家族性地中海熱、慢性閉塞性肺疾患、リウマチ性多発性筋痛症(polymyalgia rheumatic)、NALP3-変異、壊疽性膿皮症、慢性特発性蕁麻疹(chronic idiopathic urticarial)、変形性関節症、滲出型加齢性黄斑変性、ドライアイ症候群、膿疱性乾癬、滑膜炎-ざ瘡-膿疱症-骨化過剰症-骨炎症候群、マクロファージ活性化症候群、周期性発熱・腺炎・咽頭炎・アフタ性潰瘍症候群、成人発症ステイル病、メパロン酸キナーゼ欠損症、アテローム性動脈硬化症、TNF受容体関連周期性症候群(TRAPS)、尋常性ざ瘡および/または反対型ざ瘡が挙げられるがこれらに限定されない。

20

30

【0161】

用語「CAPS」またはクリオピリン関連周期性症候群は、家族性寒冷自己炎症性症候群(FCAS)、マックル・ウェルズ症候群(MWS)および新生児期発症多臓器性炎症性疾患(慢性乳児神経皮膚関節(CINCA)症候群としても公知)の各々を含むと解されたい。

【0162】

前記医薬組成物を様々な投与経路によって適用してよい。投与は、例えば、限定されないが、非経口的に、例えば、筋肉内に、皮下に、ポラスとしてもしくは持続注入により静脈内に、関節内に、滑液包内に、脳内に、脳脊髄内に、髄腔内に、硬膜外に、または腹腔内に；経口的に；直腸に；局所に；尿生殖器に；例えば、皮膚もしくは眼に、表面に(topically)；硝子体内に；静脈内に；眼内に；耳に；鼻腔内に；吸入により；皮膚的に、例えば、皮内に、皮下にもしくは経皮的に；舌下に；例えば、口腔に(buccally)行うことができる。表面、直腸、局所、鼻腔内、静脈内および/または皮内の投与経路が好ましい。

40

【0163】

本発明の抗体、結合メンバー、核酸配列、ベクターまたは宿主細胞を、1つまたはそれより多くのさらなる治療有効化合物と併用することができる。前記化合物は、IL-1受容体を介するシグナル伝達を中断させることができることもあり、または代替的に、1つ

50

もしくはそれより多くの異なる標的、例えば、炎症応答の他の媒介因子などを阻害することもある。そのような化合物（単数または複数）を同時にまたは逐次的に投与することができる。

【0164】

治療的応用のために、前記抗体を放射性標識してもよく、または毒素に結合してもよく、または上記の別のエフェクター機能に結合してもよい。

【0165】

診断的応用および/または検出目的

本発明の抗体をインビボおよび/またはインビトロでの検出または診断の目的のために使用してもよい。例えば、特定の細胞または組織における発現を検出するために抗体を関与させる広範なイムノアッセイが当業者には公知である。同様に、前に記載した任意の結合メンバー、核酸配列、ベクターおよび/または宿主細胞を、このセクションで詳述するようにしかるべく使用することができる。

10

【0166】

そのような応用のために、本明細書に開示する抗体、結合メンバー、核酸配列、ベクターまたは宿主細胞を標識してもよいし、または標識しなくてもよい。例えば、未標識抗体を使用し、本明細書に記載する抗体上のエピトープを認識する二次抗体によって検出してもよい。

【0167】

別の実施形態では、前記抗体、結合メンバー、核酸配列、ベクターおよび/または宿主細胞を、ディテクター物質（単数または複数）によって認識され得る1つまたはそれより多くの物質とコンジュゲーションさせる。例えば、抗体を、ストレプトアビジンによって検出することができるビオチンとコンジュゲーションさせる。同様に、本明細書に開示する核酸および/またはベクターを、例えば、それらの標識された断片をプローブとしてハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用することにより、検出または診断の目的のために使用することができる。

20

【0168】

一定の実施形態において、本明細書に提供するいずれの分子も、特に抗体は、試料（好ましくは、生体試料）中のIL-1（好ましくは、完全長IL-1、その断片および/またはその前駆体を含む）の存在の検出に有用である。用語「検出すること」は、量的および/または定性的な検出を包含する。ある一定の実施形態において、生体試料は、ヒト患者からの細胞または組織を含む。生体試料の非限定的な例としては、血液、尿、脳脊髄液、生検材料、リンパおよび/または非血液組織が挙げられる。

30

【0169】

一定の実施形態において、前記方法は、生体試料と本明細書に記載の抗IL-1抗体とを、IL-1（存在する場合）への前記抗体の結合を可能にする条件下で接触させるステップ、および前記抗体とIL-1との複合体が形成されたかどうかを検出するステップを含む。そのような方法は、インビトロ法であってもよいし、またはインビボ法であってもよい。1つの実施形態では、抗IL-1抗体を使用して、本明細書に記載する抗体での治療に適格な被験体を選択し、例えば、その場合、IL-1が患者選択のためのバイオマーカーである。同様に、そのような方法は、抗体の代わりに、上記結合メンバーまたは本明細書に記載するTポディの使用を含み得る。

40

【0170】

別の態様では、例えば、肌の審美的外観を向上させるために、前記抗体を化粧品への応用に使用する。

【0171】

さらなる態様では、前記抗体、試薬のパッケージ化された組み合わせとともに検出または診断アッセイを行うための説明書を含むキットを提供する。典型的に、前記試薬は、通常は凍結乾燥された、所定の量の乾燥粉末であって、溶解後に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む粉末の状態を提供される。他の添加剤、例えば、安定剤および

50

／または緩衝剤も含み得る。前記抗体を酵素で標識する場合、前記キットは、典型的に、相応の基質および補因子を含む。同様に、前に記載した任意の結合メンバー、核酸配列、ベクターおよび／または宿主細胞を、このセクションで詳述するようにしかるべく使用することができる。

【 0 1 7 2 】

配列表

本明細書中に開示される配列は以下のとおりである：

【 0 1 7 3 】

配列番号1 - VH CDR1

FSLSSAAMA

10

【 0 1 7 4 】

配列番号2 - VH CDR2

I I YDSASTYYASWAKG

【 0 1 7 5 】

配列番号3 - VH CDR3

ERA I FSGDFVL

【 0 1 7 6 】

配列番号4 - VL CDR1

QASQSIDNWLS

【 0 1 7 7 】

配列番号5 - VL CDR2

RASTLAS

20

【 0 1 7 8 】

配列番号6 - VL CDR3

QNTGGGVSIA

【 0 1 7 9 】

配列番号7 - VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDFVLWGQGLTLVTSS

【 0 1 8 0 】

配列番号8 - VL

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCQASQSIDNWLSWYQQKPKGKAPKLL I YRASTLASGVPSPRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLG

30

【 0 1 8 1 】

配列番号9 - リンカー

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

【 0 1 8 2 】

配列番号10 - DLX2323

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCQASQSIDNWLSWYQQKPKGKAPKLL I YRASTLASGVPSPRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLS
AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDFVLWGQ
GTLVTSS

40

【 0 1 8 3 】

配列番号11 - VH CDR1のCDRバリエント

FSLSXXAMA

【 0 1 8 4 】

配列番号12 - VH CDR2のCDRバリエント

I I XSASTXYASWAKG

【 0 1 8 5 】

配列番号13 - VH CDR3のCDRバリエント

50

配列番号27 - rFW1.4(V2)のFR-H2
WVRQAPGKGLEWVG

【0200】

配列番号28 - rFW1.4(V2)のFR-H3
RFTISKDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR

【0201】

配列番号29 - rFW1.4(V2)のFR-H4
WGQGTLLVTVSS

【0202】

配列番号30 - rFW1.4-SSTのFR-H1
EVQLVESGGGSLVQPGGSLRLSCTASG

10

【0203】

配列番号31 - rFW1.4-SSTのFR-H2
WVRQAPGKGLEWVG

【0204】

配列番号32 - rFW1.4-SSTのFR-H3
RFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTASYCAR

【0205】

配列番号33 - rFW1.4-SSTのFR-H4
WGQGTLLVTVSS

20

【0206】

配列番号34 - CDR-L1_D32X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSI XNWL SWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPD
DDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAI FSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

【0207】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グル
タミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロ
イシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)
、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)
、バリン(V)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る群より選択さ
れる。

30

【0208】

配列番号35 - CDR-L1_N33X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDXNWL SWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPD
DDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAI FSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

【0209】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グル
タミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロ
イシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)
、プロリン(P)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)
、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

40

【0210】

配列番号36 - CDR-L1_W40X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNXLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPD
DDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAI FSGDFVLWGQ

50

GTLVTVSS

【 0 2 1 1 】

好ましくは、Xは、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

【 0 2 1 2 】

配列番号37 - CDR-L2_R58X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYXASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNTGGGVSIFAGQGKTLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

10

【 0 2 1 3 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

【 0 2 1 4 】

配列番号38 - CDR-L2_T69X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASXLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNTGGGVSIFAGQGKTLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

20

【 0 2 1 5 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

30

【 0 2 1 6 】

配列番号39 - CDR-L3_T109X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNXGGGVSIFAGQGKTLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

【 0 2 1 7 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、イソロイシン（I）、アスパラギン（N）、セリン（S）、トレオニン（T）およびバリン（V）から成る群より選択される。

40

【 0 2 1 8 】

配列番号40 - CDR-L3_G111X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNTGXGVSIFAGQGKTLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

【 0 2 1 9 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、グリシン（G）、プロリン（P）およびセリン（S）から成る群より選択される。

【 0 2 2 0 】

50

配列番号41 - CDR-L3_G112X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVII TCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGXVSI AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGII YDSASTYYASWAKGRFTI SRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

【0221】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グル
タミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロ
イシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）
、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（
T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択さ
れる。

10

【0222】

配列番号42 - CDR-L3_V135X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVII TCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGXSI AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGII YDSASTYYASWAKGRFTI SRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

【0223】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グル
タミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロ
イシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）
、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（
T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択さ
れる。

20

【0224】

配列番号43 - CDR-L3_S136X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVII TCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGVXI AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGII YDSASTYYASWAKGRFTI SRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

30

【0225】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グル
タミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロ
イシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P
）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（
V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

【0226】

配列番号44 - CDR-H1_S33X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVII TCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGVSI AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSX
AAMAWVRQAPGKGLEWVGII YDSASTYYASWAKGRFTI SRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

40

【0227】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グル
タミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロ
イシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）
、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（
T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択さ
れる。

50

【 0 2 2 8 】

配列番号45 - CDR-H1_A39X

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

【 0 2 2 9 】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グル
タミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロ
イシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)
、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V
)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

10

【 0 2 3 0 】

配列番号46 - CDR-H2_Y59X

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

【 0 2 3 1 】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、グリシン(G)、メチオニン
(M)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

20

【 0 2 3 2 】

配列番号47 - CDR-H2_D60X

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

【 0 2 3 3 】

好ましくは、Xは、アスパラギン酸(D)、アスパラギン(N)およびプロリン(P)
から成る群より選択される。

30

【 0 2 3 4 】

配列番号48 - CDR-H2_Y69X

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

【 0 2 3 5 】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グ
リシン(G)、フェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジ
ン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、プロリン(P)、アスパラギン(N)、
セリン(S)、トレオニン(T)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る
群より選択される。

40

【 0 2 3 6 】

配列番号49 - CDR-H3_R110X

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

【 0 2 3 7 】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グル

50

タミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W) およびチロシン (Y) から成る群より選択される。

【 0 2 3 8 】

配列番号50 - CDR-H3_A111X

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

10

【 0 2 3 9 】

好ましくは、Xは、アラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (K)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W) およびチロシン (Y) から成る群より選択される。

【 0 2 4 0 】

配列番号51 - CDR-H3_I112X

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

20

【 0 2 4 1 】

好ましくは、Xは、アラニン (A)、システイン (C)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、セリン (S)、トレオニン (T)、バリン (V) およびチロシン (Y) から成る群より選択される。

【 0 2 4 2 】

配列番号52 - CDR-H3_F113X

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

30

【 0 2 4 3 】

好ましくは、Xは、フェニルアラニン (F) およびイソロイシン (I) から成る群より選択される。

【 0 2 4 4 】

配列番号53 - CDR-H3_S114X

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

40

【 0 2 4 5 】

好ましくは、Xは、アラニン (A)、システイン (C)、グルタミン酸 (E)、グリシン (G)、セリン (S)、トレオニン (T) およびバリン (V) から成る群より選択される。

【 0 2 4 6 】

配列番号54 - CDR-H3_G115X

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

50

AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSXDFVLWGQ
GTLVTVSS

【 0 2 4 7 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、グリシン（G）、メチオニン（M）およびアスパラギン（N）から成る群より選択される。

【 0 2 4 8 】

配列番号55 - CDR-H3_D135X

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGXFVLWGQ
GTLVTVSS

10

【 0 2 4 9 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、ヒスチジン（H）、アスパラギン（N）、セリン（S）およびトレオニン（T）から成る群より選択される。

【 0 2 5 0 】

配列番号56 - CDR-H3_F136X

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDXVLWGQ
GTLVTVSS

20

【 0 2 5 1 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

【 0 2 5 2 】

配列番号57 - CDR-H3_V137X

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDFXLWGQ
GTLVTVSS

30

【 0 2 5 3 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

【 0 2 5 4 】

配列番号58 - CDR-H3_L138X

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDFVXWGQ
GTLVTVSS

40

【 0 2 5 5 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（

50

T)、バリン(V)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

【0256】

配列番号59 - DLX2464

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERQIFSGDMAGWGQ
GTLVTVSS

【0257】

配列番号60 - DLX2465

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERNIFSGDMDLWGQ
GTLVTVSS

10

【0258】

配列番号61 - DLX2466

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGKYLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNAAGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
DAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERNIFSGDMAGWGQ
GTLVTVSS

20

【0259】

配列番号62 - DLX2467

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIHNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGSSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSR
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERMIFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

【0260】

配列番号63 - DLX2468

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGNYLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNAAGGTSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
SAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERNIFSGDMVLWGQ
GTLVTVSS

30

【0261】

配列番号64 - DLX2475

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIDKWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGVHIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
YAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFKLWGQ
GTLVTVSS

【0262】

配列番号65 - DLX2476

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERDIFSGDFVWGQ
GTLVTVSS

40

【0263】

配列番号66 - DLX2480

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGINIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSD
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARERQIFSGDFVLWGQ
GTLVTVSS

50

【 0 2 6 4 】

配列番号67 - DLX2543

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

【 0 2 6 5 】

配列番号68 - DLX2529

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

10

【 0 2 6 6 】

配列番号69 - DLX2547

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

【 0 2 6 7 】

配列番号70 - DLX2528

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

20

【 0 2 6 8 】

配列番号71 - DLX2585

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

30

【 0 2 6 9 】

配列番号72 - DLX2545

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

【 0 2 7 0 】

配列番号73 - DLX2531

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

40

【 0 2 7 1 】

配列番号74 - DLX2586

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

【 0 2 7 2 】

配列番号75 - DLX2530

50

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSD
AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTFYASWAKGRFT I SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARERN I FSGDMALWGQ
GTTVTVSS

【 0 2 7 3 】

配列番号76 - DLX2548

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS
YAMSWVRQAPGKGLEW I G I I YDSASTYYASWAKGRFT I SKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQ I FSGDMDGWGQ
GTTVTVSS

10

【 0 2 7 4 】

配列番号77 - DLX2676

E I VMTQSPSTLSASVGDRT I TCQASQS I GNWLAWYQQKPGKAPKLL I YQASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNAAGGATT I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSD
AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTFYASWAKGRFT I SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARERN I FSGDMALWGQ
GTTVTVSS

【 0 2 7 5 】

配列番号78 - DLX2677

E I VMTQSPSTLSASVGDRT I TCQASQS I GNWLAWYQQKPGKAPKLL I YQASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNAAGGATT I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSN
SAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCARERA I FSGDFALWGQ
GTLVTVSS

20

【 0 2 7 6 】

配列番号79 - DLX2678

E I VMTQSPSTLSASVGDRT I TCQASQS I GNWLAWYQQKPGKAPKLL I YQASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNAAGGATT I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS
YAMSWVRQAPGKGLEW I G I I YDSASTYYASWAKGRFT I SKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQ I FSGDMDGWGQ
GTTVTVSS

【 0 2 7 7 】

配列番号80 - DLX2679

E I VMTQSPSTLSASVGDRT I TCQASQS I GNWLAWYQQKPGKAPKLL I YQASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNAAGGATT I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS
YAMSWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SKDTSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDFDYWGQ
GTLVTVSS

30

【 0 2 7 8 】

配列番号81 - DLX2680

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCRASQS I GNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASNLAGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
EDFATYYCQNTGGG I N I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSD
AAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTFYASWAKGRFT I SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARERN I FSGDMALWGQ
GTTVTVSS

40

【 0 2 7 9 】

配列番号82 - DLX2681

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCRASQS I GNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASNLAGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
EDFATYYCQNTGGG I N I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSN
SAMAWVRQAPGKGLEWVG I I YDSASTYYASWAKGRFT I SRDNSKNTVY LQMNSLRAEDTATYYCARERA I FSGDFALWGQ
GTLVTVSS

【 0 2 8 0 】

配列番号83 - DLX2682

E I VMTQSPSTLSASVGDRI I TCRASQS I GNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASNLAGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
EDFATYYCQNTGGG I N I AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS

50

YAMSWVRQAPGKGLEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWGQ
GTTVTVSS

【 0 2 8 1 】

配列番号84 - DLX2683

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
EDFATYYCQNTGGGINIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS
YAMSWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFDYWGQ
GTLVTVSS

【 0 2 8 2 】

配列番号85 - DLX2684

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNAAGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSD
AAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTFYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARERNIFSGDMALWGQ
GTTVTVSS

10

【 0 2 8 3 】

配列番号86 - DLX2685

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNAAGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSN
SAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYVYLMNSLRAEDTATYYCARERAIFSGDFALWGQ
GTLVTVSS

20

【 0 2 8 4 】

配列番号87 - DLX2686

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNAAGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS
YAMSWVRQAPGKGLEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWGQ
GTTVTVSS

【 0 2 8 5 】

配列番号88 - DLX2687

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNAAGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS
YAMSWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFDYWGQ
GTLVTVSS

30

【 0 2 8 6 】

配列番号89 - DLX2689

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQNAAGGINIAFGQGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSS
NSAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYVYLMNSLRAEDTATYYCARERAIFSGDFALWG
QGTLVTVSS

【 0 2 8 7 】

配列番号90 - DLX2690

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQNAAGGINIAFGQGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS
SYAMSWVRQAPGKGLEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWG
QGTTVTVSS

40

【 0 2 8 8 】

配列番号91 - DLX2691

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQNAAGGINIAFGQGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSS
SYAMSWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFDYWG
QGTLVTVSS

50

好ましくは、Xは、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

【0299】

配列番号99 - VL CDR-L2_R58X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYXASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLG

【0300】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

10

【0301】

配列番号100 - VL CDR-L2_T69X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASXLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLG

【0302】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

20

【0303】

配列番号101 - VL CDR-L3_T109X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNXGGGVSIAFGQGTKLTVLG

【0304】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、イソロイシン（I）、アスパラギン（N）、セリン（S）、トレオニン（T）およびバリン（V）から成る群より選択される。

30

【0305】

配列番号102 - VL CDR-L3_G111X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNTGXGVSIAFGQGTKLTVLG

【0306】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、グリシン（G）、プロリン（P）およびセリン（S）から成る群より選択される。

【0307】

配列番号103 - VL CDR-L3_G112X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPD
DDFATYYCQNTGGXVSIAFGQGTKLTVLG

40

【0308】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

50

【 0 3 0 9 】

配列番号104 - VL CDR-L3_V135X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGXSIFGQGTKLTVLG

【 0 3 1 0 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

10

【 0 3 1 1 】

配列番号105 - VL CDR-L3_S136X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQP
DDFATYYCQNTGGGVXIFGQGTKLTVLG

【 0 3 1 2 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

20

【 0 3 1 3 】

配列番号106 - VH CDR-H1_S33X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLXAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【 0 3 1 4 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

30

【 0 3 1 5 】

配列番号107 - VH CDR-H1_A39X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSXAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【 0 3 1 6 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

40

【 0 3 1 7 】

配列番号108 - VH CDR-H2_Y59X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【 0 3 1 8 】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、グリシン（G）、メチオニン（M）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

【 0 3 1 9 】

50

配列番号109 - VH CDR-H2_D60X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYXSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【0320】

好ましくは、Xは、アスパラギン酸(D)、アスパラギン(N)およびプロリン(P)から成る群より選択される。

【0321】

配列番号110 - VH CDR-H2_Y69X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTXYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【0322】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グリシン(G)、フェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、プロリン(P)、アスパラギン(N)、セリン(S)、トレオニン(T)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

【0323】

配列番号111 - VH CDR-H3_R110X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAREXAIFSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【0324】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

【0325】

配列番号112 - VH CDR-H3_A111X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERXIFSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【0326】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

【0327】

配列番号113 - VH CDR-H3_I112X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAXFSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【0328】

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、フェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

【0329】

配列番号114 - VH CDR-H3_F113X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIXSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【0330】

10

20

30

40

50

好ましくは、Xは、フェニルアラニン（F）およびイソロイシン（I）から成る群より選択される。

【0331】

配列番号115 - VH CDR-H3_S114X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFXGDFVLWGQGTLLVTVSS

【0332】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、グルタミン酸（E）、グリシン（G）、セリン（S）、トレオニン（T）およびバリン（V）から成る群より選択される。

10

【0333】

配列番号116 - VH CDR-H3_G115X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFXDFVLWGQGTLLVTVSS

【0334】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、グリシン（G）、メチオニン（M）およびアスパラギン（N）から成る群より選択される。

【0335】

配列番号117 - VH CDR-H3_D135X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGXFVLWGQGTLLVTVSS

20

【0336】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、ヒスチジン（H）、アスパラギン（N）、セリン（S）およびトレオニン（T）から成る群より選択される。

【0337】

配列番号118 - VH CDR-H3_F136X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDXVLWGQGTLLVTVSS

【0338】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

30

【0339】

配列番号119 - VH CDR-H3_V137X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFXLWGQGTLLVTVSS

【0340】

好ましくは、Xは、アラニン（A）、システイン（C）、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、リジン（K）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、アスパラギン（N）、プロリン（P）、グルタミン（Q）、アルギニン（R）、セリン（S）、トレオニン（T）、バリン（V）、トリプトファン（W）およびチロシン（Y）から成る群より選択される。

40

【0341】

配列番号120 - VH CDR-H3_L138X

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVXWGQGTLLVTVSS

【0342】

50

好ましくは、Xは、アラニン(A)、システイン(C)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、リジン(K)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、アスパラギン(N)、プロリン(P)、グルタミン(Q)、アルギニン(R)、セリン(S)、トレオニン(T)、バリン(V)、トリプトファン(W)およびチロシン(Y)から成る群より選択される。

【0343】

配列番号121 - VH DLX2464

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERQIFSGDMAGWGQGLTVTVSS

10

【0344】

配列番号122 - VH DLX2465

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERNIFSGDMDLWGQGLTVTVSS

【0345】

配列番号123 - VL DLX2466

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGKYLWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNAGGGVSAFGQGTKLTVLG

【0346】

配列番号124 - VH DLX2466

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSDAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERNIFSGDMAGWGQGLTVTVSS

20

【0347】

配列番号125 - VL DLX2467

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIHNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGSSIFAQGQTKLTVLG

【0348】

配列番号126 - VH DLX2467

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSRAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERMIFSGDFVLWGQGLTVTVSS

30

【0349】

配列番号127 - VL DLX2468

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGNYLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNAGGGTSAFGQGQTKLTVLG

【0350】

配列番号128 - VH DLX2468

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSSAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERNIFSGDMVLWGQGLTVTVSS

【0351】

配列番号129 - VL DLX2475

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIDKWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGVHIFAQGQTKLTVLG

40

【0352】

配列番号130 - VH DLX2475

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSYAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFKLWGQGLTVTVSS

【0353】

配列番号131 - VL DLX2476

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGVSAFGQGQTKLTVLG

50

【 0 3 5 4 】

配列番号132 - VH DLX2476

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVG I IYDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERD I FSGDFVWGQGTLLVTVSS

【 0 3 5 5 】

配列番号133 - VL DLX2480

E I VMTQSPSTLSASVGDRV I ITCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGG I N I AFGQGTKLTVLG

【 0 3 5 6 】

配列番号134 - VH DLX2480

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSDAAMAWVRQAPGKGLEWVG I IYDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERQ I FSGDFVLWGQGTLLVTVSS

10

【 0 3 5 7 】

配列番号135 - VL DLX2543

E I VMTQSPSTLSASVGDRV I ITCQASQS I SSWLSWYQQKPGKAPKLL I YKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNAGGGVS I AFGQGTKLTVLG

【 0 3 5 8 】

配列番号136 - VL DLX2529

E I VMTQSPSTLSASVGDRV I ITCRASQS I GNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASNLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
EDFATYYCQNTGGG I N I AFGQGTKLTVLG

20

【 0 3 5 9 】

配列番号137 - VL DLX2547

AD I VMTQSPSTLSASVGDRV I ITCQASQS I SSYLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQ
PDDFATYYCQNTGGG I N I AFGQGKLE I KR

【 0 3 6 0 】

配列番号138 - VH DLX2547

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVG I IYDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【 0 3 6 1 】

配列番号139 - VL DLX2528

E I VMTQSPSTLSASVGDRV I ITCQASQS I GNWLAWYQQKPGKAPKLL I YQASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNAGGATT I AFGQGTKLTVLG

30

【 0 3 6 2 】

配列番号140 - VH DLX2528

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVG I IYDSASTYYASWAKGRFT I SRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDFVLWGQGTLLVTVSS

【 0 3 6 3 】

配列番号141 - VL DLX2585

E I VMTQSPSTLSASVGDRV I ITCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLG

40

【 0 3 6 4 】

配列番号142 - VH DLX2585

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWVG I IYDSASTYYASWAKGRFT I SKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERA I FSGDFDYWGQGTLLVTVSS

【 0 3 6 5 】

配列番号143 - VL DLX2545

E I VMTQSPSTLSASVGDRV I ITCQASQS I DNWLSWYQQKPGKAPKLL I YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLT I SSLQP
DDFATYYCQNTGGGVS I AFGQGTKLTVLG

【 0 3 6 6 】

配列番号144 - VH DLX2545

50

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERNIFSGDMVLWGQGTITVTVSS

【 0 3 6 7 】

配列番号145 - VL DLX2531

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGVSIFAGQGTKLTVLG

【 0 3 6 8 】

配列番号146 - VH DLX2531

EVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSNSAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARERAIFSGDFALWGQGTITVTVSS

10

【 0 3 6 9 】

配列番号147 - VL DLX2586

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGVSIFAGQGTKLTVLG

【 0 3 7 0 】

配列番号148 - VH DLX2586

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWGQGTITVTVSS

【 0 3 7 1 】

配列番号149 - VL DLX2530

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGVSIFAGQGTKLTVLG

20

【 0 3 7 2 】

配列番号150 - VH DLX2530

EVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSDAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTFYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARERNIFSGDMALWGQGTITVTVSS

【 0 3 7 3 】

配列番号151 - VL DLX2548

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGVSIFAGQGTKLTVLG

30

【 0 3 7 4 】

配列番号152 - VH DLX2548

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWGQGTITVTVSS

【 0 3 7 5 】

配列番号153 - VL DLX2544

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSSSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGVSIFAGQGTKVEIKR

【 0 3 7 6 】

配列番号154 - DLX2544

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSSSYLSWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFATYYCQNTGGGVSIFAGQGTKVEIKRGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTITVTVSS

40

【 0 3 7 7 】

配列番号155 - DLX2531 の CDR-H1

FSLSNSAMA

【 0 3 7 8 】

配列番号156 - DLX2531 の CDR-H2

IIYDSASTYYASWAKG

50

【 0 3 7 9 】

配列番号157 - DLX2531のCDR-H3
ERAIFSGDFAL

【 0 3 8 0 】

配列番号158 - DLX2531のCDR-L1
QASQSIDNWLS

【 0 3 8 1 】

配列番号159 - DLX2531のCDR-L2
RASTLAS

【 0 3 8 2 】

配列番号160 - DLX2531のCDR-L3
QNTGGGVSI A

【 0 3 8 3 】

配列番号161 - DLX2681のCDR-L1
RASQSIGNWLS

【 0 3 8 4 】

配列番号162 - DLX2681のCDR-L2
RASNLAS

【 0 3 8 5 】

配列番号163 - DLX2681のCDR-L3
QNTGGGINIA

【 実施例 】

【 0 3 8 6 】

(実施例 1 - r h I L - 1 中和 s c F v の同定)

ウサギの免疫処置：組換えヒトIL-1 タンパク質 (Pepr o t e c h 、米 国 、カ
タログ番号 2 0 0 - 0 1 B) でウサギに免疫した。最後の追加免疫後にリンパ節および脾
細胞を単離し、それらの細胞を凍結保存した。

【 0 3 8 7 】

ウサギB細胞のフローサイトメトリー選別および培養：F A C S A r i a I I I (B
D B i o s c i e n c e s) を使用してIL-1 特異的記憶B細胞を単一細胞として
9 6 ウェルマイクロプレートに選別した。単一B細胞クローンをフィーダー細胞の存在下
で培養した。

【 0 3 8 8 】

B細胞クローンのスクリーニング：細胞培養上清をE L I S A により抗IL-1 特異
的I g G の存在について分析した。簡単に言うと、r h I L - 1 (Pepr o t e c h
、カタログ番号 2 0 0 - 0 1 B) を、P B S 中、2 m c g / m l の濃度で一晩、4 でM
a x i s o r p 9 6 ウェルマイクロプレートにコーティングした。5 % 脱脂粉乳でプロ
ックした後、細胞培養上清を添加した。IL-1 特異的I g G を抗ウサギI g G - H R
P (S o u t h e r n B i o t e c h 、カタログ番号 4 0 5 0 - 0 5) によって検出し
た。B M B l u e P O D 基質 (R o c h e A p p l i e d S c i e n c e) でE
L I S A を発色させた。r h I L - 1 に特異的なB細胞クローンをヒト線維芽細胞アッ
セイでそれらの中和能力についてさらに分析した。

【 0 3 8 9 】

IL-1 中和I g G のシークエンシング：中和抗IL-1 抗体を生成するすべての
ウサギB細胞クローンを、R N e a s y M i n i K i t (Q i a g e n G e r m a
n y 、カタログ番号 7 4 1 0 6) を使用するmRNA単離に供した。製造業者のプトロコ
ル (O n e S t e p R T - P C R キット、Q i a g e n G e r m a n y 、カタログ番
号 2 1 0 2 1 2) に従って逆転写のためのテンプレートとしてmRNAを使用した。その
後、ウサギI g G の重鎖および軽鎖のコード配列を特異的に増幅するためのオリゴヌクレ
オチドを使用するP C R 反応を行った (B i o m e t r a T h e r m o c y c l e r

10

20

30

40

50

T3)。重鎖および軽鎖のPCR断片を独立してシーケンシングし(ABI、Sanger 3730xl; Microsynth AG、スイス、バルガッハ)、得られたDNA配列を、EMBOSS Transeq(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>)を使用してタンパク質配列に翻訳し、CLUSTALW2(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)を使用してアラインした。

【0390】

抗IL-1 scFv遺伝子の構築、およびscFvタンパク質発現：上で定義の軽鎖および重鎖のウサギIgG CDR領域を同定し、配列番号18~21および22~25をそれぞれ含むヒト軽鎖および重鎖の受容体フレームワークにグラフトした。配列番号9の配列によってC末端可変重鎖に結合されたN末端可変軽鎖を有するscFvタンパク質をコードする細菌発現ベクターを産生した。scFvタンパク質を大腸菌BL21(DE3); Novagen、米国、カタログ番号69450-3)において封入体として発現させ、それらを精製し、可溶化し、そしてタンパク質をリフォールディングした。リフォールディングされたscFvを標準的なサイズ排除クロマトグラフィーによって精製し、単量体ピーク画分を収集した。精製されたscFvをELISAによりIL-1結合について分析した。rhIL-1に特異的に結合することが見出されたscFvをヒト線維芽細胞アッセイでIL-1中和について試験した。この手順により、scFv DLX2323および他の抗IL-1 scFvをIL-1の強力な阻害剤として同定した。

10

20

【0391】

(実施例2 - ヒトIL-1の認識)

先ず、DLX2323によるrhIL-1の特異的認識をELISAによって確認した(図1)。簡単に言うと、rhIL-1(Peprotech、カタログ番号200-01B)を、PBS中、2mcg/mlの濃度で一晩、4でMaxisorp 96ウェルマイクロプレートにコーティングした。5%脱脂粉乳でブロックした後、漸増濃度のscFv(10から300ng/ml)を添加し、scFvをプロテインL-HRP(Sigma-Aldrich、カタログ番号P3226)によって検出した。BM Blue POD基質(Roche Applied Science)でELISAを発色させた。陰性対照として、関連性のない特異性のscFvを使用した。この結果は、DLX2323がrhIL-1に特異的に結合することを示す。

30

【0392】

DLX2323および対照scFvがプロテインL-HRPによって認識されること、およびしたがって、上記ELISAにおけるrhIL-1結合についてのシグナルの欠如が検出の問題のせいではなかったことを確認するために、別の実験を行った。scFvをプレートに直接コーティングし、上記のとおりプロテインL-HRPによって検出した。すべてのscFvをPBS中、2mcg/mlの濃度でコーティングした。このELISA実験は、DLX2323および対照scFvが検出剤プロテインL-HRPによって認識されることを示した。

40

【0393】

別のELISA(図2)において、DLX2323によるヒト天然IL-1の認識を確認した。一般に公知のように、ヒト細胞以外の細胞におけるヒトタンパク質の発現は、例えば、翻訳後修飾および/または高次構造の変化の原因となることがある。これは、抗体によって組換えタンパク質と天然タンパク質とが異なって認識されることにつながる可能性がある。10ng/mlのPMA(Sigma-Aldrich、カタログ番号P1585)、1mg/mlのLPS(Sigma-Aldrich、カタログ番号L4391)および2mMのATP(Sigma-Aldrich、カタログ番号A6559-25UMO)での刺激後、THP-1細胞(DSMZ Germany、カタログ番号ACC16)によって天然ヒトIL-1が分泌された。細胞上清を回収し、分泌された天然ヒトIL-1を、ヒトIL-1/IL-1F2 ELISA DuoSet(R&D

50

Systems、カタログ番号DY201)を使用して定量した。DLX2323を、DPBS (pH7.4)中5mcg/mlのコーティング密度で96ウェルマイクロプレート(Maxisorp、Nunc)にコーティングした。組換え発現バージョン(Peprotech、カタログ番号200-01B)または天然分泌バージョンいずれかとしてのヒトIL-1を0.5から4ng/mlの範囲の最終濃度で適用した。結合したIL-1をビオチン化ヤギ抗ヒトIL-1抗体(R&D Systems、カタログ番号DY201)およびストレプトアビジン-HRP(BD Pharmingen、カタログ番号554060)によって検出した。BM Blue POD基質(Roche Applied Science)を使用してELISAを発色させた。定量の目的のために、VersaMaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices、米国)を使用して450nmで吸光度を測定した。結果(図2参照)は、組換え体および天然の両方のヒトIL-1が匹敵するレベルでDLX2323によって認識されることを示す。

10

20

30

40

50

【0394】

(実施例3 - rhIL-1 生物学的活性の中和)

抗体およびscFvを、ヒト皮膚線維芽細胞アッセイ(NHDF-Neo、カタログ番号CC-2509、Lonza、米国ウォーカーズビル)で、それらのIL-1中和能力について試験した。IL-1でのそのような線維芽細胞の活性化は、特異的IL-6放出をもたらし、それをELISAによって定量する。特異的抗体によるIL-1の阻害は、そのような線維芽細胞からのIL-6放出量を減少させる。抗IL-1抗体の阻害効力を、IL-1誘導IL-6放出の最大半量低減(IC₅₀)を測定することによって定量する。IL-1添加の16~20時間前に、ヒト皮膚線維芽細胞を96ウェルマイクロプレートに5,000細胞/ウェルで播種した。線維芽細胞を、細胞供給業者(Lonza 米国ウォーカーズビル: Clonetics (商標) 皮膚線維芽細胞系)による記載のとおりサプリメント(hFGF-B、インスリン、FBS、GA-1000)を有する線維芽細胞基本培地(FBM; Lonza、カタログ番号CC-3131)で培養した。その後、FBMを除去し、細胞をダルベッコ改変イーグル培地(DMEM; Gibco、Life Technologies、カタログ番号11880)で1回洗浄して、増殖因子を除去した。その後、細胞を7時間、DMEM培地中でインキュベートした。抗体またはscFvおよびrhIL-1をDMEM中で1時間、37℃でプレインキュベートした。その混合物を細胞に10pg/mlのIL-1最終濃度で添加した。陰性対照として、10pg/mlのIL-1を、一切の抗IL-1抗体なしで、細胞に添加した。陽性対照として、IL-1に対するマウスモノクローナル抗体を適用した(R&D Systems、米国、カタログ番号MAB201)。細胞をIL-1/抗IL-1抗体混合物とともに18~24時間インキュベートし、Human IL-6 DuoSet ELISA Kitをその製造業者の説明書(R&D Systems、米国、カタログ番号DY206)に従って使用して、細胞培養上清をIL-6放出について分析した。

DLX2323のIC₅₀を、8回の独立したアッセイで3pM±1.05であると決定した。

【0395】

(実施例4 - 市販IL-1 阻害剤との中和効力の比較)

DLX2323をIL-1中和scFvとして同定した。DLX2323および他の阻害剤の生物学的効力を、実施例3に記載のとおりヒト皮膚線維芽細胞アッセイで評価した。ウェルへの添加前に、組換えヒトIL-1を、漸増濃度のscFv DLX2323、抗ヒトIL-1モノクローナルIgG抗体MAB201、IL-1受容体アンタゴニスト(rhIL-1ra)(R&D systems、カタログ番号280-RA-010/CF)またはFDAによって承認された市販のカナキマブIgG(Novartis、Ilaris (商標))とともにプレインキュベートした。2回の独立した実験を行った: 図3Aは、DLX2323とMAB201との比較を描写するが、図3Bは、

DLX2323とrhIL-1raおよびカナキマブとの比較を示す。次のIC₅₀値を決定した：MAB201：2～3 pM；DLX2323：2～4 pM；rhIL-1ra：40 pM、およびカナキマブ：90 pM。結論として、一価単量体scFv DLX2323は、二価モノクローナルマウス抗体MAB201とほぼ同様に強力である。それは、ヒトIL-1を中和することについて市販の阻害剤カナキマブおよびrhIL-1raより明確に高い効力を示す。さらに、DLX2323は、IL-1誘導IL-6放出を完全に遮断することができた。

【0396】

(実施例5 - 溶解度)

DLX2323をPBS緩衝液pH7.2(リン酸緩衝食塩水1x、Gibco、Life Technologies(商標)、カタログ番号20012)中で保管した。その最大溶解度を決定するために、Vivaspin 20遠心濃縮機(Sartorius Stedim Biotech、カタログ番号VS2001)を使用して室温でDLX2323を濃縮した。その濃縮プロセスを高い試料粘度のため71 mg/mlで停止した。得られたDLX2323タンパク質溶液は、粘稠であり、透明であり、目視検査により沈殿は観察されなかった。

10

【0397】

(実施例6 - 安定性)

scFvの安定性に関しては、それらの不安定性の一因となる2つの異なるプロセスを観察することができる。第一に、scFvは、二量体化、しばしば、続いてオリゴマー化、そして最終的に凝集する傾向があり得る。第二に、より小さい断片をもたらすscFv分解が経時的に起こり得る。DLX2323が安定しているかどうかを判断するために、HPLC(Dionex、Summit system)サイズ排除クロマトグラフィー(Tosoh、TSK gel G2000SWx1、カタログ番号08540)を展開して、ある時点での、異なるタンパク質濃度および温度(例えば、4℃、室温および37℃)で、単量体の非分解scFvタンパク質の百分率を決定した。モノマーの百分率を、研究開始時点(T0)および1 mg/mlのDLX2323については1カ月後に、別の実験では50 mg/mlのDLX2323溶液について2週間後に測定した。タンパク質をPBS、pH7.2中に配合した。安定性研究の結果を表1および2に列挙する。

20

【表1】

表1

30

	1ヶ月後の 単量体含有率	観察
DLX2323, 1 mg/ml, T0	97%	
DLX2323, 1 mg/ml, 室温で保管	98%	
DLX2323, 1 mg/ml, 37°Cで保管	93%	極く低レベルの分解

40

【表 2】

表 2

	2週間後の 単量体含有率	観察
DLX2323, 50 mg/ml, T0	97%	
DLX2323, 50 mg/ml, 4° Cで保管	78%	二量体化
DLX2323, 50 mg/ml, 室温で保管	76%	オリゴマー化
DLX2323, 50 mg/ml, 37° Cで保管	43%	オリゴマー化

10

【0398】

DLX2323の熱安定性を示差走査蛍光定量法(DSF)によって評価した。この測定のために、リアルタイムPCRデバイス(Corbett、Rotor-Gene)によりDLX2323を30 から95 の温度勾配(1段階1 ずつ上昇、1段階ごとに5秒の待ち時間)で加熱した。タンパク質試料は、PBS中に0.5mg/mlのDLX2323および20x SYPRO(登録商標)オレンジ(Sigma-Aldrich、カタログ番号S5692、5000x)を含有した。タンパク質が融解し始めるとすぐに、Syproオレンジは、蛍光を放つようになった。前記勾配実行中にこの蛍光をオンラインで測定した(470nmの励起波長; 555nmの発光波長)。Rotor-Gene 6000シリーズソフトウェア1.7を使用して、DLX2323の midpoint 融解温度(Tm)を74 であると算定した。

20

【0399】

(実施例7 - 交差反応性)

ヒト以外の種のIL-1 ホモログに対するDLX2323の交差反応性をELISAで評価した。次の種の組換え発現IL-1 タンパク質への結合を調査した: カニクイザル(Sino Biological Inc.、米国、カタログ番号90010-CN AE)、アカゲザル(R&D Systems、米国、カタログ番号1318-RL/CF)、ブタ(Kingfisher Biotech、米国、カタログ番号RP0297 S-025)、イヌ(Kingfisher Biotech、米国、カタログ番号RP0085D-025)、モルモット(Kingfisher Biotech、カタログ番号RP0343GP-025)、ラット(Peprotech、カタログ番号400-01B)およびマウス(BioLegend、カタログ番号575102)。DLX2323の結合をELISA陽性対照抗体(R&D Systems、米国、ヤギ抗ヒトIL-1 ポリクローナルIgG、カタログ番号AB-201-NA; BioLegend, Inc.、米国、ピオチン抗マウス/ラットIL-1 抗体、カタログ番号503505)と比較した。簡単に言うと、タンパク質を、PBS中、2mcg/mlの濃度で一晩、4 でMaxisorp 96ウェルマイクロプレートにコーティングした。5%脱脂粉乳でブロックした後、漸増濃度(0.1mcg/ml、0.3mcg/mlおよび1.0mcg/ml)のDLX2323をウェルに添加した。IL-1 特異的対照抗体を利用して、すべてのタンパク質のコーティングの成功を別々に確認した。DLX2323をブロテインL-HRP(Sigma-Aldrich、米国、カタログ番号P3226)によって検出したが、対照抗体は、ストレプトアビジン-HRP(BD Pharmingen、米国、カタログ番号554060)、またはHRPで標識された他の適格な二次抗体、いずれかによって検出した。BM Blue POD基質(Roche Applied Science)を使用してELISAを発色させ、450nmで吸光度を測定した。DLX2323は、4つの種のIL-1 オルソログ、すなわち、ヒト、カニクイザル、アカゲザルおよびラットのIL-1 を認識した。ブタ、モルモット、イヌおよびマウスのIL-1 については、交差反応性は観察できなかった。

30

40

50

【0400】

ヒト以外の種のIL-1 ホモログに対するDLX2323の交差反応性に加えて、様々なヒトIL-1ファミリーメンバーおよび他のサイトカインに関するDLX2323の認識パターンを測定した：rhIL-1ra (R&D systems、米国、カタログ番号280-RA-010/CF)、rhIL-1 (Peprotech、カタログ番号200-01A)、rhIL-18 (BioVision、カタログ番号4179-25)、rhIL-33 (Peprotech、カタログ番号200-33)、IL-36ra (R&D Systems、カタログ番号1275-IL/CF)、rhTNF (Peprotech、ドイツ、ハンブルク、カタログ番号300-01A)およびrhIL-6 (Peprotech、カタログ番号200-06)。適用したELISAアッセイにおいて、次の抗体が陽性対照として役立った：ビオチン抗ヒトIL-1ra (BioLegend、カタログ番号509501)、ビオチン抗ヒトIL-1 (BioLegend、カタログ番号515703)、抗ヒトIL-18ポリクローナル抗体 (BioVision、カタログ番号5179-100)、ビオチン抗ヒトIL-33抗体 (Peprotech、カタログ番号500-P261Bt)、抗ヒトTNF scFv DLX105 (国際公開2006/131013号Aに記載されているDeLenex所有 (propriety) 抗体)、ビオチン抗ヒトIL-6 (R&D systems、DY206、カタログ番号840114)、抗ヒトIL-36ra (R&D systems、カタログ番号AF1275)。ELISAは、本質的には上で説明したとおりに行った。これらの試験したヒトIL-1ファミリーメンバーおよびサイトカインのいずれについても、DLX2323の交差反応性は検出できなかった。

【0401】

(実施例8 - インビボでの有効性)

この実施例では、DLX2323によるヒトIL-1 活性のインビボ阻害を実証する。ヒトIL-1 は、マウスIL-1受容体に結合することができ、そしてその受容体を活性化することができ、それによってマウスにおいてインビボで炎症応答を誘導することができる。この炎症は、マウスIL-6 (mIL-6)を含む血清中のサイトカインのレベル上昇をもたらす。組換えヒトIL-1 (Peprotech、カタログ番号200-01B)を1.5mcg/kg体重の用量で、8週齢オスBALB/cマウス (Charles River、ドイツ)に皮下投与した。2時間後、血清中のmIL-6レベルは、有意に上昇した。インビボでのDLX2323の中和能力を試験するために、IL-1 投与の2時間前にDLX2323を腹腔内 (i.p.)注射した。マウスの1つの群に5mg/kg用量のDLX2323を注射し、第二の群に15mg/kg用量のDLX2323を注射した。陰性対照群は、PBS i.p.または関連性のない特異性のscFv、いずれかで処置した。マウスの第五の群には、10mg/kgのカナキマブ (Novartis、Ilaris (登録商標))を陽性対照として静脈内注射した。rhIL-1 適用の2時間後、血液試料を採取し、Mouse IL-6 DuoSet ELISAキットを製造業者の説明書 (R&D Systems、カタログ番号DY406)に従って使用してmIL-6の血清レベルを測定した。DLX2323およびカナキマブで処置したマウスの群については、非常に少量のmIL-6しか検出できず、またはmIL-6を全く検出できないことさえあった (0.0~2pg/mlのmIL-6; 図4)。PBSまたは対照scFvを受けたマウスは、50から170pg/mlの有意に上昇したIL-6レベルを示した。DLX2323は、5mg/kg用量においてさえ、インビボ設定でヒトIL-1 を非常に効率的に中和していた。

【0402】

(実施例9 - CDRライブラリー)

DLX2323とヒトIL-1 との会合をよりよく特徴づけるために、アミノ酸変異を設計し、DLX2323のCDR領域に部位特異的に挿入した。CDR位置は、それらの表面露出、相同性モデルから演繹して予想されるヒトIL-1 との相互作用、または先行ウサギIgGとの配列比較に基づいて、変異誘発のために選んだ。軽鎖においては、

D L X 2 3 2 3 のバリエーションの設計のために、CDR - L 1 ではモチーフ D N W を選択し（配列番号 1 4 ）、CDR - L 2 ではアミノ酸残基 R および T を選択し（配列番号 1 5 ）、CDR - L 3 ではトレオニンおよびモチーフ G G V S を選択した（配列番号 1 6 ）。重鎖においては、モチーフ S A を CDR - H 1 において選び（配列番号 1 1 ）、CDR - H 2 ではモチーフ Y D およびその後のチロシンを選んだ（配列番号 1 2 ）。CDR - H 3 では、N 末端グルタミン酸（E）を除くすべての位置を置換のために選択した（配列番号 1 3 ）。すべての前記位置を配列番号 1 1 ~ 1 6 中にそれぞれ X で示す。部位特異的変異誘発、クローンのシーケンシングおよびライブラリーのアセンブリを、Gene Art（Life Technologies（商標）、ドイツ、レーゲンスブルク）によって行った。

10

【0403】

結果として得られた s c F v 変異体が大腸菌 B L 2 1（D E 3）（Novagen、米国、カタログ番号 6 9 4 5 0 - 3）において 1 m l 培養物中で 9 6 ウェル形式で発現させる。この系の発現中、s c F v タンパク質の大部分は、前記細胞内で不溶性封入体を形成するが、細胞溶解後に可溶性画分から相当量のタンパク質を回収することができ、その量は、r h I L - 1 E L I S A による分析（詳細については実施例 2 を参照されたい）に十分であることが判明した。細胞を溶解緩衝液（1 m M E D T A、0 . 1 m g / m l リゾチーム、P B S p H 7 . 2）中で、9 6 ウェル形式で、凍結およびその後の解凍によって溶解した。得られた粗抽出物を遠心分離によって清澄化した。1 ウェルあたり 5 0 n g / m l の r h I L - 1（Peprotech）でコーティングしたマイクロタイタープレートのウェルに上清を添加した。洗浄後、結合した s c F v をプロテイン L - H R P によって検出し、r h I L - 1 への結合を B M B l u e P O D 基質（Roche Applied Science）によって定量する。

20

【0404】

表 3 は、E L I S A シグナルによって定義して陰性対照の少なくとも 2 倍大きい 0 . 1 光学単位より小さくない r h I L - 1 の結合を明確に許容する一部位変異を列挙する。

【表 3 - 1】

表 3

30

残基位置	アミノ酸置換
CDR-L1_D32	A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
CDR-L1_N33	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, S, T, V, W, Y
CDR-L1_W40	E, F, G, M, N, Q, S, Y
CDR-L2_R58	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y
CDR-L2_T69	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y
CDR-L3_T109	A, C, I, N, S, V
CDR-L3_G111	A, P, S
CDR-L3_G112	A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y

40

【表 3 - 2】

CDR-L3_V135	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
CDR-L3_S136	A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y
CDR-H1_S33	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y
CDR-H1_A39	C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
CDR-H2_Y59	A, C, G, M
CDR-H2_D60	N, P
CDR-H2_Y69	A, D, E, G, F, H, I, K, L, M, N, P, S, T, W
CDR-H3_R110	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
CDR-H3_A111	C, D, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
CDR-H3_I112	A, C, F, H, L, M, N, Q, S, T, V, Y
CDR-H3_F113	I
CDR-H3_S114	A, C, E, G, T, V
CDR-H3_G115	A, M, N,
CDR-H3_D135	A, E, H, N, S, T
CDR-H3_F136	A, C, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
CDR-H3_V137	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
CDR-H3_L138	A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y

10

20

【0405】

これらの結合データは、均一になるまで精製し、同様に精製したDLX2323タンパク質と一緒に細胞ベースの分析に供した、大規模形式での5つの例示的一部位変異体の発現によって検証したときの、rhIL-1 生物学的機能の中和にも関する予測値を有する。

30

【0406】

DLX2323__CDR-H1__A39N (X=Nでの配列番号45)、DLX2323__CDR-H3__A111N (X=Nでの配列番号50)、DLX2323__CDR-H3__F136N (X=Nでの配列番号56)、DLX2323__CDR-H3__V137D (X=Dでの配列番号57)、ならびにDLX2323__CDR-H3__L138D (X=Dでの配列番号58) および対応する親scFvであるDLX2323を大腸菌BL21 (DE3) (Novagen) 細胞において2リットル規模で発現させた。超音波処理による細胞溶解後、封入体を遠心分離によって富化し、洗浄し、タンパク質をグアニジン緩衝液 (6M グアニジン/HCl、100mM Tris、1mM EDTA、pH 8.5) に可溶化し、尿素緩衝液 (4M 尿素、50mM グリシン、2mM シスチン、2mM システイン、pH 10) 中でリフォールディングし、50mM グリシン、50mM NaCl、pH 10 中で濃縮し、サイズ排除クロマトグラフィーによって均一になるまで精製した。この手順の単量体ピーク画分をおおよそ0.5~5mg/mlの最終タンパク質含量になるまで濃縮し、滅菌フィルターユニットに通し、そのまま実施例3に記載のとおり細胞ベースの分析に供した。表4は、2つの独立した実行で決定したときの変異体々々についての中和効力IC₅₀を示す。

40

【表 4】

表 4

クローンID	IC ₅₀
DLX2323	2-4 pM
DLX2323_CDR-H1_A39N	10 pM
DLX2323_CDR-H3_A111N	2-4 pM
DLX2323_CDR-H3_F136N	2-4 pM
DLX2323_CDR-H3_V137D	5 pM
DLX2323_CDR-H3_L138D	10 pM

10

【0407】

上記 E L I S A 結果と全体的によく一致して、低 p M 範囲の I C₅₀ 値が、選択された 5 つすべての一部位変異体について観察された。選択された変異体サブセットの各メンバーは、親 s c F v D L X 2 3 2 3 のものに匹敵する、r h I L - 1 に対する中和能力を有した。したがって、D L X 2 3 2 3 およびそのバリエーションの r h I L - 1 への結合は、重要な機能特徴を付随して保ちながら有意な配列変異度を許容することを示す。

【0408】

20

(実施例 10 - コンビナトリアルバリエーションの産生)

上記に基づき、前に調査した C D R 一部位変化のうちの 3 つから 9 つを組み合わせて、D L X 2 3 2 3 のコンビナトリアル変異体を設計した。個々の残基変化を、(i) 親抗体 D L X 2 3 2 3 のものに匹敵するまたはそれより良好な、強い E L I S A 結合結果、(i i) 複数の C D R 領域に同時に影響を与える広範な一部位変化の組み合わせ、および (i i i) C D R - H 3 の蓄積調節のみに基づいて選択した。設計した変異体を大規模形式で発現させ、単一変異体について上で説明したように精製した後、実施例 3 のヒト線維芽細胞アッセイで中和能力を評価した。配列あたりの個々のアミノ酸変化および対応する s c F v タンパク質の I C₅₀ データを表 5 に詳述する。これらの単離された s c F v タンパク質すべてが、インビトロで r h I L - 1 に対する中和活性を有した。上位 5 候補は、低ピコモル濃度の範囲の I C₅₀ 値を提示した。したがって、これらは、親 s c F v D L X 2 3 2 3 に高度に匹敵する。

30

【表 5】

表 5

scFv	アミノ酸置換 (AHo注釈)	IC50
DLX2464	VL: 親 VH: A111Q, F136M, V137A, L138G	4 pM
DLX2465	VL: 親 VH: A111N, F136M, V137D	4 pM
DLX2466	VL: D32G, N33K, W40Y, T109A VH: A39D, A111N, F136M, V137A, L138G	300 pM
DLX2467	VL: D32H, T69N, V135S VH: S33R, A111M	25 pM
DLX2468	VL: D32G, W40Y, T109A, V135T VH: A39S, A111N, F136M	15 pM
DLX2475	VL: N33K, R58Q, S136H VH: A39Y, V137K	200 pM
DLX2476	VL: D32S, N33S VH: A111D, L138G	100 pM
DLX2480	VL: V135I, S136N VH: S33D, A111Q	5 pM

10

20

【0409】

可変軽鎖および/または可変重鎖のCDRおよび隣接フレームワーク領域に6より多くのアミノ酸置換を有するバリエーションを設計した。合計で10のコンビナトリアル候補(4つVLおよび6つのVH変異体配列)を生成し、発現させ、実施例3で説明したようにインビトロでrhIL-1結合(ELISA)および中和(ヒト線維芽細胞アッセイ)について機能分析した。表6は、それぞれの点変異、および各クローンについて2回の独立した実験で測定したときの中和効力をまとめる。

30

【表6-1】

表 6

ScFv	アミノ酸置換(AHo注釈)	IC50
DLX2543	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A VH: 親	3-4 pM
DLX2529	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: 親	1-2 pM
DLX2547	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N,	30 pM

40

【表 6 - 2】

	T146E, V147I, L148K, G149R VH: 親		
DLX2528	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T VH: 親	8 pM	
DLX2585	VL: 親 VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y	1-2 pM	10
DLX2545	VL: 親 VH: V55I, V89L, Y105F, A111N, F136M, L144T	7 pM	
DLX2531	VL: 親 VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A	0.6 - 1 pM	
DLX2586	VL: 親 VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G	2 pM	20
DLX2530	VL: 親 VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T	1-2 pM	
DLX2548	VL: 親 VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T	1-2 pM	30

【0410】

10すべての s c F v タンパク質は、高いフェムトモル濃度から低いピコモル濃度の範囲の IC_{50} 値でインビトロのヒト線維芽細胞アッセイにおいて rhIL-1 を有効に中和することが見出された。クローン DLX2531、DLX2548、DLX2585、DLX2530、DLX2529、および DLX2586 は、親 s c F v DLX2323 より低い IC_{50} 値を再現可能に生じさせた。

【0411】

最後に、上記 VL および VH の配列を鎖シャッフリングした。rhIL-1 への結合を、19 の鎖シャッフリングした VL および VH の変異体で形質転換させた大腸菌 BL21 origami 細胞の清澄化溶解産物について確認した。表 7 は、それらの置換をまとめる。

10

20

30

40

【表 7 - 1】

表 7

ScFv	VL-VH 融合体	アミノ酸置換
DLX2676	DLX2528 _2530	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T

【表 7 - 2】

		VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T	
DLX2677	DLX2528 _2531	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A	
DLX2678	DLX2528 _2548	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T	10
DLX2679	DLX2528 _2585	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y	
DLX2680	DLX2529 _2530	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T	20
DLX2681	DLX2529 _2531	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A	
DLX2682	DLX2529 _2548	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T	
DLX2683	DLX2529 _2585	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y	30
DLX2684	DLX2543 _2530	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T	
DLX2685	DLX2543 _2531	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A	
DLX2686	DLX2543 _2548	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T	40
DLX2687	DLX2543 _2585	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y	
DLX2689	DLX2544 _2531	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, R58K, A87T, E88D, D99E, T109A, V135I, S136N, L145V, T146E, V147I, L148K,	

【表 7 - 3】

		G149R VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A	
DLX2690	DLX2544 _2548	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, R58K, A87T, E88D, D99E, T109A, V135I, S136N, L145V, T146E, V147I, L148K, G149R VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T	10
DLX2691	DLX2544 _2585	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, R58K, A87T, E88D, D99E, T109A, V135I, S136N, L145V, T146E, V147I, L148K, G149R VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y	
DLX2692	DLX2547 _2530	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T	20
DLX2693	DLX2547 _2531	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A	
DLX2694	DLX2547 _2548	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T	30
DLX2695	DLX2547 _2585	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y	

【0412】

陰性対照の少なくとも2倍である0.1光学単位以上のELISAシグナルが得られた場合、結合を特異的と考えた。結果を図6に示す。例えば、DLX2690およびDLX2691は、カットオフフィルターをかりうじて通過したが、試験結果は陽性であった。残りの集団のVLおよびVHの鎖シャッフリングした変異体は、rhIL-1を結合し、DLX2323に匹敵するまたはさらにはそれより高い絶対ELISAシグナルを有する。

40

【0413】

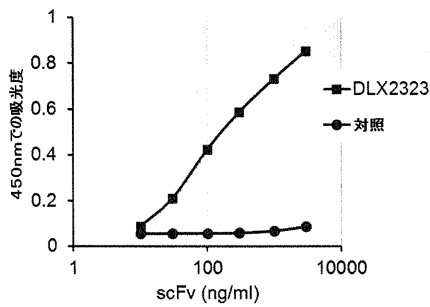
DLX2681およびDLX2693のIC₅₀値を、上記のヒト線維芽細胞アッセイで決定した。DLX2681は、0.6pMのIC₅₀値でrhIL-1を中和することが判明し、DLX2693のIC₅₀値は、12.5pMであると決定された。

50

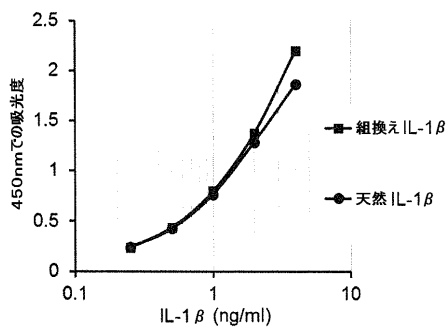
【0414】

本発明の現在好ましい実施形態を示し、説明したが、本発明がそれらに限定されず、下記の特許請求の範囲の範囲内で別様に様々に具体化され、実施され得ることを理解されたい。本発明の非常に多数の変更および代替実施形態が当業者には容易に明らかであるので、この記載は、単に例示にすぎないと解釈すべきであり、本発明を実施するための最良の様式を当業者に教示する目的のものである。したがって、すべての適する変更および均等物は、下記の特許請求の範囲の範囲に入るとみなされ得る。

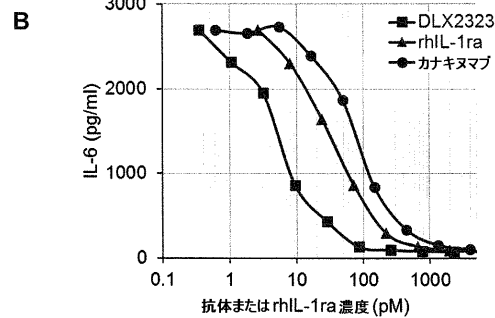
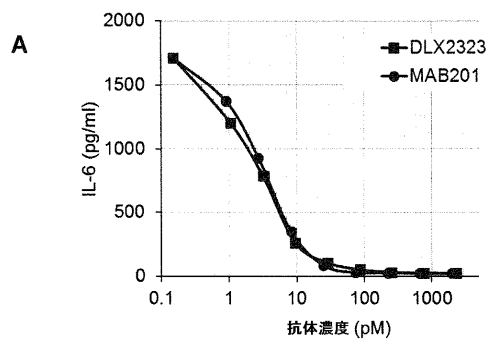
【 図 1 】
Figure 1



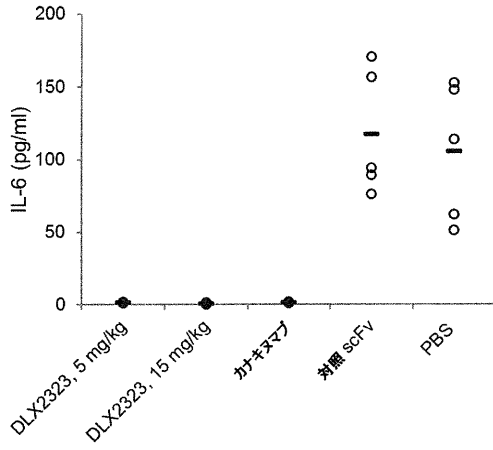
【 図 2 】
Figure 2



【 図 3 】
Figure 3



【 図 4 】
Figure 4



【 図 5 】

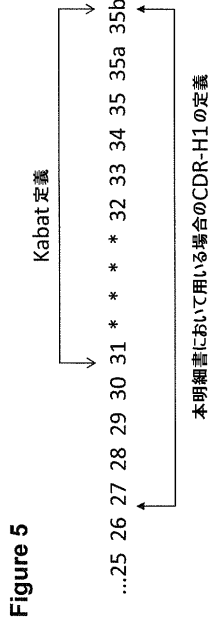


Figure 5

【 図 6 】

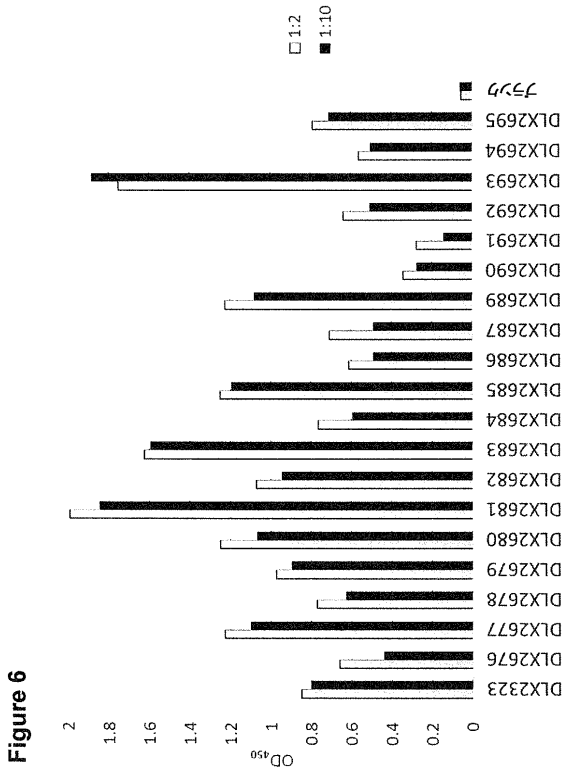


Figure 6

【配列表】

2016503293000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年5月8日(2015.5.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2016503293000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/073009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 C07K16/24 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/149370 A1 (XOMA TECHNOLOGY LTD [US]; SOLINGER ALAN M [US]; OWYANG ALEXANDER [US]) 10 December 2009 (2009-12-10) examples 1, 2	1-63
X	WO 2007/002261 A2 (XOMA TECHNOLOGY LTD [US]; MASAT LINDA [US]; HAAK-FRENDSCHO MARY [US];) 4 January 2007 (2007-01-04) examples 2, 6, 10, 12	1-63
X	WO 2004/067568 A2 (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION [US]; DICKINSON CRAIG DUANE [US]; VASSEROT) 12 August 2004 (2004-08-12) page 21, line 1 - line 15; table 2 page 28, line 2 - page 33, line 24	1-63
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
10 February 2014	24/02/2014	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Merlos, Ana Maria	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/073009

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALTEN RIEKE ET AL: "The human anti-IL-1 β monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis", ARTHRITIS RESEARCH AND THERAPY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 3, 5 June 2008 (2008-06-05), page R67, XP021041234, ISSN: 1478-6354	24-26, 28,38, 39,41
Y	the whole document	1-63
Y	WO 2012/034039 A2 (APEXIGEN INC [US]; KE YAOHUANG [US]; WAI LEE PIERRE SUM [US]; ZHANG YO) 15 March 2012 (2012-03-15) the whole document	1-63
Y	WO 02/16436 A2 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH [AT]; GRAM HERMANN [DE]) 28 February 2002 (2002-02-28) example 3	1-63
X	OWYANG ALEXANDER M ET AL: "XOMA 052, a potent, high-affinity monoclonal antibody for the treatment of IL-1 beta-mediated diseases", MABS, vol. 3, no. 1, January 2011 (2011-01), pages 49-60, XP002694577,	24-26, 28,32, 34-37
Y	the whole document	1-63
X	VINAY BHASKAR ET AL: "Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice", ATHEROSCLEROSIS, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 216, no. 2, 16 February 2011 (2011-02-16), pages 313-320, XP028226561, ISSN: 0021-9150, DOI: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2011.02.026 [retrieved on 2011-02-24]	24-26, 28,38, 39,41
Y	the whole document	1-63
X	OWYANG ALEXANDER M ET AL: "XOMA 052, an Anti-IL-1 beta Monoclonal Antibody, Improves Glucose Control and beta-Cell Function in the Diet-Induced Obesity Mouse Model", ENDOCRINOLOGY, ENDOCRINE SOCIETY, US, vol. 151, no. 6, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 2515-2527, XP009136504, ISSN: 0013-7227, DOI: 10.1210/EN.2009-1124	24-26, 28,38, 39,41
Y	the whole document	1-63
	----- -/--	

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/073009

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/081139 A2 (ABGENIX INC [US]; GREEN LARRY [US]; FAGGIONI RAFFAELLA [US]; FOORD ORI) 3 August 2006 (2006-08-03) the whole document	1-63
A	WO 2010/028273 A1 (XOMA TECHNOLOGY LTD [US]; SCANNON PATRICK J [US]; SOLINGER ALAN M [US]) 11 March 2010 (2010-03-11) the whole document	1-63
A	JACKSON J R ET AL: "IN VITRO ANTIBODY MUTARATION IMPROVEMENT OF A HIGH AFFINITY, NEUTRALIZING ANTIBODY AGAINST IL-1BETA", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 154, no. 7, 1 April 1995 (1995-04-01), pages 3310-3319, XP000941315, ISSN: 0022-1767 the whole document	1-15
A	US 2003/026806 A1 (WITTE ALISON [US] ET AL) 6 February 2003 (2003-02-06) the whole document	1-63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/073009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009149370 A1	10-12-2009	AU 2009256072 A1	10-12-2009
		CA 2727171 A1	10-12-2009
		DK 2293816 T3	04-02-2013
		EP 2293816 A1	16-03-2011
		ES 2398693 T3	21-03-2013
		HR P20130042 T1	31-03-2013
		JP 2011522832 A	04-08-2011
		PT 2293816 E	13-02-2013
		US 2011189172 A1	04-08-2011
		WO 2009149370 A1	10-12-2009
WO 2007002261 A2	04-01-2007	AT 446972 T	15-11-2009
		AU 2006262179 A1	04-01-2007
		BR P10612273 A2	27-01-2009
		CA 2612760 A1	04-01-2007
		CN 101228188 A	23-07-2008
		CN 102775493 A	14-11-2012
		DK 1899378 T3	01-02-2010
		DK 2163562 T3	09-12-2013
		DK 2314623 T3	17-09-2012
		EP 1899378 A2	19-03-2008
		EP 2163562 A2	17-03-2010
		EP 2314623 A1	27-04-2011
		EP 2322552 A2	18-05-2011
		ES 2335232 T3	23-03-2010
		ES 2391334 T3	23-11-2012
		ES 2439709 T3	24-01-2014
		IL 188094 A	31-01-2011
		IL 202630 A	31-01-2011
		JP 4931919 B2	16-05-2012
		JP 2008543340 A	04-12-2008
		JP 2011254835 A	22-12-2011
		KR 20080039875 A	07-05-2008
		KR 20130076901 A	08-07-2013
		NZ 565138 A	24-02-2012
		PL 2314623 T3	30-11-2012
		PT 1899378 E	26-01-2010
		PT 2163562 E	19-12-2013
		PT 2314623 E	02-10-2012
		SI 1899378 T1	26-02-2010
		SI 2163562 T1	31-01-2014
		SI 2314623 T1	30-11-2012
		US 2008044414 A1	21-02-2008
		US 2009060918 A1	05-03-2009
		US 2009060923 A1	05-03-2009
		US 2009214545 A1	27-08-2009
		US 2009214568 A1	27-08-2009
		US 2009226461 A1	10-09-2009
US 2009246210 A1	01-10-2009		
US 2010055110 A1	04-03-2010		
US 2010061998 A1	11-03-2010		
US 2012014967 A1	19-01-2012		
US 2014004125 A1	02-01-2014		
WO 2007002261 A2	04-01-2007		
ZA 200800555 A	30-09-2009		
WO 2004067568 A2	12-08-2004	AU 2004207741 A1	12-08-2004
		CA 2509136 A1	12-08-2004

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/073009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 1780855 A	31-05-2006
		EP 1590369 A2	02-11-2005
		JP 4538461 B2	08-09-2010
		JP 2007531509 A	08-11-2007
		JP 2010143929 A	01-07-2010
		MX PA05007853 A	10-02-2006
		US 2006140932 A1	29-06-2006
		US 2009209004 A1	20-08-2009
		WO 2004067568 A2	12-08-2004

WO 2012034039	A2	15-03-2012	AU 2011299066 A1
			21-03-2013
			CN 103328511 A
			25-09-2013
			EP 2614085 A2
			17-07-2013
			JP 2013541330 A
			14-11-2013
			US 2013330355 A1
			12-12-2013
			WO 2012034039 A2
			15-03-2012

WO 0216436	A2	28-02-2002	AR 035581 A1
			16-06-2004
			AT 396206 T
			15-06-2008
			AU 9549001 A
			04-03-2002
			AU 2001295490 B2
			16-06-2005
			BR 0113420 A
			29-07-2003
			CA 2420231 A1
			28-02-2002
			CN 1484652 A
			24-03-2004
			CZ 20030505 A3
			14-05-2003
			DE 122009000078 I1
			25-03-2010
			DK 1313769 T3
			15-09-2008
			EC SP034490 A
			31-03-2003
			EP 1313769 A2
			28-05-2003
			ES 2305110 T3
			01-11-2008
			HK 1061403 A1
			26-02-2010
			HU 0300806 A2
			29-12-2003
			IL 154465 A
			30-11-2010
			JP 4271936 B2
			03-06-2009
			JP 2004506448 A
			04-03-2004
			JP 2008295456 A
			11-12-2008
			KR 20030034140 A
			01-05-2003
			KR 20080056316 A
			20-06-2008
			LU 91624 I2
			25-01-2010
			MX PA03001590 A
			04-06-2003
			MY 130248 A
			29-06-2007
			NL 300427 I1
			01-02-2010
			NO 2012018 I1
			10-12-2012
			NO 20030827 A
			14-04-2003
			NZ 524199 A
			24-09-2004
			NZ 534269 A
			28-04-2006
			PE 03192002 A1
			11-06-2002
			PL 360358 A1
			06-09-2004
			PT 1313769 E
			26-08-2008
			RU 2286351 C2
			27-10-2006
			SI 1313769 T1
			31-10-2008
			SK 2132003 A3
			07-10-2003
			TW I321568 B
			11-03-2010
			US 2004063913 A1
			01-04-2004
			US 2009081732 A1
			26-03-2009
			US 2011256151 A1
			20-10-2011
			WO 0216436 A2
			28-02-2002
			ZA 200301275 A
			02-04-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/073009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006081139	A2	03-08-2006	
		AR 052889 A1	11-04-2007
		AU 2006208286 A1	03-08-2006
		CA 2590164 A1	03-08-2006
		EP 1851245 A2	07-11-2007
		EP 2361933 A2	31-08-2011
		ES 2395953 T3	18-02-2013
		US 2007065439 A1	22-03-2007
		US 2010183616 A1	22-07-2010
		WO 2006081139 A2	03-08-2006
WO 2010028273	A1	11-03-2010	
		AU 2009289545 A1	11-03-2010
		AU 2009289547 A1	11-03-2010
		CA 2735939 A1	11-03-2010
		CA 2735940 A1	11-03-2010
		EP 2341935 A1	13-07-2011
		EP 2341936 A1	13-07-2011
		JP 2012502058 A	26-01-2012
		JP 2012502059 A	26-01-2012
		US 2012003226 A1	05-01-2012
		US 2012005127 A1	05-01-2012
		US 2014017249 A1	16-01-2014
		WO 2010028273 A1	11-03-2010
		WO 2010028275 A1	11-03-2010
US 2003026806	A1	06-02-2003	
		US 2003026806 A1	06-02-2003
		US 2005084493 A1	21-04-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 C 0 8 7
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K	35/74	(2015.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	35/74	A	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/08		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00		
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/04		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	11/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	11/04		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	
			A 6 1 P	3/10		
			G 0 1 N	33/53	P	

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

(72)発明者 グラブロフスキー, ステファニー

スイス国 ツェーハー - 8 0 4 9 チューリッヒ, リートホーフシュトラッセ 5 7

(72)発明者 クレッチマー, タイタス

スイス国 ツェーハー - 8 9 5 2 シュリーレン, バーンホーフシュトラッセ 5 9

(72)発明者 シュミット, シモン

スイス国 ツェーハー - 8 9 5 2 シュリーレン, フライエシュトラッセ 2 7

(72)発明者 シャムシエブ, アブディジャパール

スイス国 ツェーハー - 8 0 5 3 チューリッヒ, ブッフツェルグシュトラッセ 6 4

(72)発明者 シェーファー, トルステン アレクサンダー

ドイツ国 7 9 5 4 0 レラハ, バスラ シュトラッセ 1 2 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA01 CA12 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12

EA04 GA11

4B064 AG27 CA19 CC24 DA03 DA13

4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA02 CA44 CA46

4C084 AA13 ZA33 ZA45 ZA59 ZA89 ZA94 ZA96 ZB15 ZC35

4C085 AA13 AA14 EE01

4C087 AA01 BC30 NA14 ZA33 ZA45 ZA59 ZA89 ZA94 ZA96 ZB15

ZC35

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016503293A5	公开(公告)日	2016-12-08
申请号	JP2015540154	申请日	2013-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	德勒尼克斯治疗股份公司		
申请(专利权)人(译)	徳芮妮セラピューテイクスアーゲー		
[标]发明人	グラブロフスキーステファニー クレッチマータイタス シュミットシモン シャムシエブアブディジャパール シェーフアートルステンアレクサンダー		
发明人	グラブロフスキー, ステファニー クレッチマー, タイタス シュミット, シモン シャムシエブ, アブディジャパール シェーフアー, トルステン アレクサンダー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C12P21/08 C12N11/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K48/00 A61K35/74 A61P9/10 A61P19/02 A61P29/00 A61P19/08 A61P21/00 A61P17/00 A61P17/04 A61P11 /00 A61P27/02 A61P17/06 A61P11/04 A61P3/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P11/00 A61P11/04 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/00 A61P27/02 A61P29/00 A61K39/3955 C07K16/245 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2317/94 G01N33/6869 G01N2333/545 C07K2317/24 C07K2317/35		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C12P21/08 C12N11/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395. D A61K39/395.N A61K48/00 A61K35/74.A A61P9/10 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P19/08 A61P21 /00 A61P17/00 A61P17/04 A61P11/00 A61P27/02 A61P17/06 A61P11/04 A61P9/10.101 A61P3/10 G01N33/53.P		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA03 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/ZA33 4C084/ZA45 4C084/ZA59 4C084/ZA89 4C084 /ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB15 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/BC30 4C087/NA14 4C087/ZA33 4C087/ZA45 4C087/ZA59 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4C087 /ZA96 4C087/ZB15 4C087/ZC35 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	2012007503 2012-11-05 EP 61/722532 2012-11-05 US		
其他公开文献	JP6333271B2 JP2016503293A		
摘要(译)			

本发明涉及一价高效IL-1 β 结合抗体片段，其是抗IL-1 β 结合成员，特别是高度稳定和可溶。这种结合成员也可用于治疗 and 诊断炎症和其他疾病。还提供了相关的核酸，载体，细胞和组合物。关于抑制人IL-1 β 的生物学作用，通过抑制IL-1 β 刺激的人成纤维细胞释放IL-6，测定效力低于5 μ M，优选低于约1 μ M。（IC₅₀）。